

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 167**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.1998 E 98907341 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 0971699**

54 Título: **Método para utilizar lípidos neutros para modificar la liberación in vivo desde liposomas multivesiculares**

30 Prioridad:

**31.01.1997 US 792566**

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

**17.02.2015**

73 Titular/es:

**PACIRA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
10450 SCIENCE CENTER DRIVE  
SAN DIEGO, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**WILLIS, RANDALL, C.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 529 167 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

Método para utilizar lípidos neutros para modificar la liberación *in vivo* desde liposomas multivesiculares

## 5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a formulaciones liposómicas de compuestos como por ejemplo fármacos. Más concretamente esta invención se refiere a métodos para modificar la velocidad de liberación *in vivo* de compuestos encapsulados desde liposomas multivesiculares, mediante elección del lípido neutro de la formulación liposómica.

10 Cuando los fosfolípidos y muchos otros lípidos anfipáticos se dispersan suavemente en un medio acuoso se hinchan, hidratan y forman espontáneamente vesículas bicapa multilamelares concéntricas con capas de medios acuosos separando las bicapas lipídicas. Estos sistemas se denominan comúnmente liposomas multilamelares o vesículas multilamelares (MLV, por sus siglas en inglés) y usualmente tienen diámetros de 0.2 a 5  $\mu\text{m}$ . La aplicación de ultrasonido a las MLV produce la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV, por sus siglas en inglés) unidas por una única bicapa lipídica con diámetros generalmente en el intervalo de 20 a 100 nm, que contienen una solución acuosa. Los liposomas multivesiculares (MVL, por sus siglas en inglés) se diferencian de las MLV y las SUV en la forma en que se fabrican, en la disposición aleatoria, no concéntrica, de cámaras acuosas dentro del liposoma, y en la inclusión de lípidos neutros necesarios para formar el MVL.

20 Durante años se han utilizado diversos tipos de lípidos que difieren en la longitud de la cadena, la saturación y el grupo de cabeza, en formulaciones liposómicas de fármacos, que incluyen los liposomas unilamelares, multilamelares, y multivesiculares mencionados antes. Los lípidos neutros utilizados hasta la fecha en la fabricación de liposomas multivesiculares se han limitado principalmente a la trioleína y la tricaprilina.

25 Uno de los objetivos principales del área es desarrollar formulaciones liposómicas para la liberación controlada *in vivo* de fármacos y otros principios activos de interés. Ciertos fármacos necesitan ser liberados bastante rápidamente luego del emplazamiento del depósito liposómico, y otros requieren una velocidad relativamente lenta de liberación durante un período sostenido de tiempo. Hasta ahora, la velocidad de liberación de un compuesto biológicamente activo desde una formulación liposómica ha sido modificada por elección de los lípidos anfipáticos, los lípidos que forman membrana, o por manipulación de la relación molar entre fosfolípidos y colesterol. Alternativamente, se han incluido compuestos de ese tipo como un ácido o un espaciador de osmolalidad en la solución acuosa para la encapsulación, para ayudar a modificar la velocidad de liberación del compuesto biológicamente activo encapsulado (WO 96 082 35).

35 El control de las velocidades de liberación desde formulaciones liposómicas es complicado por el hecho de que muchos principios biológicamente activos, como las proteínas, se deben almacenar a temperaturas reducidas, es decir, a aproximadamente 4 °C, para retener toda la actividad. Desafortunadamente, algunas formulaciones liposómicas que tienen excelentes velocidades de liberación a temperaturas *in vivo* se desintegran bastante rápidamente a temperaturas de almacenamiento como esas.

40 Por lo tanto, existe la necesidad de más y mejores métodos para la elección de formulaciones liposómicas que maximicen el control sobre la velocidad de liberación de los compuestos activos encapsulados proporcionando simultáneamente una estabilidad de la vida útil durante largos períodos de tiempo a temperaturas de almacenamiento de aproximadamente 4 °C, por ejemplo de 2 a 10 °C.

## Resumen de la invención

50 En general, la invención da a conocer un método para modificar la velocidad de liberación de un compuesto biológicamente activo, como un fármaco, que está encapsulado en una formulación liposómica multivesicular mediante la utilización en la formulación de un componente lipídico neutro con una relación molar elegida entre un lípido neutro de liberación lenta y un lípido neutro de liberación rápida, donde la proporción de lípido neutro de liberación rápida en la relación molar se incrementa para aumentar la velocidad de liberación del compuesto biológicamente activo. Alternativamente, la proporción del lípido neutro de liberación lenta en la relación molar se puede aumentar para disminuir la velocidad de liberación del compuesto biológicamente activo. Generalmente, la relación molar entre lípido neutro lento:rápido se encuentra en el intervalo de 1:1 a 0:1, por ejemplo de 1:4 a 1:100, o de 1:4 a 1:27, y la relación molar entre el componente lipídico neutro y el componente lipídico total (todos los lípidos del liposoma) se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.21.

60 Para modificar la velocidad de liberación *in vivo*, el punto de fusión del componente lipídico neutro debe ser preferentemente menor o igual a la temperatura *in vivo* a la cual se va a utilizar la formulación, así como menor o igual a la temperatura a la cual se va a almacenar la formulación.

65 Los lípidos neutros de liberación lenta útiles en el nuevo método de esta invención son, por ejemplo, trioleína, tripalmitoleína, trimiristoleína, trilaurina y tricaprina, siendo la preferida la trioleína. Los lípidos neutros de liberación rápida útiles incluyen, por ej., tricaprilina y tricaproína y sus mezclas. Sin embargo, la tricaproína y otros lípidos

semejantes no se usan habitualmente como el único lípido neutro en una formulación de liposomas multivesiculares destinada al uso *in vivo*.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición liposómica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto biológicamente activo encapsulado en una formulación liposómica multivesicular en la que la formulación contiene un componente lipídico neutro en una relación molar entre componente lipídico neutro de liberación lenta y componente lipídico neutro de liberación rápida de aproximadamente 1:1 a 1:100, por ejemplo de aproximadamente 1:3 a 1:54, de 1:4 a 1:27, o de aproximadamente 1:4 a 1:18.

En otra realización, la invención da a conocer un método para elegir una formulación liposómica multivesicular para encapsular un compuesto biológicamente activo elegido de modo de obtener un perfil de velocidad de liberación deseado del compuesto activo *in vitro* y/o una velocidad de liberación terapéutica deseada *in vivo*. En esta realización de la invención, se prepara una familia de formulaciones de MVL que encapsulan el compuesto biológicamente activo elegido, donde cada miembro de la familia utiliza un componente lipídico neutro que tiene una relación molar lípido neutro lento:rápido diferente, generalmente en el intervalo de 1:0 a 0:1. Por ejemplo, se puede preparar una familia de formulaciones que utilicen relaciones molares entre lípido neutro lento:rápido de 1:0, 1:1, 1:4, 1:18, 1:27, 1:100, 0:1. Cada miembro de la familia de formulaciones se incubaba en el medio en el cual se va a obtener la velocidad de liberación deseada, es decir, en un medio de almacenamiento a temperatura de almacenamiento o en plasma humano, un medio semejante a plasma, o en un medio fisiológico en el cual se va a liberar la sustancia fisiológicamente activa, por ejemplo líquido cefalorraquídeo (LCR) a la temperatura corporal. De esta manera se obtiene un perfil de velocidad de liberación para cada formulación. Después se elige la formulación que tenga la relación lípido neutro lento:rápido que produzca el perfil de velocidad de liberación deseado en las condiciones deseadas para la sustancia biológicamente activa escogida.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que le da comúnmente un experto en el área a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, los métodos y los materiales preferidos se describen más adelante.

La práctica de esta invención proporciona la ventaja de que se puede elegir una formulación de liposomas multivesiculares que tenga una velocidad de liberación relativamente rápida *in vivo* que no comprometa el deseo de liberación lenta en las condiciones de almacenamiento. El método de la invención, por consiguiente, proporciona un fundamento para obtener una velocidad de liberación deseada a través de la elección del componente lipídico neutro utilizado en la fabricación del MVL sin comprometer el deseo de una formulación que tenga una liberación lenta en las condiciones de almacenamiento. Además, el control sobre la velocidad de liberación en las condiciones *in vivo* opera más o menos independientemente de la composición de la fase acuosa encapsulada o de la combinación de los otros lípidos de las formulaciones.

Este hallazgo es particularmente para los liposomas multivesiculares dado que otros tipos de liposomas no contienen lípidos neutros en el componente lipídico y/o no incorporan lípidos neutros en vesículas no concéntricas estrechamente agrupadas.

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

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico que compara las velocidades de liberación del factor estimulante de las colonias de granulocitos humano recombinante, (rhu G-CSF) de liposomas multivesiculares (MVL) formulados con diferentes relaciones molares entre trioleína y tricaprilina (V, 100:0  $\Delta$ , 50:50  $\circ$ , 25:75  $\square$ , 10:90  $\nabla$ , 0, 0:100) como lípido neutro cuando se incubaron a 37 °C en plasma humano al 60% en solución salina.

La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de un estudio farmacodinámico que compara la duración del aumento dependiente de rhu G-CSF en el número de leucocitos en sangre periférica de hámsters dorados sirios luego de la inyección subcutánea de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de rhuG-CSF en solución salina ( $\nabla$ ), en una formulación MVL sólo de trioleína, 100:0 ( $\circ$ ), en una formulación MVL sólo de trioleína solubilizada pre-inyección con Tween™ 20 ( $\Delta$ ), y en una formulación MVL sólo de tricaprilina, 0:100 ( $\square$ ).

La figura 3 es un gráfico que comparan las velocidades de liberación de rhu GM-CSF desde MVL formulados con diferentes relaciones molares entre trioleína y tricaprilina ( $\Delta$ , 100:0;  $\circ$ , 25:75;  $\square$ , 10:90) como lípido neutro, cuando se incuban a 37 °C en plasma humano al 60% en solución salina.

La figura 4 es un gráfico que muestra un estudio farmacocinético de los niveles de rhu GM-CSF muestras de plasma en sangre venosa de ratones luego de una inyección subcutánea de 1 mg/kg de rhu GM-CSF en una formulación de

MVL sólo de trioleína, 100:0 (○) y en una formulación de MVL de trioleína:tricaprilina 25:75 (D). El nivel de rhu GM-CSF se determinó en plasma con EDTA por ELISA. LOQ es el límite de cuantificación.

5 La figura 5 es un gráfico que muestra las velocidades de liberación de rhu IGF-1 desde liposomas multivesiculares formulados con diversos triglicéridos como el componente lipídico neutro cuando se incuban a 37 °C en plasma humano al 60% en solución salina. Los lípidos neutro utilizados en la fabricación de los MVL fueron: (□) trioleína, (○) tripalmitoleína, (Δ) tricaprilinea, (∇) trilaurina y (0) tricaprilinea.

10 La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de un estudio farmacocinético de los niveles de rhu IGF-1 en suero de ratas luego de la inyección subcutánea de 6.25 mg/kg de rhu IGF-1 en la formulación de MVL de tripalmitoleína (○) y en la formulación de MVL de tricaprilinea (Δ). El nivel sérico de rhu IGF-1 se determinó por ELISA.

15 La figura 7 es un gráfico que muestra la liberación de rhu insulina y <sup>14</sup>C-sacarosa coencapsulante desde MVL fabricados con el lípido neutro, trioleína o tricaprilinea cuando se incuban a 37 °C en soluciones salinas que contienen 60% de plasma humano. (D) sacarosa retenida por la formulación de MVL de trioleína; (○) insulina retenida por la formulación de MVL de trioleína; (Δ) retenida por la formulación de MVL de tricaprilinea; e (V) insulina retenida por la formulación de MVL de tricaprilinea.

20 La figura 8 es un gráfico que compara las velocidades de liberación de morfina desde MVL formulados con diferentes relaciones molares de trioleína y tricaprilinea como lípido neutro cuando se incuban a 37 °C en plasma humano al 60% en solución salina. (D) 10:0, trioleína:tricaprilinea, 10 lotes; (○,○) 1:4, trioleína:tricaprilinea, 2 lotes; (Δ) 1:9, trioleína:tricaprilinea; (V) 0:10, trioleína:tricaprilinea.

25 La figura 9 muestra resultados de un estudio farmacocinético de formulaciones de MVL de morfina fabricadas con diferentes relaciones molares entre trioleína y tricaprilinea e inyectadas en el espacio epidural de perros Beagle. La liberación de morfina por el MVL se determinó midiendo el nivel de morfina en el líquido cefalorraquídeo adyacente, separado por la membrana duramadre. (0) 5 mg de morfina (sulfato) en solución salina; (V) 40 mg de morfina en la formulación de MVL de trioleína:tricaprilinea 10:0; (○) 20 mg de morfina en la formulación de MVL de trioleína:tricaprilinea 1:4; (□) 20 mg de morfina en la formulación de MVL de trioleína:tricaprilinea 1:9; y (Δ) 20 mg de morfina en la formulación de MVL de trioleína:tricaprilinea 0:10.

30 La figura 10 es un gráfico que resume los resultados en una transformación de Arrhenius de un estudio que determina el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la velocidad de liberación de morfina en 2 lotes de una formulación de MVL de trioleína:tricaprilinea 1:9. Los MVL se almacenaron en solución salina normal a 4 °C, 26 °C, 37 °C y 41 °C. La ordenada es la velocidad de liberación de la morfina desde MVL expresada en términos de cantidad liberada por día como un porcentaje de la cantidad total de morfina en la suspensión de MVL; la abscisa es  $1/\text{temperatura de almacenamiento} \times 10^4 \text{ (}^\circ\text{K)}^{-1}$ .

35 La figura 11 es un gráfico que muestra arabinósido de citosina (AraC) retenido en MVL incubados en plasma humano a 37 °C. Las formulaciones de MVL utilizaron como el componente lipídico neutro (□) sólo trioleína; (○) trioleína:tricaprilinea 1:4; (V) trioleína:tricaprilinea 1:9; (x) trioleína:tricaprilinea 1:18; (Δ) trioleína:tricaprilinea 1:27; y (0) sólo tricaprilinea.

40 La figura 12 es un gráfico que muestra el efecto de la relación entre lípidos neutros sobre la liberación de arabinósido de citosina desde MVL incubados en plasma humano a 37 °C cuando los MVL se formulan con el componente fosfolípido principal DOPC, reemplazado con DSPC. Las formulaciones fueron (□) DOPC y sólo trioleína; (Δ) DOPC y trioleína:tricaprilinea 1:9 (0) DOPC y sólo tricaprilinea; (○) DSPC y sólo trioleína; (V) DSPC y trioleína:tricaprilinea 1:9; y (+) DSPC y sólo tricaprilinea.

45 La figura 13 es un gráfico que muestra el efecto de la relación entre lípidos neutros sobre la liberación de <sup>14</sup>C-sacarosa desde MVL incubados en plasma humano a 37 °C cuando los MVL se formulan con el componente fosfolípido principal DOPC, reemplazado con DEPC. Las formulaciones de DOPC fueron (□) sólo trioleína; (Δ) trioleína:tricaprilinea 1:9; y (○) sólo tricaprilinea. Las formulaciones de DSPC fueron (V) sólo trioleína; (+) trioleína:tricaprilinea 1:9; y (0) sólo tricaprilinea.

50 La figura 14 es un gráfico que muestra el efecto del uso de tricaproína como componente lipídico neutro, sola o en combinación con trioleína, sobre la liberación de <sup>14</sup>C-sacarosa desde MVL incubados en plasma humano a 37 °C. Las formulaciones fueron (○) sólo trioleína; (Δ) trioleína: tricaproína1:4; (V) trioleína: tricaproína 1:9; (0) trioleína: tricaproína 1:18; y (+) sólo tricaproína.

55 La figura 15 es un gráfico que muestra la liberación *in vitro* de un oligonucleótido de 15 mer desde MVL preparados con trioleína (□) o tricaprilinea (○) como lípido neutro. Los MVL se incubaron en líquido cefalorraquídeo (LCR) de ratas a 37 °C.

60 La figura 16 es un gráfico que muestra la liberación durante la incubación en plasma humano de <sup>14</sup>C-sacarosa desde MVL que también contienen plásmido PBR 322 de E. coli y clorhidrato de lisina. La liberación de sacarosa se utilizó

como un indicador sustituto de la liberación del plásmido. Los MVL se fabricaron con (○) trioleína o (Δ) tricaprilina como lípido neutro.

5 La figura 17 es un gráfico que muestra la liberación de <sup>14</sup>C-sacarosa durante la incubación en plasma humano de MVL fabricados con tripalmitoleína y tricaprilina como el componente lipídico neutro. Las relaciones entre los lípidos neutros utilizadas en las formulaciones de MVL fueron (○) sólo tripalmitoleína; (+) tripalmitoleína:tricaprilina 1:1; (0) tripalmitoleína:tricaprilina 1:2; (V) tripalmitoleína:tricaprilina 1:4; (Δ) tripalmitoleína:tricaprilina 1:9; y (□) sólo tricaprilina.

10 La figura 18 es un gráfico que muestra la cantidad de tetracaína restante en el sitio de la inyección subcutánea en ratones a los que se inyectaron MVL que contenían tetracaína fabricados con un componente lipídico neutro elegido entre cualquiera de (\*) trioleína; (X) trioleína: tricaprilina 10:90; (+) trioleína: tricaprilina 5:95; (0) trioleína:tricaprilina 2:98; (V) trioleína:tricaprilina 1:99; o (○) tricaprilina.

15 Las figuras 19A-D son gráficos que muestran la liberación de compuestos biológicamente activos encapsulados en MVL durante el almacenamiento en solución salina normal a temperaturas de 2 a 8 (nominal 4), 25, 32 y 37 °C. Los MVL se fabricaron con tricaprilina (Figuras 19A y 19C); o tricaprina (Figuras 19B y 19D); como componente lipídico neutro y con arabinósido de citosina (Figuras 19A y 19B); o morfina (Figuras 19C y 19D) como el compuesto biológicamente activo.

20 La figura 20 es un gráfico de Arrhenius de las gráficas de las figuras 19A y 19B que muestra la dependencia de la velocidad de liberación del arabinósido de citosina, desde los MVL fabricados con (□) tricaprilina, punto de fusión (pf) 8 °C; o (○) tricaprina, pf 31.5 °C como el componente lipídico neutro, de la temperatura de almacenamiento. La abscisa es el inverso de la temperatura de almacenamiento, °K.

25 Descripción detallada

30 Se proporciona un método para modificar la velocidad de liberación de un compuesto biológicamente activo, como un fármaco, encapsulado en una formulación liposómica multivesicular mediante elección del lípido neutro o de la combinación de lípidos neutros, que se utilizó para fabricar los liposomas multivesiculares (MVL).

35 Existen al menos tres tipos de liposomas. La expresión "liposomas multivesiculares (MVL)" según se usa a lo largo de toda la memoria y las reivindicaciones significa partículas hechas por el hombre de 1-200 μm parcialmente compuestas por membranas lipídicas que encierran múltiples cámaras acuosas no concéntricas. En contraposición, "los liposomas o vesículas multilamelares" (MLV) tienen múltiples membranas concéntricas "piel de cebolla", entre medio de las cuales existen compartimientos acuosos concéntricos tipo concha. Los liposomas multilamelares tienen característicamente diámetros medios en el rango del micrómetro, generalmente entre 0.5 y 25 μm. La expresión "liposomas o vesículas unilamelares (ULV)" según se usa en este documento se refiere a estructuras liposómicas que tienen una sola cámara acuosa, generalmente con un diámetro medio que varía entre aproximadamente 20 y 40 500 nm.

45 Los liposomas multilamelares y unilamelares se pueden preparar por varios métodos relativamente simples. El estado anterior de la técnica describe técnicas para producir ULV y MLV (por ejemplo patente de Estados Unidos N° 4,522,803 para Lenk 4,310,506 para Baldeschweiler 4,235,871 para Papahadjopoulos; 4,224,179 para Schneider, 4,078,052 para Papahadjopoulos; 4,394,372 para Taylor 4,308,166 para Marchetti; 4,485,054 para Mezei; y 4,508,703 para Redziniak).

50 En contraste, la producción de liposomas multivesiculares requiere varios pasos de procesamiento. En resumen, el método preferido para la fabricación de MVL es el siguiente: el primer paso es preparar una emulsión de "agua en aceite" capturando en un componente lipídico compuesto de al menos un lípido anfipático y al menos un lípido neutro en uno o más solventes orgánicos volátiles para el componente lipídico, un primer componente acuoso inmiscible y un principio biológicamente activo a ser encapsulado y opcionalmente agregar, a uno o ambos del componente lipídico y del primer componente acuoso, un ácido u otro excipiente para modular la velocidad de liberación de los principios biológicamente activos encapsulados desde los MVL. La mezcla se emulsiona, y después se mezcla con un segundo componente acuoso inmiscible para formar una segunda emulsión. La turbulencia necesaria para la formación de la segunda emulsión se proporciona mecánicamente, mediante energía de ultrasonido, atomización por boquilla y similares, o mediante combinaciones de éstas, para formar esférulas de solvente suspendidas en el segundo componente acuoso. Las esférulas de solvente contienen múltiples gotas acuosas con la sustancia a encapsular disuelta en ellas (véase Kim et al., Biochem. Biophys. Acta, 728:339-348, 1983). Para una revisión exhaustiva de los diversos métodos de preparación de ULV y MLV, consulte Szoka, et al. 60 Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:465-508, 1980.

65 La expresión "esférula de solvente" según se usa a lo largo de toda la memoria y las reivindicaciones significa una gota esférica microscópica de solvente orgánico, dentro de la cual hay múltiples gotitas más pequeñas de solución acuosa. Las esférulas de solvente están suspendidas y totalmente inmersas en una segunda solución acuosa.

La expresión "lípidos neutros" significa un aceite o una grasa que no cuenta con capacidad para formar membranas por sí mismo y carece de un grupo de "cabeza" hidrófilo.

5 La expresión "lípidos anfipáticos" significa una molécula que posee un grupo de "cabeza" hidrófilo y un grupo de "cola" hidrófobo y que tiene capacidad para formar membranas.

La expresión "lípidos zwitteriónicos" significa un lípidos anfipático con una carga neta de cero a pH 7.4.

10 La expresión "lípidos aniónicos" significa un lípidos anfipático con una carga neta negativa a pH 7.4.

La expresión "lípidos catiónicos" significa un lípidos anfipático con una carga neta positiva a pH 7.4.

15 Según se usa en este documento, la "vida útil" de una formulación liposómica está relacionada a la velocidad de liberación de la sustancia encapsulada desde una formulación liposómica en una solución de almacenamiento, por ejemplo solución salina normal (cloruro de sodio al 0.9%), a una temperatura de almacenamiento, por ejemplo de 4 °C.

20 En general, para preparar liposomas multivesiculares, es necesario incluir al menos un lípidos anfipático y un lípidos neutro en el componente lipídico. Los lípidos anfipáticos pueden ser lípidos zwitteriónicos, aniónicos o catiónicos. Los ejemplos de lípidos anfipáticos zwitteriónicos son fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, esfingomielinas etc. Los ejemplos de lípidos anfipáticos aniónicos son fosfatidilgliceroles, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, ácidos fosfatídicos, etc. Los ejemplos de lípidos anfipáticos catiónicos son diacil trimetilamoniopropano y etil fosfatidilcolina. Los ejemplos de lípidos neutros son trioleína y tripalmitoleína, trimiristoleína y tricaprilina. En el método nuevo, la velocidad de liberación del compuesto biológicamente activo se modifica empleando en la fabricación de los liposomas multivesiculares un componente lipídico neutro que proporcione la velocidad deseada de liberación en el tipo de líquido en el cual se van a usar los MVL. Para un uso *in vivo*, por lo tanto, la velocidad de liberación desde los MVL se debe determinar en el plasma o en un medio similar al plasma porque la velocidad de liberación del compuesto biológicamente activo desde los MVL para ciertos lípidos neutros, puede diferir mucho dependiendo de si la liberación es en solución salina o en plasma.

30 Según se usa en este documento, la expresión "componente lipídico neutro" significa el lípidos neutro, o la mezcla de lípidos neutros, que se utilizan en la fabricación de los liposomas multivesiculares.

35 Según se usa en este documento, la expresión "medio similar al plasma", significa una solución sintética que incluye además de la solución salina normal, al menos alguno de los constituyentes proteicos o lipídicos del plasma sanguíneo o componentes de otros líquidos biológicos, como el líquido cefalorraquídeo (LCR), o los líquidos intersticiales. Por ejemplo, la solución salina normal que contiene plasma humano citratado o seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés) es un ejemplo de un "medio similar al plasma" según la expresión empleada en este documento.

40 La expresión "condiciones *in vivo*" significa inyección real o emplazamiento de MVL en un cuerpo vivo e incluyen la denominada incubación "ex vivo" de MVL en plasma o un medio de similar al plasma a la temperatura corporal (es decir, 37 °C para los seres humanos).

45 Aunque el componente lipídico neutro puede contener un único lípidos neutro, generalmente el componente lipídico neutro consiste en una mezcla de un lípidos neutro de liberación lenta y un lípidos neutro de liberación rápida en una relación molar en el intervalo de 1:1 a 1: 100, por ejemplo, de aproximadamente 1:4 a 1:18, donde la velocidad de liberación del compuesto biológicamente activo disminuye en proporción al aumento de la relación entre el lípidos neutro de liberación lenta y el lípidos neutro de liberación rápida. Por conveniencia, la relación molar entre el lípidos neutro de liberación lenta y el lípidos neutro de liberación rápida se denomina en este documento como "la relación molar entre el lípidos neutro lento:rápido"

55 El "lípidos neutro de liberación lenta" empleado en la práctica de esta invención se puede elegir entre triglicéridos que tienen fracciones éster de ácido graso monoinsaturado que contienen de 14 a 18 átomos de carbono en la cadena acilo y que tienen generalmente un peso molecular entre 725 y 885, y los que tienen fracciones éster de ácido graso saturado que contienen de 10 a 12 átomos de carbono en la cadena acilo y generalmente tienen un peso molecular entre aproximadamente 725 y 885; y sus mezclas. Ésteres de colesterol como el oleato de colesterol y ésteres de propilenglicol. Los lípidos neutros de liberación lenta preferidos para utilizar en el método de esta invención son trioleína, tripalmitoleína, trimiristoleína, trilaurina y tricaprina, donde la trioleína o la tripalmitoleína son las que más se prefieren. Cuando se considera el uso *in vivo*, se usan generalmente trilaurina (pf 46.5 °C) y otros lípidos neutros con un punto de fusión superior a 37 °C en la práctica de esta invención sólo en mezcla con uno o más de otros lípidos neutros cuando la mezcla tiene un punto de fusión menor o igual a 37 °C, y preferentemente menor de 37 °C. Un experto sabrá cómo determinar el punto de fusión de una mezcla de lípidos, como una mezcla de triglicéridos.

65 El "lípidos neutro de liberación rápida" empleado en la práctica de esta invención se puede elegir entre triglicéridos que tienen fracciones éster de ácido graso monoinsaturado que contienen de 6 a 8 átomos de carbono en la cadena

acilo y tienen un peso molecular entre aproximadamente 387 y 471, y sus mezclas. Sin embargo, se ha descubierto sorprendentemente que el uso de un componente lipídico neutro en los MVL que contienen uno o más lípidos neutros, con una cadena acilo de seis o menos carbonos (especialmente el uso de tricaproína como el único lípido neutro) resulta en la liberación rápida de los compuestos encapsulados al entrar en contacto con el entorno *in vivo*. Por consiguiente, los lípidos neutros con una cadena acilo de seis o menos carbonos se deben usar sólo en combinación con uno o más lípidos neutros que tengan una fracción acilo de cadena más larga. Los lípidos neutros de liberación rápida preferidos son tricaprilina, y mezclas de tricaprilina y tricaproína, o mezclas de triglicéridos de cadena C<sub>6</sub> a C<sub>8</sub>. También se pueden usar como lípidos neutros los diésteres de propilenglicol con fracciones acilo de ocho o diez carbonos, oleato de colesterol y/u octanoato de colesterol.

Un factor de igual importancia para la relación molar entre los lípidos neutros es la elección de un componente lipídico neutro que tenga un punto de fusión inferior a la temperatura a la cual se van a almacenar y usar los MVL. Como muchos compuestos biológicamente activos muy deseables en aplicaciones terapéuticas requieren una baja temperatura de almacenamiento para evitar el rápido deterioro, el componente lipídico neutro se debe elegir de modo que tenga un punto de fusión inferior a la temperatura de almacenamiento deseada, así como inferior a la temperatura a la cual se va a usar la formulación *in vivo*.

Los resultados de las pruebas de temperatura de almacenamiento se determinaron inspeccionando las partículas microscópicamente y midiendo mediante un ensayo químico las cantidades de material encapsulado liberado. Como se observa en estos estudios (Figura 20), los MVL almacenados a una temperatura superior al punto de fusión del componente lipídico neutro experimentan una reorganización estructural de las membranas que es, en algunos casos, acompañada de la liberación rápida ("absorción rápida") del contenido encapsulado. Este fenómeno se denomina "efecto del punto de fusión". El tiempo para la aparición del efecto del punto de fusión depende de la composición del lípido neutro y de los ingredientes de la fase acuosa encapsulada. Ciertos compuestos encapsulados, como IL-2, parecen interaccionar con los MVL de modo de retrasar en horas o incluso días, el inicio de la "congelación" a temperaturas inferiores al punto de fusión del lípido neutro, tal vez por influir en la formación en los MVL de un estado intermedio, "metaestable". Sin embargo, incluso formulaciones con dicha aparición retardada experimentan eventualmente la transición morfológica característica del efecto del punto de fusión. Los ejemplos 15 y 16 ilustran el efecto del punto de fusión sobre las velocidades de liberación de compuestos biológicamente activos encapsulados, desde MVL almacenados a una temperatura inferior al punto de fusión (figuras 19A-D y 20). Para distinguir entre los dos estados de transición morfológica, el efecto de aparición retardada se denomina en este documento "el efecto de la temperatura".

Al escoger el componente lipídico neutro de conformidad con la práctica de esta invención, se prefiere generalmente que el componente lipídico neutro tenga un punto de fusión menor o igual a la temperatura a la cual se van a almacenar y utilizar los MVL (para evitar la pérdida rápida del compuesto activo encapsulado durante el almacenamiento o durante el uso *in vivo*) debido al efecto del punto de fusión. La temperatura del punto de fusión de un componente lipídico neutro que consiste en una mezcla de lípidos neutros, y por lo tanto, la temperatura del efecto del punto de fusión sobre los MVL que contienen el componente lipídico neutro, se puede determinar fácilmente preparando la mezcla de interés y someténdola a temperaturas progresivamente más bajas hasta que se observe que la mezcla se "congela". Un método para realizar este procedimiento se da a conocer en J.B. Rossell, *Advances in Lipid Research* 5: 353-408, 1967. Un experto será consciente de que se pueden utilizar otros métodos para obtener esta información. Sin embargo, se debe recordar que el efecto del punto de fusión en la formulación liposómica en su conjunto puede ser influenciado por los otros lípidos de los MVL así como por los ingredientes de la primera solución acuosa.

La tabla 1 siguiente indica la cantidad de átomos de carbono en las cadenas acilo, el peso molecular y las temperaturas de los puntos de fusión de lípidos neutros representativos que se pueden utilizar en la práctica de esta invención.

Tabla 1  
Propiedades físicas de los lípidos neutros

Lípidos neutros	Éster de ácido graso	Peso molec.	Viscosidad cP	P.F. en °C
Triglicéridos				
Trioleína	C18:1 9C	885	74	5
Tripalmitoleína	C16:1 9C	801		≤ 5
Trimiristoleína	C14:1 9C	725	≤5	
Trilaurina	C12	639		45.5
Tricaprina	C10	555		31.5
Tricaprilina	C8	471	20-28	8.3
Tricaproína	C6	387		≤ 0
Captex 355	C8, C10 mezclado	Prom. 496		≤ 5
Diéster de propilenglicol				
Captex 200	C8, C10 mezclado	Prom. 345	9-13	≤ 5
Éster de colesterol				
Oleato de colesterol	C18:1 9C		651	44-47
Octanoato de colesterol	C8		512	110

5 En un método de la invención, la velocidad de liberación del compuesto biológicamente activo se modifica utilizando en la fabricación de los liposomas multivesiculares un componente lipídico neutro que contenga trioleína o tripalmitoleína, o una mezcla de éstas, como lípido neutro de liberación lenta, y eligiendo una relación molar entre el lípido neutro de liberación lenta y el lípido neutro de liberación rápida en el intervalo de aproximadamente 1:0 a 0:1. La velocidad de liberación del compuesto activo aumenta al aumentar la proporción del lípido neutro de liberación rápida en la relación molar. Generalmente la relación molar entre el componente lipídico neutro y la suma de todos los lípidos de la formulación de MVL se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.21. El lípido neutro de liberación rápida preferido para utilizar en dichas formulaciones con trioleína y/o tripalmitoleína es tricaprilinea.

15 Además del efecto del punto de fusión, que es aportado en parte por el componente lipídico neutro, las características de la fase acuosa encapsulada en los MVL, particularmente la interacción química de los compuestos activos con los lípidos de los MVL, también pueden influir en la velocidad de liberación del compuesto biológicamente activo. Para tener en cuenta este factor adicional durante la formulación, en una realización, esta invención proporciona un método de adaptación del componente lipídico neutro a la fase acuosa de interés.

20 En el primer paso del método, para determinar de qué manera el componente lipídico neutro funciona con cualquier fase acuosa específica (es decir, una que contenga un compuesto biológicamente activo de interés), se prepara una familia de formulaciones de MVL que contengan la fase acuosa de interés, donde cada miembro de la familia de las formulaciones tenga una relación molar entre lípido neutro de liberación lenta:rápida de los lípidos neutros de liberación lenta y rápida elegidos diferente, de modo que la familia en su conjunto represente una progresión gradual de dichas relaciones, por ejemplo 1:1, 1:2, 1:4, 1:9, 1:18; 1:27, 1:100, etc.

25 Las velocidades de liberación *in vivo* correspondientes a las distintas relaciones molares entre lípidos neutros lentos:rápidos contenidas en los miembros individuales de la familia de formulaciones de MVL se determina incubando por separado cada miembro de la familia *in vitro* en plasma o en un medio similar al plasma a una temperatura *in vivo*, es decir, 37 °C para los seres humanos, durante un período de horas o incluso días.

35 Cualquiera de los métodos que se ilustran en los ejemplos, u otros conocidos por los técnicos, se puede utilizar para determinar a tiempos progresivos la cantidad acumulada de una o más sustancias encapsuladas con la fase acuosa que ha sido liberada durante la incubación. Para facilitar la realización de esta determinación, se puede incluir una sustancia radioactiva, como <sup>14</sup>C-sacarosa, en la fase acuosa en el momento de la encapsulación. Sin embargo, se prefiere elegir el compuesto biológicamente activo de interés como la sustancia cuya velocidad de liberación es controlada y registrada. Se recomienda que la información sobre la velocidad de liberación se obtenga de esta manera para cada miembro de la familia de formulaciones que se está analizando.

A partir de la información de la velocidad de liberación determinada por este procedimiento, se puede trazar una gráfica que muestre una curva de liberación, o "perfil de velocidad de liberación" para cada miembro de la familia de formulaciones para mostrar sus características de liberación *in vivo* individuales, donde la ordenada de la gráfica indica la cantidad acumulada de la sustancia de interés que ha sido liberada o retenida, y la abscisa indica los tiempos progresivos a los cuales se mide la cantidad liberada o retenida. Se genera así una familia correspondiente de curvas de velocidad de liberación, donde cada curva de la familia ilustra las características de liberación de su correspondiente relación molar entre lípido neutro lento:rápido cuando se utiliza con la fase acuosa que se está analizando.

Un técnico con experiencia puede después elegir la formulación que tenga las características de liberación más deseables para la aplicación terapéutica particular de interés para obtener el control deseado sobre la liberación de la sustancia de interés (es decir, un compuesto biológicamente activo) con el fin de suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto activo al individuo que se le va a administrar la formulación de MVL. Un técnico con experiencia puede seleccionar así una formulación de MVL, en particular una que tenga la relación molar entre lípido neutro:lento:rápido más ventajosa, para suministrar una dosis terapéuticamente eficaz en el período de tiempo óptimo con el fin de maximizar el efecto terapéutico del fármaco o de otro compuesto biológicamente activo administrado durante el tratamiento.

Por ejemplo, si se desea producir una formulación de MVL que libere un compuesto activo en particular *in vivo*, en un período relativamente corto de tiempo, es decir, en el transcurso de varias horas después de la administración, se elegirá el componente lipídico neutro que produzca una curva de liberación, que indique dichas características de suministro cuando es almacenada *in vitro* en plasma, o una composición similar al plasma, a aproximadamente 37 °C. La proporción de lípido neutro de liberación rápida en la relación será comparativamente grande en esta circunstancia. Por otra parte, cuando se desea producir una formulación de MVL que libere su compuesto activo *in vivo* durante un período de tiempo relativamente prolongado, es decir, en el transcurso de diez horas luego de la administración, incluso hasta en 200 horas post administración, se elegirá el componente lipídico neutro que produzca una curva de liberación que indique dichas características de suministro cuando se incubaba en condiciones *in vivo*. En este caso, la proporción del lípido neutro de liberación lenta en la relación molar será comparativamente grande, y en algunos casos el componente lipídico neutro no contendrá nada de lípido neutro de liberación rápida.

La estabilidad de la vida útil de las formulaciones también debe ser determinada por incubación de las formulaciones en el medio de almacenamiento previsto a cualquier temperatura de almacenamiento que sea necesaria para asegurar la integridad del compuesto biológicamente activo durante un período de tiempo adecuado. Por conveniencia, los estudios de estabilidad de la vida útil también se pueden realizar en un medio como plasma o un medio similar al plasma, pero un experto será capaz de sustituirlo por un medio de almacenamiento adecuado diferente, como solución salina normal, para usar con el compuesto biológicamente activo de interés, si se desea. Como muchos compuestos biológicamente activos requieren almacenamiento a temperaturas en el intervalo de aproximadamente 2 a 8 °C, se recomienda que se lleven a cabo pruebas de estabilidad de la vida útil a una temperatura en este intervalo.

Estos procedimientos se ilustran en los ejemplos de esta solicitud. Por ejemplo, en formulaciones que contenían mezclas de trioleína y tricaprilina, cuando el componente lipídico neutro se mantuvo constante y se hicieron aumentos escalonados en la relación entre trioleína y tricaprilina, se obtuvieron formulaciones de MVL caracterizadas por una liberación cada vez más lenta, como se ilustra en el ejemplo 14 (Figura 18). En el ejemplo 13, se preparó una familia gradual de formulaciones que encapsulaban sacarosa y clorhidrato de lisina y que contenían mezclas de tripalmitoleína y tricaprilina. Se creó una familia gradual de formulaciones con relaciones molares de tripalmitoleína:tricaprilina de 0:1, 1:0, 1:9, 1:4, 1:2 y 1:1 manteniendo constante la cantidad de tripalmitoleína y haciendo aumentos escalonados en la cantidad de tricaprilina. En este ejemplo, se obtuvo una liberación cada vez más rápida para cada aumento escalonado en la proporción de tricaprilina en el componente lipídico neutro.

Cabe señalar particularmente que, a diferencia de la mayoría de los otros tipos de liposomas, no se pueden predecir características de liberación *in vivo* precisas de las formulaciones de MVL a partir de estudios de liberación *in vitro* llevados a cabo en solución salina. Por ejemplo, los MVL formulados con tricaproína, un triglicérido que tiene solamente 6 carbonos en sus fracciones acilo, como el único lípido neutro, no fueron estables en las condiciones *in vivo* (en soluciones que contenían plasma o seroalbúmina a 37 °C), pero fueron estables en condiciones de almacenamiento (en solución salina a 2-8 °C) hasta por una semana. Sin embargo, las formulaciones que contenían relaciones molares de tricaproína:trioleína de 4:1, 9:1 y 18:1 fueron estables en condiciones *in vivo* durante al menos 4 días y produjeron un conjunto gradual de curvas de velocidad de liberación (Figura 14).

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones liposómicas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto biológicamente activo encapsulado en una formulación de liposomas multivesiculares, donde la formulación contiene un componente lipídico neutro con una relación molar entre el lípido neutro de liberación lenta y el lípido neutro de liberación rápida en el intervalo de aproximadamente 0:1 a 1:0, por ejemplo de 1:1 a 1:100 y en general de aproximadamente 4:1 a 27:1. La relación molar entre el componente lipídico

neutro y la suma de los lípidos en la formulación de MVL se encuentra generalmente en el intervalo de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.21.

Los lípidos anfipáticos preferidos para utilizar en la fabricación de los liposomas multivesiculares son fosfolípidos con números pares de átomos de carbono en la cadena carbonada porque dichos fosfolípidos son lípidos naturales que se encuentran en el organismo y no producen metabolitos tóxicos. Una lista representativa de lípidos anfipáticos preferidos para utilizar en la práctica de esta invención sigue a continuación. También se incluyen las abreviaturas que se pueden utilizar para referirse a fosfolípidos particulares en esta solicitud.

DOPC o DC18:1PC = 1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DLPC o DC12:0PC = 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DMPC o DC14:0PC = 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DPPC o DC16:0PC = 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DSPC o DC18:0PC = 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DAPC o DC20:0PC = 1,2-diaraquidoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DBPC o DC22:0PC = 1,2-dibehenoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DC16:1PC = 1,2-dipalmitoleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DC20:1PC = 1,2-dieicosenoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DEPC o DC22:1PC = 1,2-dierucoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DPPG = 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol

DOPG = 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol

La expresión "compuesto biológicamente activo" según se usa en este documento significa un compuesto químico que se sabe que es útil para modular los procesos biológicos con el fin de lograr un efecto deseado en la modulación o el tratamiento de una afección indeseada existente en un ser viviente, como un efecto médico, agrícola o cosmético. Por lo tanto, los compuestos biológicamente activos se eligen generalmente de las amplias categorías de: medicamentos, productos farmacéuticos, radioisótopos, productos agrícolas y cosméticos.

Los compuestos biológicamente activos terapéuticos o fármacos para la encapsulación en los métodos y las composiciones de esta invención, incluyen antineoplásicos, antiinfecciosos, hormonas, antidepresivos, antivirales, antinociceptivos, ansiolíticos y productos biológicos.

Los ejemplos representativos de antineoplásicos útiles en las composiciones y los métodos de la presente invención incluyen metotrexato, taxol, factor de necrosis tumoral, clorambucilo, interleucinas, etopósido, citarabina, fluorouracilo y vinblastina.

Los ejemplos representativos de antiinfecciosos útiles en las composiciones y los métodos de la presente invención incluyen pentamidina, metronidazol, penicilina, cefalexina, tetraciclina y cloranfenicol.

Los ejemplos representativos de antivirales útiles en las composiciones y los métodos de la presente invención incluyen didesoxicitidina, zidovudina, aciclovir, interferones, didesoxiinosina y ganciclovir.

Los ejemplos representativos de ansiolíticos y sedantes útiles en las composiciones y los métodos de la invención incluyen benzodiazepinas como diazepam, barbituratos como fenobarbital y otros compuestos como buspirona y haloperidol.

Los ejemplos representativos de hormonas útiles en las composiciones y los métodos de la presente invención incluyen estradiol, prednisona, insulina, hormona del crecimiento, eritropoyetina y prostaglandinas.

Los ejemplos representativos de antidepresivos útiles en las composiciones y los métodos de la presente invención incluyen fluoxetina, trazodona, imipramina y doxepina.

Los ejemplos representativos de antinociceptivos útiles en las composiciones y los métodos de la presente invención incluyen hidromorfina, oxicodona, fentanilo, morfina y meperidina.

La expresión "productos biológicos" abarca ácidos nucleicos (ADN y ARN), proteínas y péptidos e incluye compuestos como citosinas, hormonas (hormonas hipofisarias), factores de crecimiento, vacunas etc. Son de particular interés la interleucina-2, el factor de crecimiento-1 semejante a la insulina, los interferones, la insulina, la heparina, la leuprolida, el factor estimulante de las colonias de granulocitos (g-CSF), el factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), el factor de necrosis tumoral, la inhibina, el factor de crecimiento tumoral alfa y beta, la sustancia inhibidora de Mullerian, la calcitonina y la vacuna contra la hepatitis B.

El compuesto biológicamente activo se puede emplear en la presente invención de diversas formas, por ejemplo como complejos moleculares o sales biológicamente aceptables. Los ejemplos representativos de dichas sales son succinato, clorhidrato, bromhidrato, sulfato, fosfato, nitrato, borato, acetato, maleato, tartrato, salicilato, sales metálicas (por ejemplo, de metales alcalinos o alcalinotérreos), sales de amonio o amina (por ejemplo, amonio cuaternario) y similares. Además, también se pueden emplear derivados de los principios activos como ésteres,

amidas y éteres que tengan características de retención y de liberación deseables, pero que sean fácilmente hidrolizados *in vivo* por el pH o las enzimas fisiológicos.

Según se usa en este documento la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto biológicamente activo necesaria para inducir un efecto farmacológico deseado. La cantidad puede variar mucho según la eficacia de un determinado principio activo, la edad, el peso y la respuesta de los huéspedes individuales, así como de la naturaleza y la gravedad de los síntomas del huésped. Por consiguiente, no hay ninguna limitación crítica superior o inferior en cuanto a la cantidad de principio activo. La cantidad terapéuticamente eficaz a emplear en la presente invención puede ser fácilmente determinada por los expertos.

Se cree que el componente lipídico neutro del MVL, que es único para el MVL entre las formulaciones liposómicas, interacciona con el entorno *in vivo* de tal manera que afecta a la velocidad a la cual se liberan los compuestos encapsulados dentro del MVL. En particular, un MVL que tiene un componente lipídico neutro que consiste en triglicéridos de menos de 6 átomos de carbono en la fracción acilo interacciona con el entorno *in vivo* con el fin de convertirse virtualmente en completamente desestabilizado al entrar en contacto con el plasma sanguíneo. Por esta razón, las soluciones salinas no imitan con precisión el efecto del entorno *in vivo* sobre las características de liberación de fármacos desde los MVL, pero se ha descubierto que se pueden utilizar estudios de liberación *in vitro* conducidos en plasma sanguíneo o en un medio similar al plasma para determinar con precisión las características de liberación *in vivo* de una formulación de MVL.

Los ejemplos siguientes ilustran la manera en que la invención puede ser practicada a pesar de que los ejemplos tienen ese propósito.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

MVL que contienen G-CSF

#### 1. Fabricación

Para la fabricación de liposomas multivesiculares (MVL) que contuvieran el factor estimulante de granulocitos (G-CSF), la solución de la combinación de lípidos contenía (por ml de cloroformo): 11 mg de DOPC, 2.3 mg de DPPG, 8.7 mg de colesterol y 2.4 mg (2.7  $\mu$ mol) de trioleína o 1.3 mg (2.7  $\mu$ mol) de tricaprilina. Se prepararon soluciones de lípidos que contenían cuatro relaciones molares diferentes entre los lípidos neutros trioleína y tricaprilina mezclando volúmenes apropiados de soluciones de lípidos que contenían trioleína y tricaprilina. Las relaciones molares entre trioleína y tricaprilina fueron 100:0, 50:50, 25:75, 10:90 y 0:100.

La solución de la primera fase acuosa para las formulaciones de MVL contenía glicina 174 mM, HCl 100 mM, 0.001% de Tween 80™ y 100  $\mu$ g/ml de G-CSF, se agregó 1 ml a un vial que contenía 1 ml de la combinación de lípidos y se emulsionó fijando el vial tapado en una configuración horizontal a la cabeza de un mezclador tipo vórtex (Scientific Products) y agitando a máxima velocidad (2400 oscilaciones/min) durante 6 minutos.

La emulsión final (2 ml) se dividió y se transfirió a dos viales que contenían 2.5 ml de glucosa al 3.2% y lisina 40 mM. La emulsión se dispersó en gotas microscópicas fijando el vial tapado en una configuración horizontal a la cabeza de un mezclador tipo vórtex y agitando durante 3 segundos a 2400 oscilaciones/min. El contenido de los viales se transfirió a un matraz que contenía 5 ml de glucosa al 3.2% y lisina 40 mM. Se eliminó el cloroformo de las gotas microscópicas o esférulas transfiriendo el matraz a un baño de agua giratorio a 37 °C y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 10 - 15 cfh durante 10 minutos. Se obtuvieron liposomas multivesiculares en suspensión que contenían G-CSF encapsulado.

Las suspensiones de partículas se diluyeron 1:4 con solución salina normal, y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 X g durante 10 minutos. Se extrajo la solución sobrenadante por aspiración, y las partículas se lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal recién preparada y centrifugación. El producto final lavado se resuspendió a una concentración de 25% del volumen de partículas agrupadas por volumen total y se almacenó a 2-8 °C para estudios posteriores.

#### 2. Velocidad de liberación *in vitro*

Se determinó la velocidad de liberación *in vitro* desde MVL preparados como se describió antes por incubación en soluciones salinas que contenían 70% de plasma humano citratado y 0.1% de azida sódica a 37 °C. Se determinó el G-CSF en la fracción de partículas recogidas de la centrifuga por solubilización de muestras en IPA al 50% y cuantificación por cromatografía líquida de alta presión y detección UV, utilizando métodos conocidos.

La dependencia de la velocidad de liberación *in vitro* del G-CSF de la composición del componente lipídico neutro utilizado en la fabricación de los liposomas multivesiculares se muestra en la figura 1. A medida que aumentó la

relación molar entre trioleína y tricaprilina, la velocidad de liberación del G-CSF desde los liposomas multivesiculares disminuyó.

### 3. Velocidad de liberación *in vivo*

Las formulaciones de MVL de trioleína y tricaprilina con G-CSF se evaluaron en un modelo farmacodinámico en hámsters dorados sirios. El G-CSF exógeno estimula la producción de neutrófilos (granulocitos) que puede ser evaluada analizando muestras de sangre para determinar un aumento en el número de neutrófilos en sangre periférica y en consecuencia un aumento en el número de leucocitos en sangre periférica.

Por lo tanto, se evaluaron las formulaciones que contenían tricaprilina o trioleína con respecto a la liberación en un modelo farmacodinámico en hámsters que midió el pico y la duración de la producción excesiva de leucocitos (granulocitos) causada por rhu G-CSF (Cohen et al. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:2484-2488). En estos estudios se empleó una inyección subcutánea de una solución de G-CSF como control para la bioequivalencia de la proteína encapsulada. La formulación de liberación rápida que contenía tricaprilina también se empleó como control para la bioequivalencia de la proteína encapsulada. En primer lugar, se comparó el pico y la duración del aumento de granulocitos luego de la inyección subcutánea en los hámster de formulaciones que todas contenían tricaprilina (relación molar lento:rápido de 0:100) frente a los causados por una solución de G-CSF sin encapsular y la formulación de trioleína de liberación más prolongada (relación lento:rápido de 100:0). Para cada formulación, 3 a 5 hámsters recibieron 75-100 µg de G-CSF por kg. Los resultados (Figura 2), fueron los previstos por los estudios de liberación *in vitro*. La formulación de tricaprilina proporcionó una liberación rápida del G-CSF y estimuló una producción de granulocitos similar a la de la solución del G-CSF sin encapsular. La formulación de trioleína tuvo un pico más bajo (y posterior) y mayor duración.

Como un control adicional, un grupo de hámsters recibieron una inyección de la formulación de trioleína solubilizada con detergente (Tween 20™) inmediatamente antes de la inyección. El número de granulocitos encontrados a las 24 horas para la formulación solubilizada fue similar al observado como resultado de las inyecciones de las soluciones de G-CSF o de la formulación que contenía sólo tricaprilina como lípido neutro (Figura 2).

### Ejemplo 2

#### 1. Fabricación

Se fabricaron liposomas multivesiculares que contenían factor estimulante de las colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) como se describe en el ejemplo 1, pero utilizando relaciones molares entre lípidos neutros de trioleína y tricaprilina de 100:0, 25:75 y 10:90.

#### 2. Liberación *in vitro* en plasma humano a 37 °C

Se prepararon las suspensiones y se incubaron en plasma humano a 37 °C como se describe en el ejemplo 1. El GM-CSF que permaneció encapsulado se determinó por solubilización de la fracción de partículas en IPA al 50% y cuantificación por cromatografía líquida de alta presión y detección UV, utilizando métodos conocidos.

Los resultados del ensayo de liberación *in vitro* (Figura 3) demostraron que el reemplazo gradual de trioleína con tricaprilina produce aumentos graduales en la velocidad de liberación.

#### 3. Farmacocinética *in vitro*

Se administraron a ratones BALBc (de 7 a 8 semanas de edad y que pesaban aproximadamente 20 gramos) inyecciones subcutáneas de liposomas que contenían GM-CSF fabricados con 100% de trioleína o con una relación entre trioleína y tricaprilina de 25:75. Se extrajeron muestras de sangre antes de la inyección y 1, 2, 4 y 7 días después de la inyección, y se analizó el plasma para determinar la concentración de GM-CSF utilizando un kit de ELISA. La formulación fabricada con una relación entre trioleína tricaprilina de 25:75 proporcionó un mayor nivel de pico y una menor duración de rhu GM-CSF detectable en comparación con la formulación fabricada con 100% de trioleína como lípido neutro (Figura 4). Estos resultados fueron los previstos por el ensayo *in vitro* en plasma humano a 37 °C, y muestran que la velocidad de liberación del GM-CSF encapsulado aumenta por adición de tricaprilina al componente lipídico neutro.

### Ejemplo 3

#### Depo/IGF-1

#### 1. Fabricación

Se fabricaron liposomas multivesiculares con rhu IGF (factor de crecimiento semejante a la insulina humano recombinante), con <sup>14</sup>C-sacarosa como espaciador osmótico y citrato de amonio como tampón. La solución de

combinación de lípidos contenía (por litro) 10.4 g de DOPC, 2.1 g de DPPG, 7.7 g de colesterol, y el componente triglicérido fue 2.1 g de trioleína, 1.9 g de tripalmitoleína, 1.5 g de trilaurina, 1.3 g de tricaprina o 1.1 g de tricaprilina (relación molar, 0.34:0.07:0.52:0.06).

5 La solución de la primera fase acuosa contenía (por ml) 16 mg de rhu IGF-1 (Chiron), 7% de sacarosa y citrato de amonio 20 mM, pH 5. Se preparó una primera emulsión mezclando a alta velocidad 5 ml de la solución de combinación de lípidos con 5 ml de la solución de la fase acuosa a 9000 rpm durante 9 minutos a 25-27 °C. La emulsión se partió en microgotas (esférulas) por adición de 30 ml de una solución de lisina 40 mM y glucosa al 4% al recipiente de mezcla y mezclando a 6000 rpm durante 1 minuto. Se eliminó el cloroformo de las gotas microscópicas o esférulas transfiriendo la suspensión a un matraz que contenía 70 ml de solución de lisina 40 mM y glucosa al 3.2%, colocando el matraz en un baño de agua girorrotatorio a 37 °C, y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 70 cfh durante 20 minutos para obtener las partículas de MVL en suspensión.

15 Las suspensiones se diluyeron 1:4 con solución salina normal, y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 X g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo la solución sobrenadante por aspiración, y las partículas se lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal recién preparada y centrifugación.

## 2. Velocidades de liberación *in vitro*

20 El producto final lavado se resuspendió a una concentración de 25% del volumen de partículas agrupadas por volumen total y se almacenó a una temperatura de 2-8, 25, 32 o 37 °C durante 24 o 48 horas. La fracción del sedimento de la centrifugación a 25 000 X G X 2 minutos se solubilizó y se analizó por HPLC para determinar el IGF-1 retenido. Asimismo, cada una de las formulaciones que contenía IGF-1 almacenadas a 2-8 °C se evaluó dentro de las 24 horas en el ensayo de liberación *in vitro* descrito en el ejemplo 1 y los resultados se resumen en la figura 5. Las formulaciones fabricadas con trioleína (C18:1) o tripalmitoleína (C16:1) presentaron un perfil de velocidad de liberación semejante. Más de 70% del IGF-1 encapsulado se liberó en 7 días. La formulación fabricada con tricaprilina (C8) mostró un perfil de velocidad de liberación rápida con una liberación casi completa de IGF-1 en 2 días. Las formulaciones fabricadas con tricaprina (C10) o trilaurina (C12) liberaron el IGF-1 mucho más lentamente que la formulación de trioleína estándar, menos del 50% se liberó en 7 días. Estos resultados sugieren que la longitud de la cadena acilo del triglicérido no está directamente correlacionada con la velocidad de liberación *in vitro* del IGF-1 encapsulado, porque la liberación de las formulaciones de tricaprilina (C8) fue más rápida que las de las formulaciones de tricaprina (C10) o trilaurina (C12).

35 Cabe señalar que el almacenamiento de las formulaciones de trilaurina en solución salina por sólo unos pocos días a 2-8° C produjo la reorganización morfológica de las partículas y una liberación completa de los materiales encapsulados acompañante. Este efecto no se esperaría de la estabilidad exhibida en el ensayo de liberación *in vitro* a temperaturas más altas. Este efecto catastrófico se relacionó al almacenamiento de la formulación a temperaturas significativamente menores que el punto de congelación del lípido neutro. Este efecto se demuestra en los ejemplos 40 16 y 17 más adelante.

## 3. Farmacocinética *in vivo*

45 Ratas Sprague-Dawley macho (250-300 g de peso) recibieron inyecciones subcutáneas de la formulación de liposomas multivesiculares que contenían IGF-1 que fueron fabricados con tricaprilina o tripalmitoleína como lípido neutro. La formulación de tricaprilina mostró un nivel de pico más alto de rhu IGF-1 plasmático y una duración de la liberación corta en comparación con la formulación fabricada con tripalmitoleína (Figura 6). Este resultado confirma la predicción de la liberación rápida de liposomas multivesiculares fabricados con tricaprilina basándose en los resultados del ensayo de liberación *in vitro*.

### Ejemplo 4

#### 1. Fabricación

55 Para la fabricación de liposomas multivesiculares que contuvieran rhu-insulina, la solución de la combinación de lípidos contenía (por ml de cloroformo): 11 mg de DOPC, 2.3 mg de DPPG, 8.7 mg de colesterol y 2.4 mg (2.7 μmol) de trioleína o 1.3 mg (2.7 μmol) de tricaprilina como se indicó.

60 Las formulaciones de la solución de la primera fase acuosa contenían 7.5% de <sup>14</sup>C-sacarosa, ácido cítrico 20 mM, HCl 50 mM y 5 mg/ml de rhu-insulina (E. coli, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Se preparó una primera emulsión mezclando a alta velocidad 4 ml de la solución de combinación de lípidos con 4 ml de la solución de la fase acuosa a 9000 rpm durante 8 minutos a 25-27 °C. La emulsión se partió en microgotas (esférulas) por adición de 20 ml de una solución de lisina 20 mM y glucosa al 4% al recipiente de mezcla, y mezclando a 3000 rpm durante 1 minuto. Se eliminó el cloroformo de las gotas microscópicas o esférulas transfiriendo la suspensión a un matraz que contenía 30 ml de una solución de lisina 20 mM y glucosa al 4% en un baño de agua girorrotatorio a 37 °C, y enjuagando la 65

superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 70 pies cúbicos por hora durante 20 minutos para obtener las partículas de MVL en suspensión.

5 Las suspensiones se diluyeron 1:4 con solución salina normal, y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 X g durante 10 minutos. Se extrajo la solución sobrenadante por aspiración, y las partículas se lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal recién preparada y centrifugación. El producto final lavado se resuspendió a una concentración de 25% del volumen de partículas agrupadas por volumen total y se almacenó a 2-8 °C para estudios posteriores.

## 10 2. Velocidades de liberación *in vitro*

Se realizó el ensayo de liberación "*in vitro*" diluyendo 1 volumen de suspensión almacenada con 3.2 volúmenes de plasma humano citratado, y colocando 0.6 ml de esta suspensión en los tubos de microcentrifuga que se taparon y se incubaron en condiciones dinámicas a 37 °C. Después de 1, 3, 6 y 7 días, los tubos se centrifugaron a 14 000 X g X 2 minutos y la solución sobrenadante se transfirió a otro tubo para bioensayo. Las fracciones del sedimento de las muestras centrifugadas se incubaron en 1% de Nonidet® NP-40 (CalBiochem, San Diego, CA) y ácido trifluoroacético 50 mM durante 10 minutos a 37 °C. Se determinaron la <sup>14</sup>C-sacarosa y la insulina retenidas por la fracción de sedimento por recuento de centelleo y HPLC de fase inversa, respectivamente, utilizando métodos conocidos. Los resultados de estos estudios mostraron que los liposomas multivesiculares fabricado con trioleína como lípido neutro liberaron tanto sacarosa como insulina de manera equivalente y lineal, con una liberación casi completa en 7 días. En contraposición, la formulación fabricada con tricaprilina retuvo sólo 20 a 25% de la sacarosa y la insulina encapsuladas luego de sólo 1 día de incubación en plasma (Figura 7).

### 25 Ejemplo 5

#### 25 1. Fabricación

Para la fabricación de liposomas multivesiculares que contuvieran morfina, se utilizó un proceso escalable validable por GMP. Las relaciones molares del componente lípido neutro entre trioleína y tricaprilina fueron 1:4 o 1:9. Las formulaciones de control contenían trioleína o tricaprilina como el único lípido neutro. La solución de combinación de lípidos contenía (por litro) 10.2 g de DOPC, 2.0 g de DPPG, 7.6 g de colesterol, 2.1 g a 1.1 g de triglicérido dependiendo de la relación molar trioleína:tricaprilina, (relación molar, 0.34:0.07:0.52:0.06).

35 La solución de la primera fase acuosa contenía (por litro) 21 g sulfato de morfina pentahidratado, ácido clorhídrico 0.01 N. Se preparó una primera emulsión mezclando a alta velocidad 0.62 L de la solución de combinación de lípidos con 0.9 L de la solución de la fase acuosa a 8000 rpm durante 30 minutos a 25-27 °C. La emulsión se partió en microgotas (esférulas) transfiriendo a un segundo recipiente de mezcla que contenía 15 litros de una solución de lisina 4 mM y glucosa al 5.9%; y mezclando a 1250-1300 rpm durante 1.5 min a 45 °C. El cloroformo se eliminó de las esférulas por aspersión de la suspensión durante 50 minutos a 45° C a intervalos escalonados: 17 min a 15 L/min, 5 min a 40 L/min, 28 min a 10 L/min. Así se obtuvieron las partículas de MVL en suspensión. Las partículas de la suspensión final se concentraron y se lavaron exentas de morfina sin encapsular por flujo cruzado o diafiltración con 25 L de solución salina normal. El producto final lavado se almacenó a 2-8 °C para estudios posteriores.

#### 45 2. Perfiles de liberación *in vitro*

Los ensayos de liberación *in vitro* se realizaron mediante una dilución 1:9 de las suspensiones que contenían 8 a 15 mg de sulfato de morfina encapsulado por ml en plasma humano. Las suspensiones se incubaron a 37 °C en condiciones dinámicas. Después de 1, 2, 4 y 7 días, las muestras se diluyeron 1:4 con solución salina normal, las partículas se sedimentaron por centrifugación a 800 X g X 10 min y se analizó la fracción de partículas para determinar la cantidad de morfina retenida por solubilización de la fracción de sedimento con IPA al 50%, y se analizó por espectrofotometría UV utilizando métodos conocidos.

55 La figura 8 muestra el perfil de la velocidad de liberación de la liberación de morfina para estas formulaciones, en plasma humano. Como se mostró en los ejemplos anteriores, a medida que la relación entre trioleína y tricaprilina aumenta, la velocidad y la cantidad liberada de morfina disminuye.

#### 3. Farmacocinética *in vivo*

60 Se evaluó la liberación *in vivo* de los liposomas multivesiculares que contenían morfina fabricados con trioleína y tricaprilina solas o en combinación en perros Beagle usando un modelo farmacocinético de inyección epidural. En estos estudios se determinó el nivel de morfina liberada desde la formulación liposómica inyectada en un sitio epidural en el plasma y en un sitio intratecal adyacente (LCR, líquido cefalorraquídeo) separado del sitio epidural por la membrana meníngea espinal. Sólo se muestran los resultados del LCR (Figura 9).

65

Se encontró una correlación entre los resultados de liberación *in vitro* resumidos en la figura 8 y los perfiles de velocidad de liberación observados en el modelo de perro (Figura 9). La formulación que contenía tricaprilina *in vivo* liberó muy rápidamente, con liberación casi completa en 24 horas. El tiempo medio de residencia (MRT) para la formulación de 100% de tricaprilina fue similar al de la inyección de morfina sin encapsular, es decir, 2.3 h vs 1.6 h. La inclusión de una pequeña cantidad de trioleína durante la fabricación, es decir, una relación molar de trioleína:tricaprilina 1:9 o 4:1 disminuyó la velocidad de liberación, ampliando la duración de la liberación en 4 a 5 días, con MRT de 13.2 h y 15.3 h, respectivamente. Las formulaciones que contenían tricaprilina todas liberaron más rápidamente que las formulaciones que usaron trioleína como el único lípido neutro, que tuvieron un MRT de 69 h en este modelo.

#### 4. Estabilidad en el almacenamiento

La alteración paso a paso en la composición del lípido neutro de los MVL para proporcionar una familia de formulaciones con aumento paso a paso en los perfiles de velocidad de liberación de compuestos bioactivos no parece comprometer la estabilidad en el almacenamiento de las formulaciones, siempre que las formulaciones se almacenen a una temperatura próxima o superior al punto de fusión de la combinación de lípidos neutros. Se evaluaron lotes de la formulación de MVL de morfina con trioleína:tricaprilina 10:90 descrita antes, y que liberó rápidamente tanto *in vitro* como *in vivo*, con relación a la dependencia de la velocidad de liberación de la temperatura de almacenamiento. Las suspensiones de MVL en solución salina de almacenamiento se incubaron a la temperatura de almacenamiento normal, 2-8 °C (4 °C nominal) y a temperaturas elevadas, 26, 37 y 41 °C. Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 10, una gráfica de Arrhenius, que grafica el logaritmo de la velocidad de liberación contra 1/temperatura (°K). La pendiente de la gráfica parece ser continua. El perfil de velocidad de liberación a alta temperatura es compatible con la observación de que los MVL almacenados en solución salina a 2-8 °C tienen una liberación muy lenta (alrededor del 1% de la morfina encapsulada por 100 días) y por lo tanto, se puede esperar que tengan una vida útil superior a un año si un criterio de 5 o 10% de liberación del material encapsulado es el límite de la vida útil. Además, también es evidente que una matriz fisiológica como plasma (Figura 9) o el entorno *in vivo* del espacio epidural (Figura 9) acelera considerablemente la liberación en comparación con la liberación en solución salina a 37 °C, es decir, 50% de la morfina encapsulada liberada por día, frente a menos del 1% de la morfina encapsulada por día en el último caso.

#### Ejemplo 6

##### Arabinósido de citosina

#### 1. Fabricación

Se fabricaron liposomas multivesiculares que contenían arabinósido de citosina (AraC) con diversas sustituciones para el componente fosfatidilcolina de la solución de la fase orgánica lipídica. Las sustituciones se realizaron para determinar el efecto que tiene sobre el perfil de la velocidad de liberación cambiar el componente acilo de los fosfolípidos principales en una formulación de MVL que contenía trioleína o tricaprilina como lípido neutro.

En este primer ejemplo, se usó DOPC se utiliza para demostrar que la velocidad de liberación en un medio fisiológico desde las formulaciones de MVL con AraC/HCl en la fase acuosa se puede modificar ajustando la relación entre trioleína y tricaprilina. Las combinaciones de lípidos contenían (por 1200 ml) 122.4 ml de DOPC a una concentración de 100 mg/ml, 2.4 g de DPPG, 9.12 g de colesterol, 2.5 g de trioleína o 1.3 g de tricaprilina, o una mezcla de éstos que produzca una relación molar entre trioleína y tricaprilina de 1:4, 1:9, 1:18 o 1:27.

La solución de la primera fase acuosa contenía 20 mg/ml de arabinósido de citosina, HCl 0.1 N. Se preparó una primera emulsión mezclando a alta velocidad 10 ml de la combinación de lípidos y 10 ml de la solución de la primera fase acuosa a 9000 rpm durante 9 min. La emulsión se partió en microgotas por transferencia de la primera emulsión a un segundo recipiente de mezcla que contenía 200 ml de glucosa al 3.2% y lisina 40 mM, y mezclando a 2100 rpm durante 2.5 minutos. El cloroformo se eliminó por transferencia de la suspensión a dos matraces de 1 litro y enjuagando a 70 cfh. La suspensión final se diluyó 1:2 con solución salina y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 X g X 10 min, se lavaron 3 veces, se resuspendieron hasta 33% de lipocrit y después se ajustaron a 10 mg/ml.

#### 2. Liberación *in vitro* en plasma humano

Los perfiles de velocidad de liberación *in vitro* de las formulaciones de MVL de arabinósido de citosina (AraC) se obtuvieron por dilución de la suspensión 1:9 en plasma humano e incubación de las muestras a 37 °C en condiciones dinámicas. A los tiempos 1, 2, 4 y 7 días, se agregó 1.2 ml de solución salina a 0.3 ml de muestras por triplicado, y la fracción de partículas se recogió por centrifugación a 16 000 X g X 2 min. La fracción sobrenadante se extrajo por aspiración y la fracción de partículas se resuspendió en 1 ml de alcohol isopropílico al 50%, se mezcló con vórtex, se incubó a 37 °C durante 10 min, se centrifugó y después se agregó 0.06 o 0.2 ml del sobrenadante a 1.0 ml de HCl 0.1 N. El arabinósido de citosina se determinó por U.V. de las muestras a 280 nm.

Los perfiles de liberación *in vitro* que midieron el AraC retenido por las formulaciones de liposomas multivesiculares se muestran en la figura 11. La liberación desde la formulación que tenía sólo tricaprilinea como lípido neutro fue rápida. A medida que aumentó la relación entre tricaprilinea y trioleína utilizada en la fabricación de la formulación de MVL, la velocidad de liberación de arabinósido de citosina por los MVL incubados en plasma disminuyó. Por lo tanto, se creó una familia de curvas de velocidad de liberación con velocidades de liberación previsiblemente crecientes mediante aumentos escalonados en la cantidad de trioleína en la relación entre trioleína y tricaprilinea.

#### Ejemplo 7

Efecto de la sustitución de DOPC por fosfatidilcolinas de temperatura de transición superiores o de longitud de cadena más larga en formulaciones que contienen tricaprilinea

El ranking en una familia de perfiles de velocidad de liberación *in vitro* (como el obtenido en el ejemplo 6) con la mayor relación molar entre tricaprilinea y trioleína que da como resultado una liberación más rápida tanto en los modelos *in vivo* como *in vitro* (plasma a 37 °C), sigue siendo constante cuando DOPC es sustituido por una fosfatidilcolina con mayor temperatura de transición de fase o mayor longitud de cadena, en las formulaciones del ejemplo 6. En este ejemplo DOPC (pf 0 °C) fue sustituido por distearoilfosfatidilcolina (DSPC, pf 55 °C).

#### 1. Fabricación

Se ajustaron los parámetros de fabricación para dar cabida al mayor pf de DSPC realizando la emulsión a 50 °C. La fabricación de emulsiones utilizada para las formulaciones de control de DOPC se realizó a temperatura ambiente. Además, la concentración de HCl de la solución de la primera fase acuosa se aumentó en 36% respecto a la del Ejemplo 6.

La solución de combinación de lípidos contenía (por litro) 10.2 g de DOPC o 10.3 g de DSPC, 2.1 g de DPPG, 7.7 g de colesterol y el componente triglicérido fue 1.1 g de tricaprilinea o 2.1 g de trioleína (relación molar 0.34:0.07:0.52:0.06). Se combinaron mezclas de trioleína y tricaprilinea para proporcionar relaciones molares entre trioleína y tricaprilinea de 1:4, 1:9, 1:18, 1:2 para usar en las formulaciones.

La primera fase acuosa contenía (por ml) 20 mg de arabinósido de citosina y HCl 136 mM. Se preparó una emulsión mezclando a alta velocidad 10 ml de la solución de combinación de lípidos con 10 ml de la solución de la fase acuosa empleando una cuchilla de 2 cm de diámetro en un recipiente de acero inoxidable a 9000 rpm durante 8 minutos a temperatura ambiente (para las formulaciones con DOPC) o 55 °C (para la formulaciones con DSPC). La emulsión se partió en microgotas por transferencia a un frasco de vidrio Mason de 400 ml frasco que contenía 200 ml de glucosa al 5% y lisina 40 mM y, utilizando una cuchilla de 4 cm de diámetro, mezclando a 4000 rpm durante 1.5 minutos a la misma temperatura utilizada para la primera emulsión. El cloroformo se eliminó colocando el recipiente en un baño de agua giratorio a 37 °C y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 70 cfm durante 20 minutos.

Las suspensiones se diluyeron 1:4 con solución salina normal y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se extrajo por aspiración, y después las partículas se lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal y centrifugación. El sedimento de partículas final lavado se resuspendió en solución salina normal y se ajustó a aproximadamente 10 mg/ml de arabinósido de citosina.

#### 2. Perfiles de liberación *in vitro*

El ensayo de liberación *in vitro* de AraC desde los MVL se realizó en plasma humano tal como se describe en el ejemplo 6 anterior. Como se muestra en la figura 12, en los MVL en los cuales el DOPC fue sustituido por DSPC de mayor punto de fusión, se obtuvo una familia de perfiles de velocidad de liberación gradual variando la relación molar entre tricaprilinea y trioleína, donde las formulaciones de liberación más rápidas contenían una mayor relación molar entre tricaprilinea y trioleína. Como se demostró previamente para otras formulaciones de MVL, un aumento en la concentración de ácido clorhídrico en la solución de la fase acuosa (en comparación con la contenida en los MVL del ejemplo 6) puede retrasar la liberación del principio activo *in vitro*.

#### Ejemplo 8

#### Sacarosa

#### 1. Fabricación

En este ejemplo, se analizó el efecto de la tricaprilinea sobre la velocidad de liberación para formulaciones que contenían 4% de sacarosa como principio activo en formulaciones en las que se había sustituido

dioleoilfosfatidilcolina (DOPC, pf (0 °C), una cadena fosfatidilcolina de 18 carbonos de longitud sustituida por dieucrilfosfatidilcolina (DEPC, pf (0 °C), una cadena de fosfatidilcolina de 22 carbonos de longitud.

5 La solución de lípidos contenía (por litro) 10.2 g de DOPC o 11.0 g de DEPC y 2.1 g de DPPG, 7.7 g de colesterol, y el componente triglicérido fue 1.1 g de tricaprilina o 2.1 g de trioleína (relación molar de 0.34:0.07:0.52:0.06). Para las mezclas del lípido neutro, se mezclaron las combinaciones de lípidos que contenían trioleína y tricaprilina para proporcionar esas relaciones molares entre trioleína y tricaprilina.

10 La primera fase acuosa contenía 4% de sacarosa (Spectrum USP/NF, Los Ángeles, CA) y se le había agregado una cantidad conocida de 40 µl de <sup>14</sup>C-sacarosa. Se preparó una primera emulsión mezclando a alta velocidad 5 ml de la solución de combinación de lípidos con 5 ml de la solución de la fase acuosa empleando una cuchilla de 2 cm de diámetro en un recipiente de acero inoxidable a 9000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. La emulsión se partió en microgotas por transferencia a un frasco de vidrio Mason de 400 ml que contenía 200 ml de glucosa al 4% y lisina 4 mM durante 2 minutos, utilizando una cuchilla de 4 cm de diámetro y mezclando a 3500 rpm. El cloroformo se eliminó de las gotas transfiriendo la suspensión a un matraz de cultivo de 1 litro colocado en un baño de agua girrotatorio a 37 °C y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 70 cfh durante 20 minutos.

20 Las suspensiones de partículas se diluyeron 1:2 con solución salina normal, y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se extrajo por aspiración, y las partículas se lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal y centrifugación. El sedimento de partículas final lavado se resuspendió en solución salina normal y se ajustó a aproximadamente 33% de lipocrit.

## 25 2. Estudios de liberación *in vitro* en plasma

25 Para los estudios de liberación *in vitro* en plasma, las suspensiones se diluyeron 1:10 en plasma humano con 0.1% de azida sódica. Se incubaron alícuotas de 300 µl por triplicado en tubos Eppendorf de tapa de rosca de 1.5 ml y se cosecharon los días 0, 1, 2, 3 y 4. Las muestras se cosecharon retirando al azar tubos de la estufa de incubación, etiquetando los tubos con el día del retiro, diluyendo el contenido con 1.2 ml de solución salina normal y centrifugando  
30 a 27 000 x g durante 5 minutos en una microcentrífuga. El sobrenadante se separó del sedimento de partículas aspirando cuidadosamente. La fracción de sedimento se resuspendió en 1 ml de IPA al 50% mezclando en vórtex, incubando a 37 °C durante 10 minutos y después mezclando en vórtex. Después se diluyó una muestra de 50 µl con  
35 3 ml de líquido de centelleo en un vial de centelleo, el vial se agitó vigorosamente y se determinó la sacarosa por recuento de centelleo.

40 Como se puede observar de los datos contenidos en la figura 13, la formulación que contenía sólo tricaprilina liberó toda la sacarosa encapsulada en el transcurso de un día cuando se incubó en plasma. Fue necesaria una relación trioleína:tricaprilina de 1:18 para lograr una velocidad de liberación intermedia para una formulación de MVL con esta fase acuosa cuando DEPC reemplazó a DOPC.

## Ejemplo 9

45 En este ejemplo, la tricaprilina (C8) fue sustituida por tricaproína (C6) como lípido neutro que modifica la velocidad de liberación.

### 1. Fabricación

50 La solución de combinación de lípidos contenía (por litro) una combinación de 10.2 g, 2.1 g de DPPG, 7.7 g de colesterol, y el componente triglicérido fue 0.9 g de tricaproína o 2.1 g de trioleína (relación molar de 0.34:0.07:0.52:0.06). Se combinaron mezclas de las soluciones de lípidos que contenían trioleína y tricaproína, para proporcionar soluciones de lípidos que contuvieran relaciones molares entre trioleína y caproína de 1:4, 1:9 y 1:18. Estas formulaciones se fabricaron y analizaron como se describe en el ejemplo 8.

55 La primera fase acuosa contenía 4% de sacarosa (Spectrum USP/NF) y se le agregó una cantidad conocida de 40 µl de <sup>14</sup>C-sacarosa (ICN N° de lote 54661027). Se preparó una primera emulsión mezclando a alta velocidad 5 ml de la solución de combinación de lípidos con 5 ml de la solución de la fase acuosa empleando una cuchilla de 2 cm de diámetro en un recipiente de acero inoxidable a 9000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. La segunda emulsión se realizó en un frasco de vidrio Mason de 400 ml que contenía 200 ml de glucosa al 4% y lisina 4 mM, empleando una cuchilla de 4 cm de diámetro y mezclando a 3500 rpm durante 2 minutos. El cloroformo se eliminó transfiriendo el contenido del frasco a un matraz de cultivo de 1 litro colocado en un baño de agua girrotatorio a 37 °C y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 70 cfh durante 20 minutos.

65 Las suspensiones se diluyeron 1:2 con solución salina normal, y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 X g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se extrajo por aspiración, y las partículas se

lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal y centrifugación. El sedimento de partículas final lavado se resuspendió en solución salina normal y se ajustó a aproximadamente 33% de lipocrit donde el porcentaje de lipocrit es el volumen ocupado por los liposomas dividido entre el volumen total de la suspensión de liposomas multiplicado por 100. El rendimiento para cada variación en el lípido neutro fue superior al 50%. Luego de la fabricación, la concentración de sacarosa libre a 33% de lipocrit fue aproximadamente 3% de la concentración total de sacarosa.

## 2. Perfiles de liberación *in vitro*

Para los estudios de liberación *in vitro* en plasma, las suspensiones se diluyeron 1:10 en plasma humano. Se incubaron alícuotas de 300  $\mu$ l por triplicado en tubos Eppendorf de tapa de rosca de 1.5 ml y se cosecharon los días 0, 1, 2, 3 y 4. Las muestras se cosecharon retirando al azar tubos de la estufa de incubación, etiquetando los tubos con el día del retiro, diluyendo el contenido con 1.2 ml de solución salina normal y centrifugando a 27 000 x g durante 5 minutos en una microcentrífuga. El sobrenadante se separó del sedimento aspirando cuidadosamente. La fracción de sedimento se resuspendió en 1 ml de IPA al 50% mezclando en vórtex, incubando a 37 °C durante 10 minutos y después mezclando nuevamente en vórtex. Después se diluyó una muestra de 50  $\mu$ l con 3 ml de líquido de centelleo en un vial de centelleo, el vial se agitó vigorosamente y se determinó la radioactividad de la <sup>14</sup>C-sacarosa por recuento de centelleo.

Como se muestra en la figura 14, la sustitución de tricaprilina por tricaproína en las mezclas que contenían trioleína como combinación de lípidos neutros que modifica la velocidad de liberación, dio lugar a formulaciones con una familia gradual de velocidades de liberación para diversas relaciones molares trioleína:tricaproína. Cuanto mayor fue la relación molar entre tricaproína y trioleína, más rápida fue la liberación de sacarosa. Hay una diferencia distintiva entre las formulaciones que contienen tricaproína y tricaprilina. Con esta fase acuosa, es decir, que contiene sacarosa como el principio activo encapsulado, las partículas multivesiculares fabricadas usando solamente tricaproína experimentaron una transformación física y liberaron sus contenidos en el transcurso de 5 minutos de dilución en plasma humano a temperatura ambiente. La dilución en solución salina que contenía 0.5% de seroalbúmina bovina tuvo el mismo efecto. En contraste, la formulaciones que contenían sólo tricaprilina como lípido neutro necesitaron 12 o más horas de incubación en plasma a 37 °C para una liberación completa del principio activo. A pesar de la inestabilidad de las formulaciones sólo de tricaproína en plasma humano o solución salina a temperatura ambiente las formulaciones fueron estables en el almacenamiento a 2-8 °C en solución salina durante al menos una semana.

### Ejemplo 10

#### Oligonucleótidos antisentido

Este ejemplo ilustra el uso del método de la invención para encapsular oligonucleótidos antisentido.

#### 1. Fabricación

La solución de la primera fase acuosa contenía (por ml) 5, 10 o 20 mg de un oligonucleótido antisentido IL-6 (donado por Leu Neckers, NIH, Bethesda, MD), que en algunos estudios estaba biotinilado, y 5% de manitol.

Se agregó ácido clorhídrico (0.1 ml de 1 N) a un vial que contenía 1 ml de la combinación de lípidos del ejemplo 1 y la combinación se emulsionó fijando el vial tapado en una configuración horizontal a la cabeza de un mezclador tipo vórtex (Scientific Products) y agitando a 2400 oscilaciones/min durante 1 minuto. El resto de la solución de la primera fase acuosa (0.9 ml de manitol al 5% que contenía 10 mg de oligonucleótido antisentido) se agregó al vial y se continuó emulsionando durante 5 minutos.

La emulsión final (2 ml) se dividió y se transfirió a dos viales que contenían 2.5 ml de glucosa al 3.2% y lisina 40 mM. La emulsión se dispersó en gotas microscópicas fijando el vial tapado en una configuración horizontal a la cabeza de un mezclador tipo vórtex durante 3 segundos a aproximadamente 1200 rpm. El contenido de los viales se transfirió a un matraz que contenía 5 ml de glucosa al 3.2% y lisina 40 mM, y el cloroformo se eliminó de las gotas microscópicas o esférulas transfiriendo el matraz a un baño de agua girrotatorio a 37 °C, y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 15 pies cúbicos por hora durante 10 minutos.

Las suspensiones se diluyeron 1:4 con solución salina normal, y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 X g durante 10 minutos. Se extrajo la solución sobrenadante por aspiración, y las partículas se lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal recién preparada y centrifugación. El producto final lavado se resuspendió a una concentración de 25% del volumen de partículas agrupadas por volumen total y se almacenó a 2-8 °C para estudios posteriores.

La recuperación del oligonucleótido encapsulado se determinó diluyendo 1:1 una muestra de la suspensión con 0.1% de SDS, incubando la muestra en un baño de agua en ebullición durante 2 minutos y luego diluyendo la

muestra (típicamente 1/20) en NaOH 0.1 N para la determinación de la absorción UV usando un barrido de longitud de onda desde 320 a 212 nanómetros. La concentración de oligonucleótido en la muestra se calculó sustrayendo el valor de absorbancia medido A320 del valor de absorbancia medido A257. Una muestra de la solución de la primera fase acuosa sirvió como patrón, 17.6 (A257-1 cm) unidades por mg/ml.

5

## 2. Perfiles de liberación *in vitro*

Se determinaron las características de liberación *in vitro* de partículas multivesiculares que contenían oligonucleótidos midiendo la cantidad de oligonucleótidos remanente en la fracción de partículas cuando se incubaron a 37 °C en líquido cefalorraquídeo de ratas. Las muestras almacenadas en solución salina normal se resuspendieron en la solución de almacenamiento y se centrifugaron a 750 X g durante 10 minutos. La solución salina sobrenadante se extrajo por aspiración, y las partículas se resuspendieron en líquido cefalorraquídeo de ratas a concentraciones entre 0.25 y 0.5 mg del oligonucleótido por ml de LCR. Las muestras se incubaron a 37 °C en condiciones estáticas. Después de 0, 1, 2, 3 y 7 días, se retiraron muestras de las suspensiones de partículas/LCR, se diluyeron 10 veces en solución salina, se centrifugaron y el sobrenadante se separó por aspiración de la fracción de partículas. La fracción de partículas se incubó en SDS al 0.1% y se diluyó con NaOH 0.1 N, y se obtuvo un espectro de absorbancia UV del oligonucleótido en el intervalo de 340 a 210 nanómetros. La cantidad de oligonucleótido retenida por la fracción de partículas se determinó como antes.

10

15

20

Como se muestra en la figura 15, la formulación que contenía tricaprilina no liberó más rápidamente *in vitro*, sino más bien tuvo una mayor liberación global; la formulación que contenía trioleína dejó de liberar el fármaco en LCR después de 2.5 días en comparación con la liberación continua por la formulación que contenía tricaprilina.

25

## 3. Farmacocinética *in vivo*

30

30

Cuando las formulaciones de MVL antisentido fabricadas con tricaprilina como lípido neutro se analizaron *in vivo* mediante inyección intratecal en ratas y las muestras de LCR extraídas se examinaron microscópicamente, no hubo partículas evidentes en el LCR después de dos días. Las partículas de MVL fabricadas con trioleína fueron evidentes a los dos días pero tenían un aspecto "encogido". No hubo evidencia de oligonucleótido nativo libre mediante un ensayo de etiquetado del extremo 3'.

35

40

Para mejorar la sensibilidad del ensayo *in vivo* para determinar la concentración del oligonucleótido en el LCR, el oligonucleótido se biotiniló y el oligonucleótido biotinilado se formuló como se describió antes en los MVL que empleaban trioleína o tricaprilina como lípido neutro. Las recuperaciones de oligonucleótido biotinilado encapsulado fueron 78% para los MVL que contenían trioleína y 82% para tricaprilina. Cuando se estudió *in vivo*, el oligonucleótido biotinilado que se encontró libre en el LCR liberado desde los liposomas que contenían tricaprilina, estaba por debajo del límite de detección después de 2 días. El oligonucleótido biotinilado libre estuvo presente en la muestra de LCR de rata 4 días después de la administración de las formulaciones que contenían trioleína en una concentración de aproximadamente 0.5 µM (no se muestran los resultados). Los datos *in vivo* son compatibles con los MVL de tricaprilina que liberan rápidamente el oligonucleótido antisentido *in vivo* y la formulación de trioleína que proporciona una liberación más sostenida de los oligonucleótidos.

### Ejemplo 11

45

MVL que contienen plásmido

#### 1. Fabricación

50

Para la fabricación de liposomas multivesiculares que encapsularan el plásmido PBR322 de *E. coli*, la solución de combinación de lípidos contenía (por litro) 10.4 g de DOPC, 2.1 g de DPPG, 7.7 g de colesterol, 2.16 g de trioleína (PM 885.40) o 1.15 g de tricaprilina (PM 470.7) (relación molar DOPC: DPPG:colesterol:triglicérido, 0.34:0.07:0.52:0.06).

55

60

La solución de la primera fase acuosa contenía (por litro) 42 g de <sup>14</sup>C-sacarosa (0.6 µCi por ml), 100 mmol de lisina, 84 mmol de ácido clorhídrico, pH 7.4 y 20 µg/ml de plásmido PBR322 (Promega, Madison WI). Se preparó una primera emulsión mezclando a alta velocidad 3 ml de la solución de combinación de lípidos con 3 ml de la solución de la fase acuosa a 9000 rpm durante 9 minutos a 25-27 °C. La emulsión se partió en microgotas (esférulas) por adición de 20 ml de una solución de lisina 20 mM y glucosa al 4% al recipiente de mezcla, y después mezclando a 4000 rpm durante 2 min. El cloroformo se eliminó de las gotas microscópicas o esférulas transfiriendo la suspensión a un matraz que contenía 30 ml de solución de lisina 20 mM y glucosa al 4% en un baño de agua girorrotatorio a 37 °C, y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 70 litros por hora durante 20 minutos formar el MVL.

65

Las suspensiones de MVL se diluyeron 1:4 con solución salina normal, y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 X g durante 10 minutos. Se extrajo la solución sobrenadante por aspiración, y las partículas se lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal recién preparada y centrifugación. El producto final

lavado se resuspendió a una concentración de 25% del volumen de partículas agrupadas por volumen total y se almacenó a 2-8 °C para estudios posteriores.

## 2. Perfil de liberación *in vitro*

Los ensayos de liberación *in vitro* se realizaron mediante una dilución 1:2.5 de las suspensiones que contenían los liposomas multivesiculares que encapsulaban el plásmido PBR322 y <sup>14</sup>C-sacarosa, en plasma humano. Estudios previos habían establecido que la liberación de <sup>14</sup>C-sacarosa era un sustituto adecuado para estimar la liberación del plásmido PBR322 desde los MVL. Las suspensiones se incubaron a 37 °C en condiciones estáticas. A los tiempos 0, 1, 2, 3, 6, 10 y 17 días, las muestras se diluyeron 1:4 con solución salina normal, las partículas sedimentaron por centrifugación a 800 X g X 10 min, y la fracción de partículas se analizó disolviendo muestras en una solución de recuento de centelleo y realizando un recuento de centelleo de la cantidad de <sup>14</sup>C-sacarosa retenida por la fracción de partículas.

Los resultados de este estudio que se muestran en la figura 16 indican que la formulación de plásmido PBR322 que usó trioleína como lípido neutro fue estable en condiciones simuladas *in vivo* y liberó aproximadamente el 30% de la <sup>14</sup>C-sacarosa encapsulada en un lapso de 17 días; mientras que, las partículas formuladas con tricapriliina liberaron rápidamente su contenido al entrar en contacto con plasma humano a 37 °C.

## Ejemplo 12

En el ejemplo siguiente se encapsularon sacarosa y lisina-HCl utilizados como excipientes en la formulación de plásmido PBR322 sin principio activo adicional, para producir una familia "sólo de excipiente" de formulaciones graduales de liberación de sacarosa utilizando relaciones molares de tripalmitoleína:tricapriliina como lípido neutro.

### 1. Fabricación

Para la fabricación de liposomas multivesiculares que encapsularan solamente sacarosa-lisina HCl, la solución de la combinación de lípidos contenía (por litro) 10.4 g de DOPC, 2.1 g de DPPG, 7.7 g de colesterol, de 1.9 g y 1.0 g de triglicérido dependiendo de la relación molar entre tripalmitoleína (PM 801, C16: 1 9C): tricapriliina para producir una relación molar de DOPC:DPPG:colesterol:triglicérido de 0.34:0.07:0.52:0.06. Las relaciones molares entre tripalmitoleína y tricapriliina preparadas en las formulaciones de este ejemplo fueron 0:1, 1:0, 1:9, 1:4, 1:2 y 1:1.

La solución de la primera fase acuosa contenía (por litro) 42 g de <sup>14</sup>C-sacarosa (1.0 µCi por ml), 100 mmol de lisina y 90 mmol de ácido clorhídrico, pH 5.7. Se preparó una primera emulsión mezclando a alta velocidad 5 ml de la solución de combinación de lípidos con 5 ml de la solución de la fase acuosa a 9000 rpm durante 9 minutos a 25-27 °C. La emulsión se partió en microgotas (esférulas) por adición de 20 ml de una solución de lisina 20 mM y glucosa al 4% al recipiente de mezcla, y después mezclando a 5000 rpm durante 1.5 min. El cloroformo se eliminó de las gotas microscópicas o esférulas transfiriendo la suspensión a un matraz que contenía 30 ml de lisina 20 mM y solución de glucosa al 4% en un baño de agua girrotatorio a 37 °C y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 70 pies cúbicos por h durante 20 minutos, para obtener las partículas multivesiculares en suspensión.

Las suspensiones se diluyeron 1:4 con solución salina normal, y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 X g durante 10 minutos. Se extrajo la solución sobrenadante por aspiración, y las partículas se lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal recién preparada y centrifugación. El producto final lavado se resuspendió a una concentración de 25% del volumen de partículas agrupadas por volumen total y se almacenó a 2-8 °C para estudios posteriores.

## 2. Perfil de liberación *in vitro*

Los ensayos de liberación "*in vitro*" se realizaron mediante una dilución 1:9 en plasma humano de las suspensiones que contenían liposomas multivesiculares que encapsulaban <sup>14</sup>C-sacarosa. Las suspensiones se incubaron a 37 °C en condiciones de mezcla dinámica suave. A los tiempos 0, 1, 3, 5, 8 y 12 días, las muestras se diluyeron 1:4 con solución salina normal, las partículas se sedimentaron por centrifugación a 800 X g durante 10 min, y se analizó la fracción de partículas disolviendo disolviéndola en una solución de recuento de centelleo y realizando un recuento de centelleo de la cantidad de <sup>14</sup>C-sacarosa retenida en las partículas. Los resultados de estos estudios (Figura 17) muestran que una relación molar 1:1 entre tripalmitoleína y tricapriliina proporcionó una velocidad de liberación algo más lenta que la tripalmitoleína sola. Se obtuvo una familia gradual de velocidades de liberación que tenía una liberación más rápida al aumentar la proporción de tricapriliina en el componente lipídico neutro.

## Ejemplo 13

### Anestésicos

#### 1. Formulaciones de MVL de tetracaína

Para la fabricación de MVL que encapsularan tetracaína, la solución de combinación de lípidos contenía (por ml de cloroformo) 15.6 mg de DOPC, 3.1 mg de DPPG, 11.5 mg de colesterol y 12.6 a 6.6 mg de triglicérido dependiendo de la relación molar de trioleína:tricaprilina. Se encontró que la lipofilidad de la tetracaína necesitaba que la concentración de lípido (68  $\mu\text{mol/ml}$ ) en la combinación de lípidos se aumentara 2 a 1.5 veces más para obtener formulaciones de MVL satisfactorias. El triglicérido también se enriqueció; la relación molar de DOPC:DPPG:colesterol:triglicérido fue 0.29:0.06:0.44:0.21. Las relaciones molares entre trioleína y tricaprilina preparadas en las formulaciones de este ejemplo fueron 1:0; 1:10; 0.5:10; 0.2:10; 0.1:10; 0.05:10 y 0:1. La solución de la primera fase acuosa para encapsulación de la tetracaína contenía (por ml) 15 mg de fosfato de tetracaína y 200 mg de polímero alfa ciclodextrina.

Se agregó una alícuota (1 ml) de la solución de la primera fase acuosa a un vial que contenía 1 ml de la combinación de lípidos y se emulsionó fijando el vial tapado en una configuración horizontal a la cabeza del mezclador tipo vórtex (Scientific Products), y agitando a 2400 oscilaciones/min durante 12 minutos.

La emulsión final (1 ml) se dividió y se transfirió a dos viales que contenían 2.5 ml de una solución de glucosa al 3.2% y lisina 5 mM. La emulsión se dispersó en gotas microscópicas fijando el vial tapado en una configuración horizontal a la cabeza de un mezclador tipo vórtex y agitando durante 3 segundos ajustando a 600-800 oscilaciones/min. El contenido de los viales se transfirió a un matraz que contenía 50 ml de una solución de glucosa al 3.2% y lisina 5 mM, y el cloroformo se eliminó de las gotitas microscópicas o esférulas transfiriendo el matraz a un baño de agua girrotatorio a 37 °C, y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 1 litro por minuto durante 20 minutos.

Las suspensiones se diluyeron 1:4 en volumen con solución salina normal, y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 X g durante 10 minutos. Se extrajo la solución sobrenadante por aspiración, y las partículas se lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal recién preparada y centrifugación.

## 2. Farmacocinética *in vivo*

Se determinaron las características de la liberación *in vivo* de las partículas multivesiculares en ratones BalbC (de 7 a 8 semanas la vida, que pesaban aproximadamente 20 gramos) por inyección subcutánea en la región abdominal (100  $\mu\text{l}$ ). A los tiempos 0, 5 y 24 horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados, se recogió el tejido subcutáneo, se homogeneizó y se extrajo, y los extractos se analizaron por HPLC utilizando detección UV para determinar la cantidad de tetracaína retenida.

La duración de la liberación *in vivo* deseada para la tetracaína desde los MVL era de 24 horas. Se encontró que las formulaciones que contenían sólo trioleína como lípido neutro eran estables *in vivo* y liberaban durante un tiempo muy prolongado.

Al incluir tricaprilina en el componente lipídico neutro, se obtuvieron formulaciones con duración más corta y perfiles farmacocinéticos más deseables (Figura 18). La duración de la liberación deseada de 24 horas para la anestesia fue proporcionada por una formulación con una relación trioleína:tricaprilina 1:100.

La relación entre la elección de lípido neutro y la temperatura de almacenamiento prevista.

Como se muestra en los ejemplos siguientes, el punto de fusión del lípido neutro es una consideración importante en la elección del lípido neutro que modifica la velocidad. Sin embargo, también se deben tener en cuenta otros factores, por ejemplo, la composición de la solución de la primera fase acuosa. La conclusión de estos ejemplos es que el punto de congelación (fusión o nube) del lípido neutro o la mezcla de lípidos neutros debe ser inferior o próximo a la temperatura de almacenamiento para asegurar estabilidad en el almacenamiento. Si las formulaciones se almacenan a temperaturas significativamente inferiores al punto de congelación del lípido neutro o la mezcla de lípidos, las partículas de MVL experimentan una transición física morfológica, que resulta en pérdida de la estructura interna y liberación de los materiales encapsulados. Esta transición puede ocurrir en el correr de unas horas o varios días o semanas, dependiendo de la composición de la primera fase acuosa.

### Ejemplo 14

En el ejemplo siguiente, se fabricaron MVL con tricaprilina o tricaprina como componente lipídico neutro. El punto de congelación de la tricaprilina es 8 °C y de la tricaprina es 31 °C. La primera fase acuosa contenía arabinósido de citosina o sulfato de morfina en HCl 0.1 N. Se almacenaron alícuotas del producto final en solución salina a 2 - 8, 25, 32 y 37 °C. Se determinó la liberación de los materiales encapsulados en el tiempo de almacenamiento.

## 1. Fabricación

Para la fabricación de los MVL, la solución de combinación de lípidos contenía (por litro) 10.4 g de DOPC, 2.1 g de DPPG, 7.7 g de colesterol y el componente triglicérido fue 0.93 g de tricaprilina (C8) o 1.1 g de tricaprina (C10)

(relación molar, 0.34:0.07:0.52:0.06). La solución de la primera fase acuosa contenía (por ml) 20 mg de arabinósido de citosina en HCl 0.1 N o 20 mg de sulfato de morfina pentahidratado en HCl 0.1 N.

5 Para las formulaciones que encapsulaban arabinósido de citosina, la primera emulsión se preparó mezclando a alta velocidad 10 ml de la solución de combinación de lípidos con 10 ml de solución de la fase acuosa a 9000 rpm durante 14 minutos a 25-27 °C con una cuchilla de alto cizallamiento. Para las formulaciones que encapsulaban morfina, la primera emulsión se preparó mezclando a alta velocidad 12.5 ml de la solución de combinación de lípidos con 7.5 ml de la solución de la fase acuosa a 9000 rpm durante 14 minutos a 25-27 °C. Las primeras emulsiones se partieron en microgotas (esférulas) transfiriendo a una cámara de mezcla que contenía 200 ml de solución de lisina 10 40 mM y glucosa al 3.2%, y mezclando a 2100 rpm durante 2.5 min. El cloroformo se eliminó de las gotas microscópicas o esférulas transfiriendo la suspensión a un matraz, colocando el matraz en un baño de agua girorrotatorio a 37 °C y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 70 cfh durante 20 minutos.

15 Las suspensiones se diluyeron 1:4 en volumen con solución salina normal y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 X g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo la solución sobrenadante por aspiración, y las partículas se lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal recién preparada y centrifugación. El producto final lavado se resuspendió a una concentración de 33% del volumen de partículas agrupadas y se almacenó.

20 Se realizó la caracterización de los rendimientos de arabinósido de citosina y morfina libres (sobrenadante) y encapsulados desde las formulaciones de MVL de tricaprilina y tricaprina un par de horas después de la fabricación (Tabla 2). El rendimiento de arabinósido de citosina y morfina encapsulados fue aceptable, y las concentraciones de arabinósido de citosina y morfina libres (sobrenadante) fueron bajas para ambas formulaciones de tricaprilina y de 25 tricaprina.

Tabla 2.

Principio activo de la primera fase acuosa	Lípido neutro	Rendimiento, % del principio activo inicial	Concentración en el almacenamiento mg/ml	Concentración en el sobrenadante mg/ml
Arabinósido de citosina	Tricaprilina	42	7.0	0.3
	Tricaprina	37	6.2	0.2
Sulfato de morfina	Tricaprilina	46	11.2	0.3
	Tricaprina	36	8.9	0.2

## 2. Perfiles de liberación en el almacenamiento

30 Las suspensiones se almacenaron a 2-8, 25, 32 o 37 °C. A los tiempos 24, 48 y 200 horas las suspensiones se centrifugaron a 25 000 X G durante 2 minutos, y las soluciones sobrenadantes se analizaron respecto al contenido de arabinósido de citosina o morfina por dilución 1:1 en volumen con alcohol isopropílico al 50%, mezcla con vórtex, incubación a 37° durante 10 min y centrifugación. Se analizaron las muestras del sobrenadante por dilución en HCl 0.1 N y se midió la concentración de arabinósido de citosina por absorbancia a 280 nm, o dilución en NaOH 0.1 N, y la concentración de morfina se midió por absorbancia a 298 nm.

40 Los resultados de estos estudios del efecto de la temperatura de almacenamiento se muestran en las figuras 19A-D. Las velocidades de liberación desde los MVL que contenían tricaprilina (punto de fusión 8 °C) son muy lentas a 2-8 °C. La velocidad de liberación aumentó al aumentar la temperatura de almacenamiento como podría esperarse como compatible con la aceleración de la liberación con el aumento de la temperatura (Fig. 19A y 19C). Sin embargo, el AraC-MVL que contenía tricaprina (punto de fusión 31 °C), liberó el principio activo a muy alta velocidad cuando se lo almacenó a una temperatura inferior al punto de fusión del triglicérido. Con el almacenamiento de los MVL de tricaprina a temperaturas superiores a 25 °C y 32 °C, la velocidad de liberación disminuyó, pero con el 45 almacenamiento a 37 °C volvió a aumentar (Figura 19B). De hecho, las partículas de AraC-MVL que contenían tricaprina almacenadas a una temperatura inferior al punto de fusión del lípido neutro tricaprina (31 °C), se desestabilizaron completamente liberaron la morfina encapsulada en unas pocas horas (Figura 19B).

50 Los resultados para el almacenamiento de los MVL que contenían arabinósido de citosina se muestran en la figura 20 mediante un gráfico de Arrhenius. La formulación de MVL de tricaprina mostró una relación lineal continua esperada cuando se graficó el log de la velocidad de liberación versus la temperatura, lo que sugiere que un único proceso es responsable de la liberación. Por otra parte, la representación gráfica de los datos para la formulación de tricaprilina fue discontinua, lo que indica que dos procesos son responsables de la liberación en el intervalo de temperaturas estudiado. A temperaturas superiores al punto de congelación de la tricaprina, la pendiente fue la esperada, es decir, las velocidades aumentaron al aumentar la temperatura de almacenamiento. El segundo 55 proceso, el efecto del punto de fusión, se observó por debajo del punto de congelación de la tricaprina donde, la velocidad aparente aumentó al disminuir la temperatura.

Otra vez, la comparación de los perfiles de velocidad de liberación (19A-D) de partículas que tenían arabinósido de citosina encapsulado como componente de la primera fase acuosa con partículas que tenían sulfato de morfina encapsulado indica que el inicio del efecto desestabilizador causado por el almacenamiento de las formulaciones por debajo del punto de fusión del lípido neutro, denominado aquí "el efecto del punto de fusión," depende de la composición de la solución de la primera fase acuosa. Se observó que el inicio del efecto del punto de fusión de los MVL de tricaprina durante el almacenamiento era rápido con las formulaciones que contenían arabinósido de citosina, (Figura 19B) pero necesitó varios días para las formulaciones que contenían sulfato de morfina (Figura 19D). Además, los resultados de estos estudios sugieren que cuanto más por debajo del punto de congelación se almacene la formulación, más rápido es el inicio del efecto del punto de fusión.

#### Ejemplo 15

En este ejemplo, la fase acuosa contenía sacarosa, arabinósido de citosina y HCl 0.1 N como espaciador osmótico. Los MVL se fabricaron con trioleína (pf 8 °C), tricaprina (pf 31 °C) o trilaurina (pf 46 °C) como lípido neutro. El producto final se almacenó a una temperatura de 2-8 °C, 22 o 37 °C, y se registró la liberación de materiales encapsulados durante el tiempo de almacenamiento.

#### 1. Fabricación

Para la fabricación de los MVL que encapsularan arabinósido de citosina con sacarosa como espaciador osmótico en presencia de HCl 0.1 N, la solución de combinación de lípidos contenía (por litro) 10.4 g de DOPC, 2.1 g de DPPG, 7.7 g de colesterol y el componente triglicérido fue 1.1 g de tricaprina (C10), 1.3 g de trilaurina (C12) o 1.7 g de trioleína (la relación molar de DOPC:DPPG:colesterol:triglicérido fue 0.34:0.07:0.52:0.06).

La solución de la primera fase acuosa contenía (por ml) 20 mg de arabinósido de citosina y 51.3 mg de sacarosa en HCl 0.1 N. Se preparó una primera emulsión mezclando a alta velocidad 3 ml de la solución de combinación de lípidos con 3 ml de la solución de la fase acuosa a 9000 rpm durante 8 minutos a 25-27 °C. La emulsión se partió en microgotas (esférulas) por adición de 20 ml de una solución de lisina 20 mM y glucosa al 4% al recipiente de mezcla y mezclando a 5000 rpm durante 1.5 min. Se eliminó el cloroformo de las gotas microscópicas o esférulas transfiriendo la suspensión a un matraz que contenía 70 ml de una solución de lisina 40 mM y glucosa al 3.2%, colocando el matraz en un baño de agua giratorio a 37 °C, y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 70 cfh durante 20 minutos para formar las partículas de MVL en suspensión.

Las suspensiones se diluyeron 1:4 en volumen con solución salina normal, y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 X g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo la solución sobrenadante por aspiración, y las partículas se lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal recién preparada y centrifugación. El producto final lavado se resuspendió a una concentración de 25% del volumen de partículas agrupadas por volumen total y se almacenó a una temperatura de 2-8, 22 y 37 °C durante 1 o 6 días (no se muestran los datos). La suspensión y la fracción sobrenadante obtenidas por centrifugación a 25 000 X G 2 minutos se analizaron respecto al contenido de arabinósido de citosina, por dilución 1:1 en volumen con alcohol isopropílico al 50%, mezcla con vórtex, incubación a 37 °C durante 10 min y centrifugación. Después se agregó 0.06 o 0.2 ml de la muestra a 1.0 ml de HCl 0.1 N, y se midió la concentración de arabinósido de citosina por absorbancia a 280 nm.

Tabla 3.

Componente triglicérido	Temp. de almacenamiento °C	Total de AraC encapsulado mg/ml	Sobrenadante de AraC a las 24 h mg/ml	Relación entre el sobrenadante y el total (Sup/Total)
Trioleína, pf 5 °C	2-8	6.0	0.4	0.06
	22	5.6	0.3	0.05
	37	5.2	0.9	0.17
Trilaurina, pf 46 °C	2-8	3.0	2.5	0.82
	22	3.1	2.0	0.65
	37	3.0	2.3	0.78
Tricaprina, pf 31 °C	2-8	5.6	5.0	0.90
	22	5.4	4.8	0.90
	37	6.7	0.6	0.09

Como muestran los datos de la tabla 3, el rendimiento del producto de los MVL formulados con cada uno de los lípidos neutros fue de al menos 3.0 mg/ml, un rendimiento aceptable. La inspección de las partículas por microscopía con luz blanca mostró que las partículas eran de aspecto esféricas y multivesiculadas inmediatamente después de la fabricación. Sin embargo, dentro de las 24 horas de almacenamiento a temperaturas inferiores al punto de fusión del triglicérido, las partículas cambiaron de aspecto. Asociada al cambio de aspecto fue significativa la pérdida de AraC encapsulado hacia la solución de almacenamiento (sobrenadante) como se puede ver en los datos de la columna 3 de la tabla 3. Es de destacar que, la formulación fabricada con tricaprina (pf 31 °C) no cambio de aspecto, ni perdió AraC de forma significativa cuando se almacenó a 37 °C; mientras que la formulación con trilaurina (pf 46 °C) sufrió un cambio morfológico y una pérdida de principio activo encapsulado significativos. Por lo tanto al formular MVL para la liberación controlada y sostenida *in vivo* del principio activo encapsulado, el lípido neutro elegido debe tener generalmente un punto de fusión inferior o próximo a la temperatura de almacenamiento prevista. Una formulación preferida mantendrá una relación sobrenadante/total menor de 0.10 durante el almacenamiento.

#### 15 Ejemplo 16

Este ejemplo ilustra que ciertas soluciones de la fase acuosa son interactivas con la membrana de la capa lipídica de los MVL y evitan la congelación de los liposomas a temperaturas de almacenamiento inferiores al punto de fusión del lípido neutro. En tales casos, la transición morfológica de las partículas y la pérdida de materiales encapsulados asociadas al almacenamiento a temperaturas inferiores al punto de fusión del lípido neutro pueden ocurrir muy lentamente, o desaparecer. En cambio, la liberación de los materiales encapsulados se asocia a la activación por aumento de la temperatura de almacenamiento.

#### 25 1. Fabricación

Para la fabricación de MVL que encapsularan rhu IGF con <sup>14</sup>C-sacarosa como espaciador osmótico y citrato de amonio como tampón, la solución de combinación de lípidos contenía (por litro) 10.4 g de DOPC, 2.1 g de DPPG, 7.7 g de colesterol y el componente triglicérido fue 1.3 g de tricaprina (pf 31 °C, C10) (la relación molar de DOPC:DPPG:colesterol:triglicérido fue 0.34:0.07:0.52:0.06).

La solución de la primera fase acuosa contenía (por ml) 16 mg de rhu IGF-1 (Chiron, Foster City, CA), 7% de <sup>14</sup>C-sacarosa y citrato de amonio 20 mM, pH 5. Se preparó una primera emulsión mezclando a alta velocidad 5 ml de la solución de combinación de lípidos con 5 ml de la solución de la fase acuosa a 9000 rpm durante 9 minutos a 25-27 °C. La emulsión se partió en microgotas (esférulas) por adición de 30 ml de una solución de lisina 40 mM y glucosa al 4% al recipiente de mezcla y mezclando a 6000 rpm durante 1 minuto. Se eliminó el cloroformo de las gotas microscópicas o esférulas transfiriendo la suspensión a un matraz que contenía 70 ml de una solución de lisina 40 mM y glucosa al 3.2%, colocando el matraz en un baño de agua girrotatorio a 37 °C, y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 70 cfh durante 20 minutos para obtener las partículas de MVL.

Las suspensiones se diluyeron 1:4 con solución salina normal y las partículas se recogieron por centrifugación a 800 X g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo la solución sobrenadante por aspiración, y las partículas se lavaron dos veces por resuspensión en solución salina normal recién preparada y centrifugación.

#### 45 2. Velocidades de liberación *in vitro*

El producto final lavado se resuspendió a una concentración de 25% del volumen de partículas agrupadas por volumen total y se almacenó a una temperatura de 2-8, 25 y 37 °C durante 24 o 48 horas. El sedimento en la fracción sobrenadante de la centrifugación a 25 000 X G durante 2 minutos se analizó para determinar el contenido de IGF-1 (sólo fracción del sedimento) y <sup>14</sup>C-sacarosa.

Tabla 4.

Temperatura, °C	Retenida a las 24 horas		Retenida a las 48 horas	
	<sup>14</sup> C-sacarosa	IGF-1	<sup>14</sup> C-sacarosa	IGF-1
2-8	1.00	1.00	0.98	0.98
25	0.95	0.97	0.91	0.94
32	0.90	0.96	0.74	0.86
37	0.83	0.91	0.56	0.75

Los resultados de estos estudios resumidos en la tabla 4 muestran que el contenido de la solución de la primera fase acuosa puede prevenir o retrasar el efecto de congelación que se mostró en el ejemplo 16 que se va a asociar al almacenamiento de los MVL que contienen trilaurina como lípido neutro a una temperatura inferior a su punto de

fusión de 46 °C. Los lípidos utilizados y el método de fabricación fueron idénticos en ambas formulaciones; no obstante los componentes de la fase acuosa encapsulados fueron diferentes. Esto sugiere que la composición de la primera fase acuosa puede modular el punto de congelación del triglicérido o el efecto del punto de fusión, por ejemplo evitando que el lípido neutro sufra una transición a una estructura inestable o que retrase marcadamente la congelación.

La liberación en el plasma de las formulaciones de MVL que contenían tricaprina o trilaurina (que se muestran en el ejemplo 16) fue notablemente más lenta que la de los MVL fabricados con tricaprilina, como se muestra en la tabla 4 y en ejemplos posteriores. Cabe señalar que todos los ensayos de liberación en plasma realizados a 37 °C se iniciaron dentro de las 24 horas de la fabricación. El almacenamiento a 2-8 °C durante más de unos pocos días de la trilaurina, pero no de las formulaciones que contenían tricaprina, dio lugar a cambios morfológicos en el aspecto de las partículas y liberación de materiales encapsulados compatibles con el "efecto del punto de fusión".

#### Ejemplo 17

##### Otros lípidos neutros

Se realizó una serie de estudios en los cuales los lípidos neutros fueron decano, dodecano, escualeno y alfa-tocoferol para determinar el alcance de los lípidos neutros que se pueden utilizar para obtener formulaciones liposómicas multivesiculares.

##### 1. Fabricación

Se prepararon liposomas multivesiculares que encapsulaban una combinación de glicina, sacarosa y Tris-EDTA en los que la solución de combinación de lípidos contenía (por litro) 10.4 g de DOPC, 2.1 g de DPPG, 7.7 g de colesterol y el componente trioleína (6 mol % de lípido) fue reemplazado con decano, dodecano, escualeno o alfa-tocoferol (la relación molar de DOPC:DPPG:colesterol:lípido neutro fue 0.34:0.07:0.52:0.06).

La solución de la primera fase acuosa contenía glicina 200 mM, sacarosa 50 mM, Tris base 1.8 mM y EDTA 0.5 mM, pH 7.44, con una osmolaridad de 268 mOsmol. Se preparó una primera emulsión mezclando a alta velocidad 3 ml de la solución de combinación de lípidos con 3 ml de la solución de la fase acuosa a 9000 rpm durante 9 minutos a 25-27 °C. La emulsión se partió en microgotas (esférulas) por adición de 20 ml de una solución de lisina 20 mM y glucosa al 4% al recipiente de mezcla y después mezclando a 4000 rpm durante 1.0 min.

El examen microscópico de las suspensiones de esférulas indicó que las esférulas preparadas con cada uno de estos lípidos neutros fueron normales en el aspecto interno en comparación con los controles preparados con trioleína, tripalmitoleína o trimiristoleína como componente lípido neutro.

El cloroformo se eliminó de las gotas microscópicas o esférulas transfiriendo la suspensión a un matraz que contenía 30 ml de una solución de lisina 40 mM y glucosa al 3.2%, colocando el matraz en un baño de agua giratorio a 37 °C y enjuagando la superficie de la suspensión con gas de nitrógeno a una velocidad de flujo de 70 cfh durante 20 minutos, para obtener las partículas de MVL.

Sólo los MVL preparados con escualeno como lípido neutro sobrevivieron al paso de eliminación del solvente o lavado posterior de las partículas y dieron lugar a partículas de MVL de aspecto normal después del paso de lavado. Durante el paso de eliminación del solvente, las esférulas de decano, dodecano y alfa-tocoferol comenzaron a encogerse, con lóbulos de material que refractaba la luz que emanaba de su superficie. Abruptamente, las partículas colapsaron en una estructura almenada. En algunos casos un sedimento, aunque pequeño en comparación con los controles, se recuperó del paso de lavado, y las partículas no tuvieron el aspecto de las composiciones liposómicas multivesiculares.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para modificar la velocidad de liberación de un compuesto biológicamente activo encapsulado en un liposoma multivesicular, donde dicho método comprende utilizar una mezcla de trioleína o tripalmitoleína y un lípido neutro de liberación rápida como el componente lipídico neutro en una formulación multivesicular en la cual está encapsulado un principio activo;
- 10 donde la velocidad de liberación del compuesto biológicamente activo aumenta en proporción con la relación molar entre el lípido neutro de liberación rápida y la trioleína o tripalmitoleína del componente lipídico neutro; y donde el lípido neutro de liberación rápida se elige del grupo que consiste en tricaprilina, tricaproína y sus mezclas;
- 15 donde la velocidad de liberación es *in vivo*, y el componente lipídico neutro tiene un punto de fusión menor o igual a una temperatura *in vivo*, y menor o igual a la temperatura de almacenamiento.
2. El método de la reivindicación 1, donde el lípido neutro de liberación rápida es tricaprilina y la relación molar entre trioleína o tripalmitoleína y tricaprilina se encuentra en el intervalo de 1:1 a 1:100.
3. El método de la reivindicación 1, donde la relación molar entre trioleína o tripalmitoleína y el lípido neutro de liberación rápida se encuentran el intervalo de 1:1 a 1:27.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, donde la liberación es *in vivo*, y el lípido neutro de liberación rápida es tricaprilina.

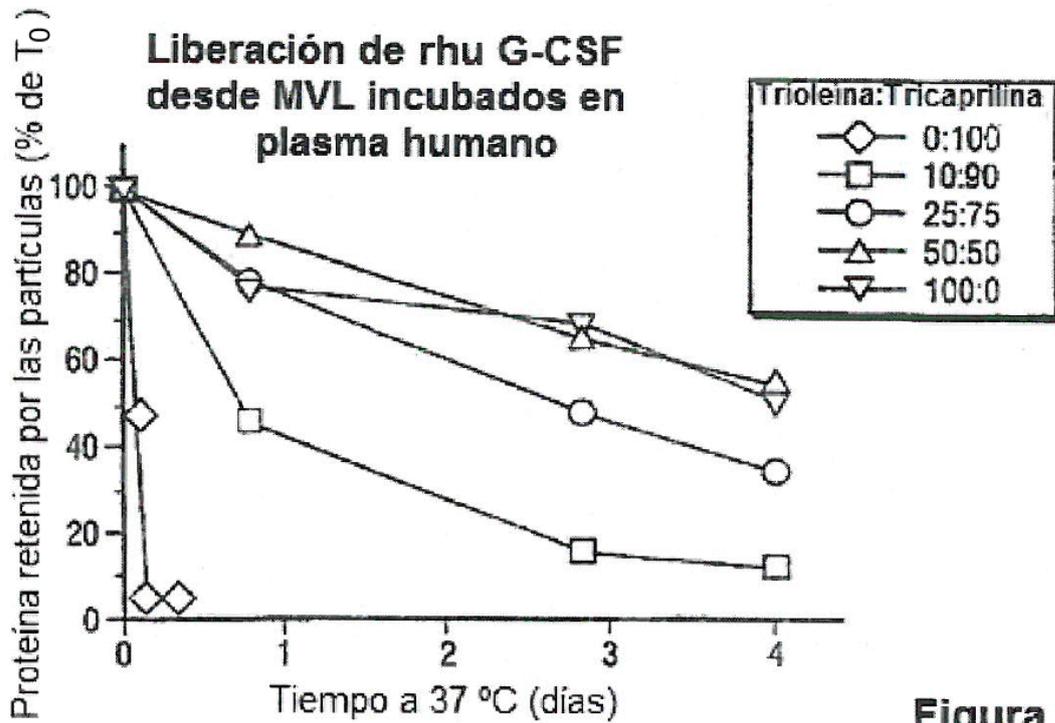


Figura 1

**Formulaciones MVL de lipido neutro de rhu G-CSF en un modelo farmacodinámico en hámster**

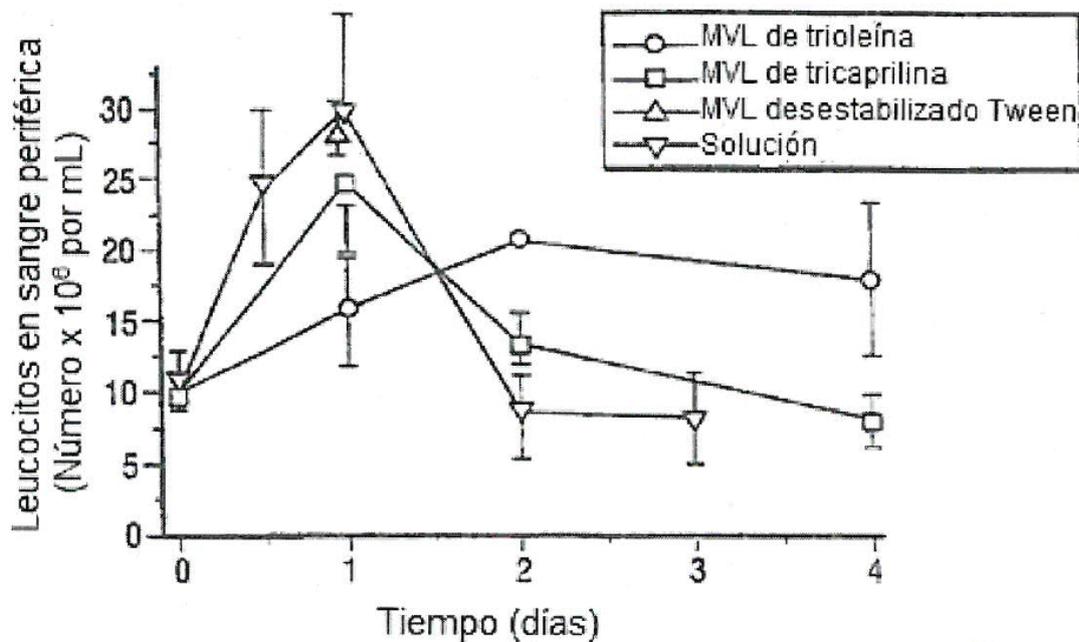


Figura 2

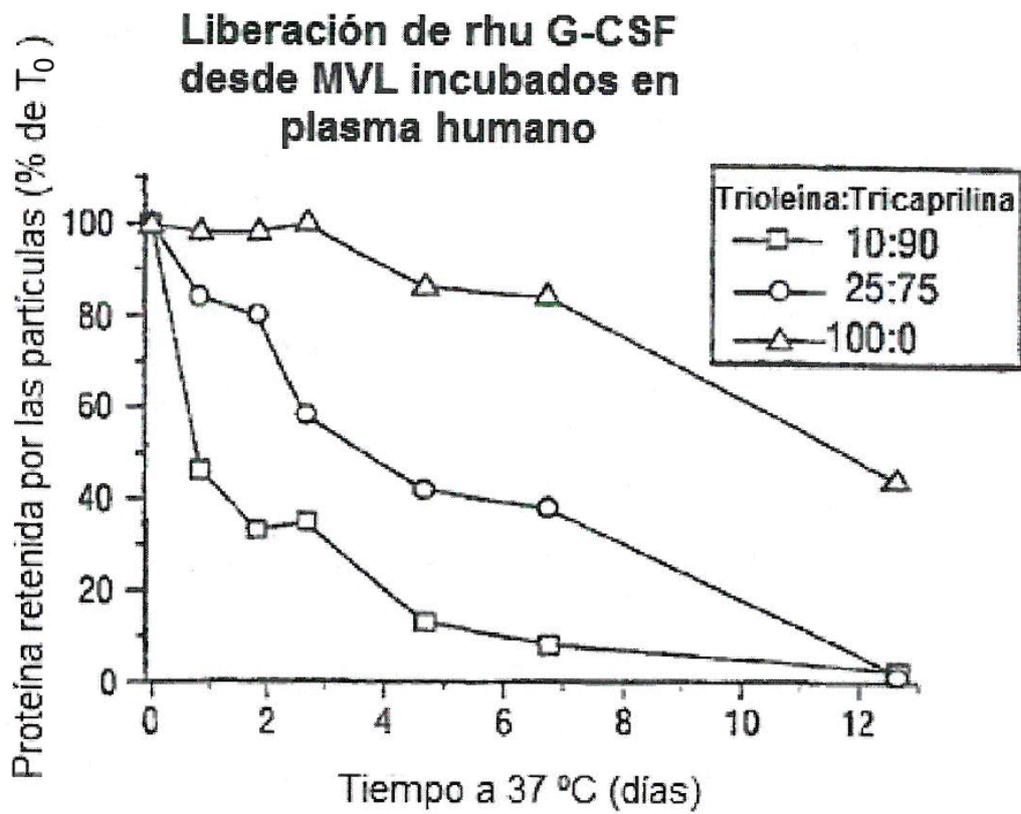


Figura 3

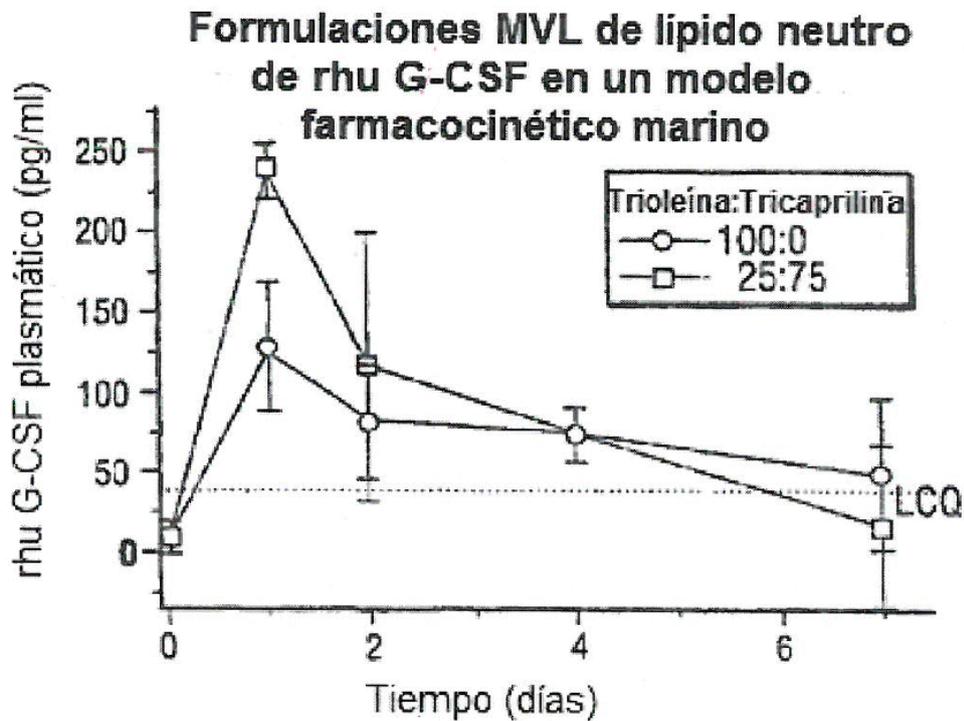
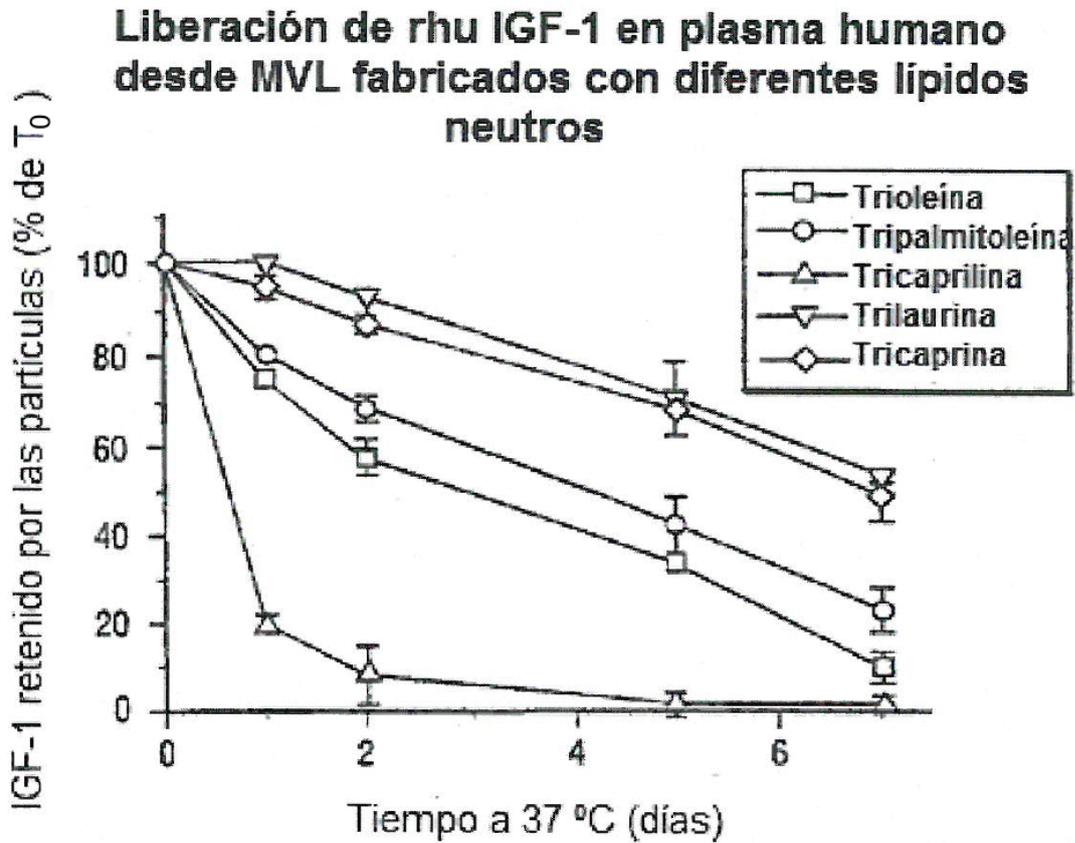
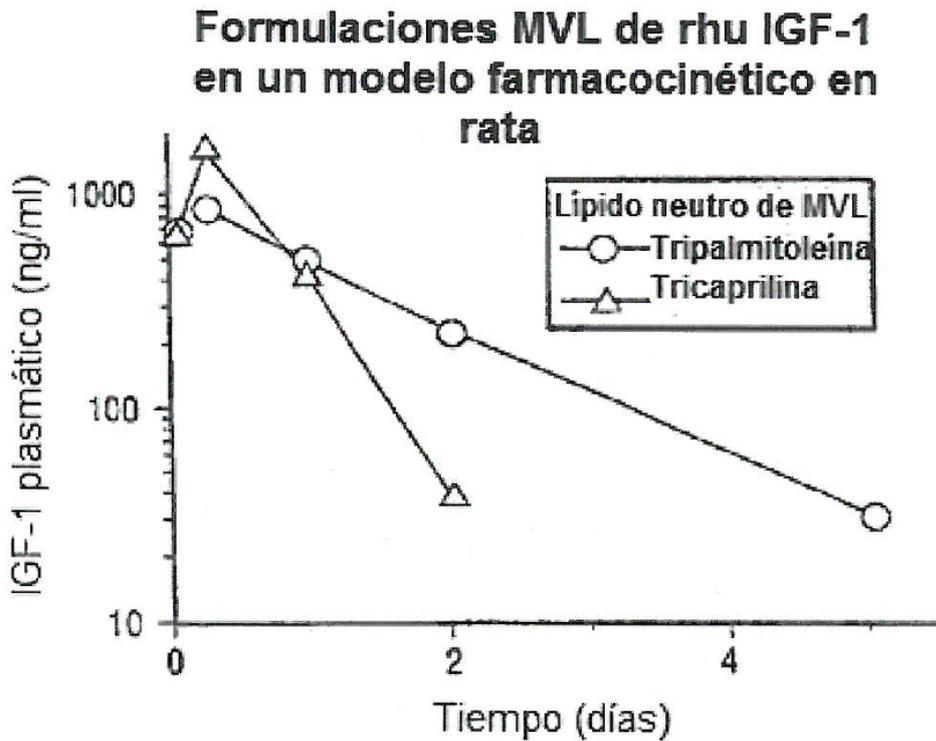


Figura 4

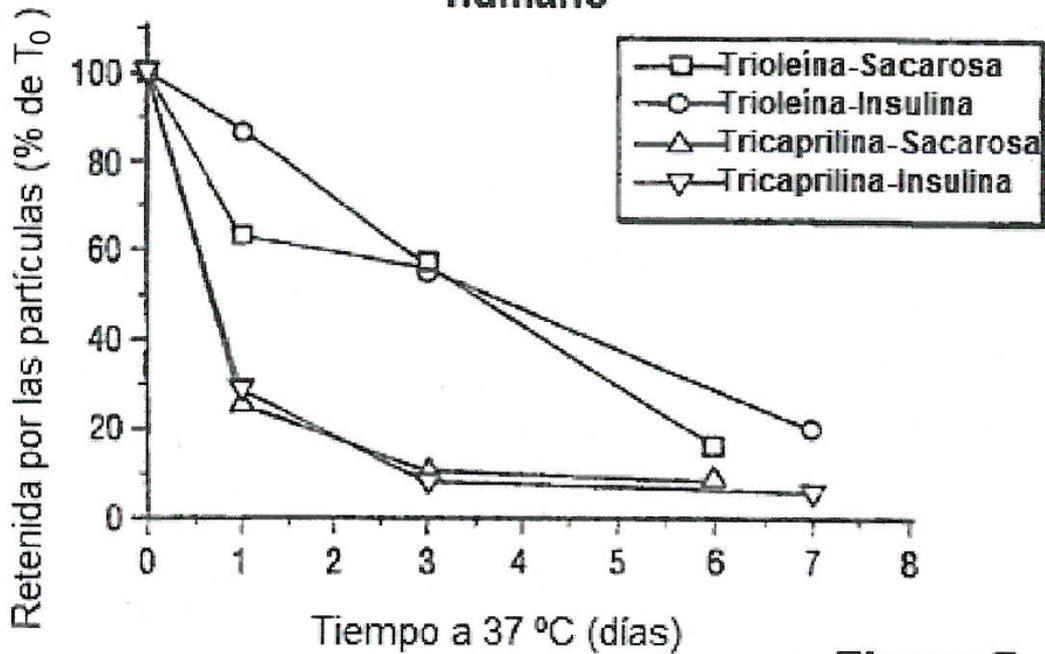


**Figura 5**



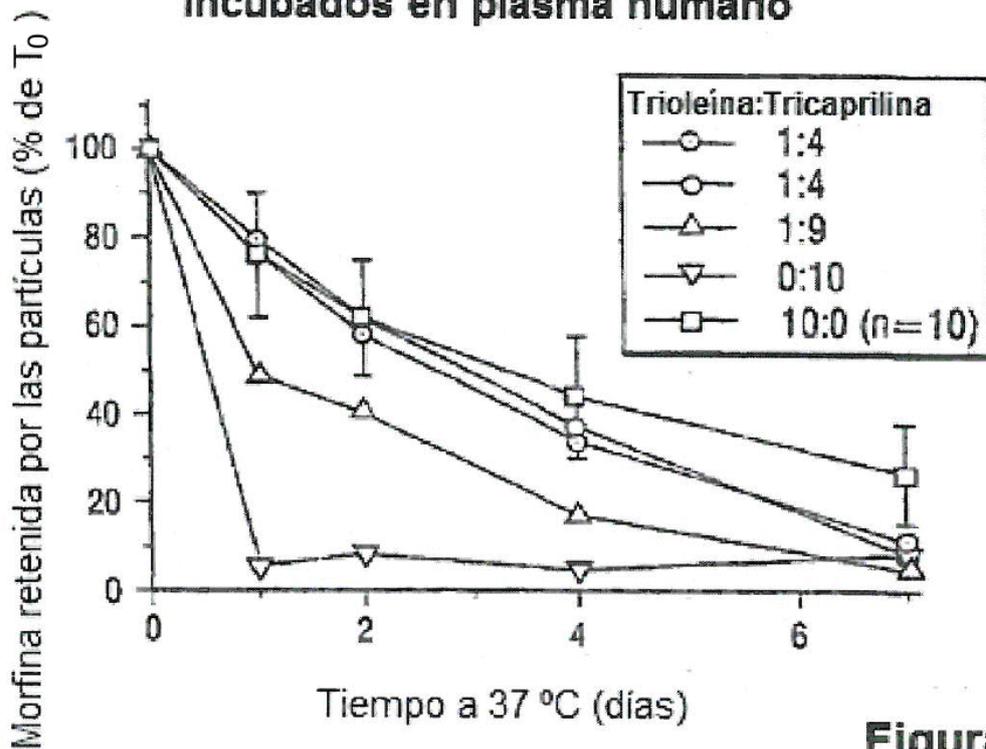
**Figura 6**

**Liberación de rhu insulina (E. coli) y <sup>14</sup>C-sacarosa desde MVL incubados en plasma humano**



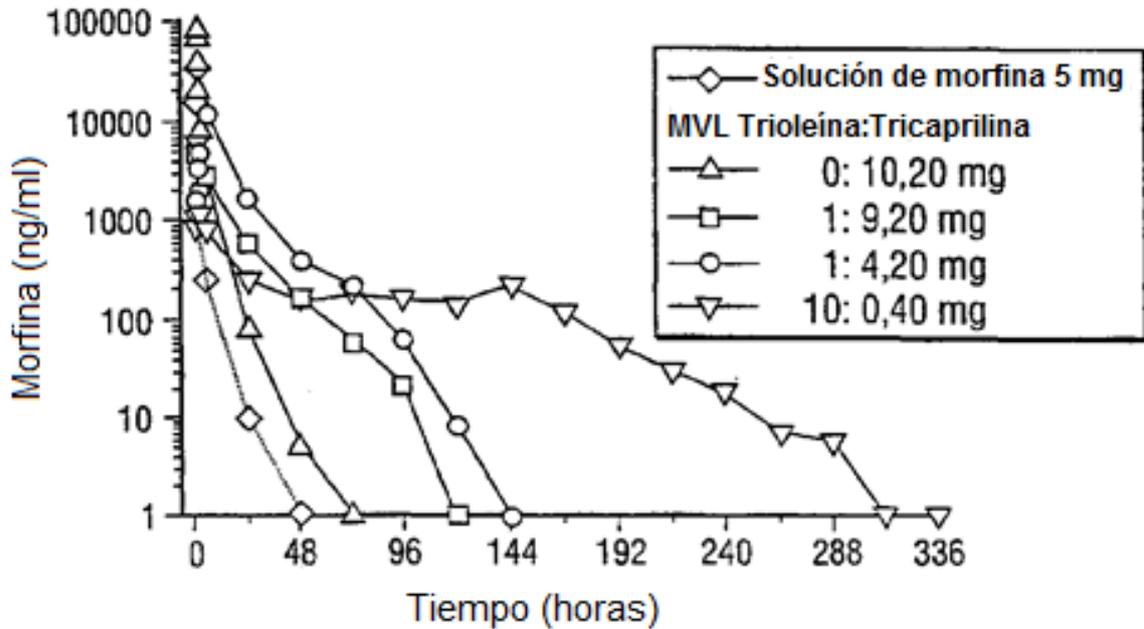
**Figura 7**

**Liberación de Morfina desde MVL incubados en plasma humano**



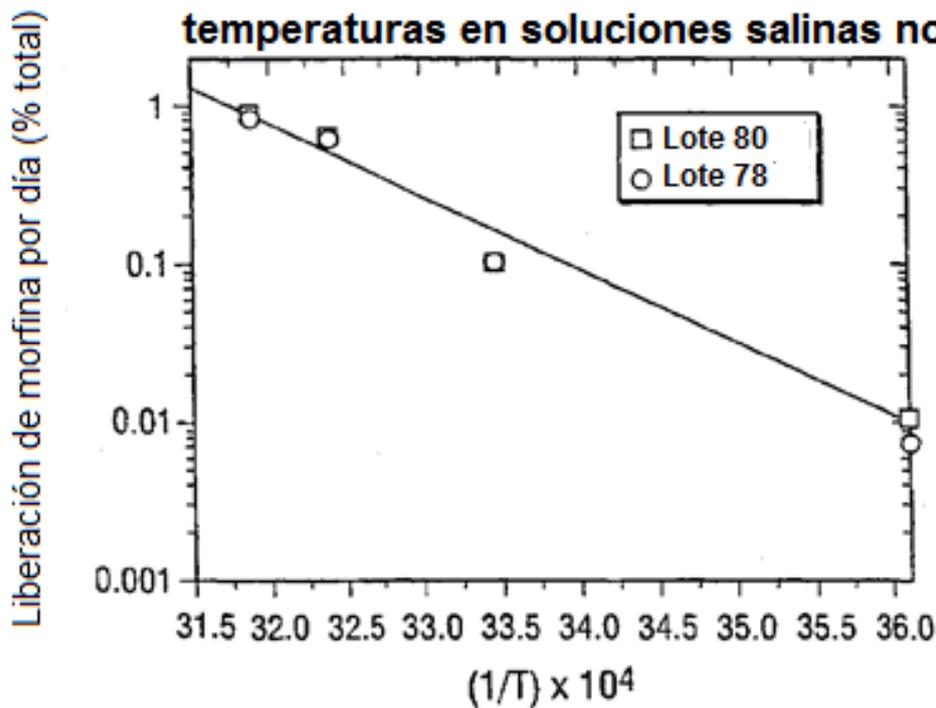
**Figura 8**

**Niveles de morfina en LCR de perro luego de la inyección epidural de sulfato de morfina en formulaciones MVL con diferente lípido neutro**

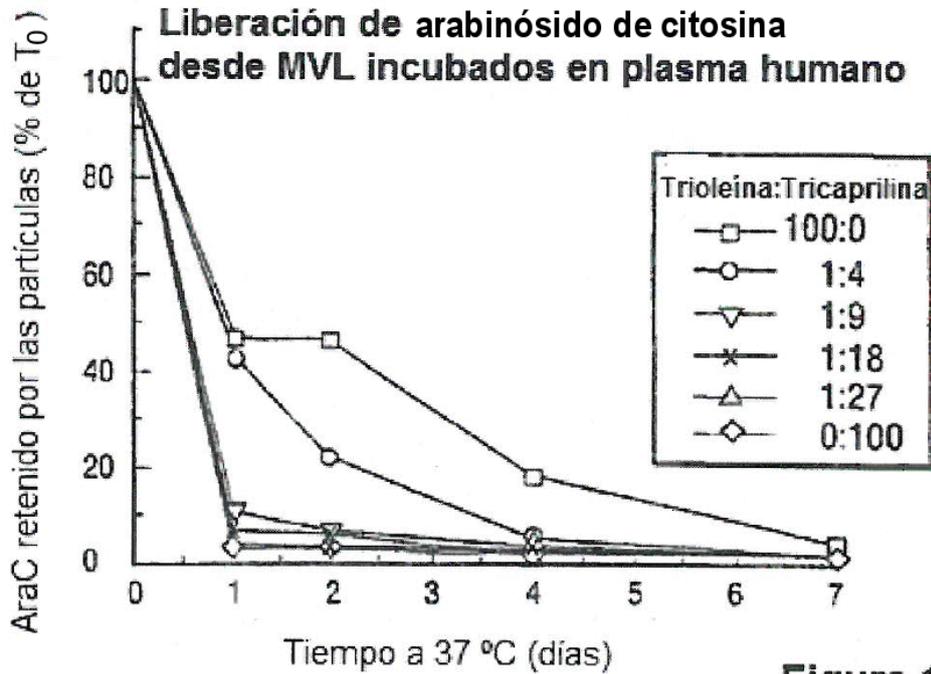


**Figura 9**

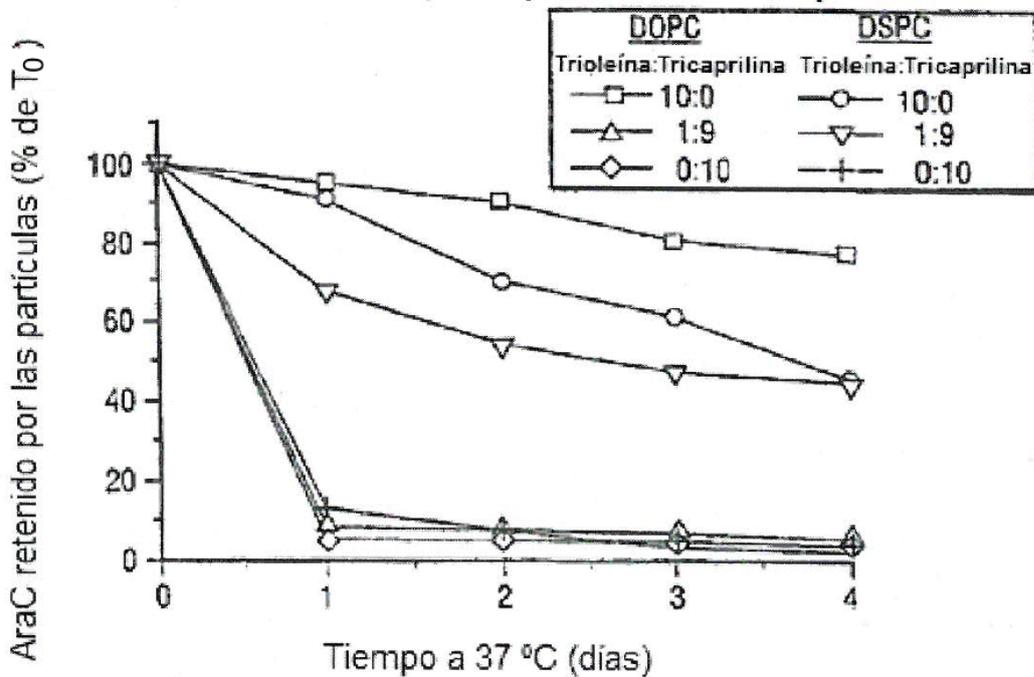
**La velocidad de liberación de morfina desde formulaciones MVL almacenadas a diferentes temperaturas en soluciones salinas normales**



**Figura 10**



**Figura 11**  
**La influencia de la longitud de cadena del fosfolípido en el efecto de lípidos neutros sobre la liberación de arabinósido de citosina (AraC) desde MVL en plasma humano**



**Figura 12**

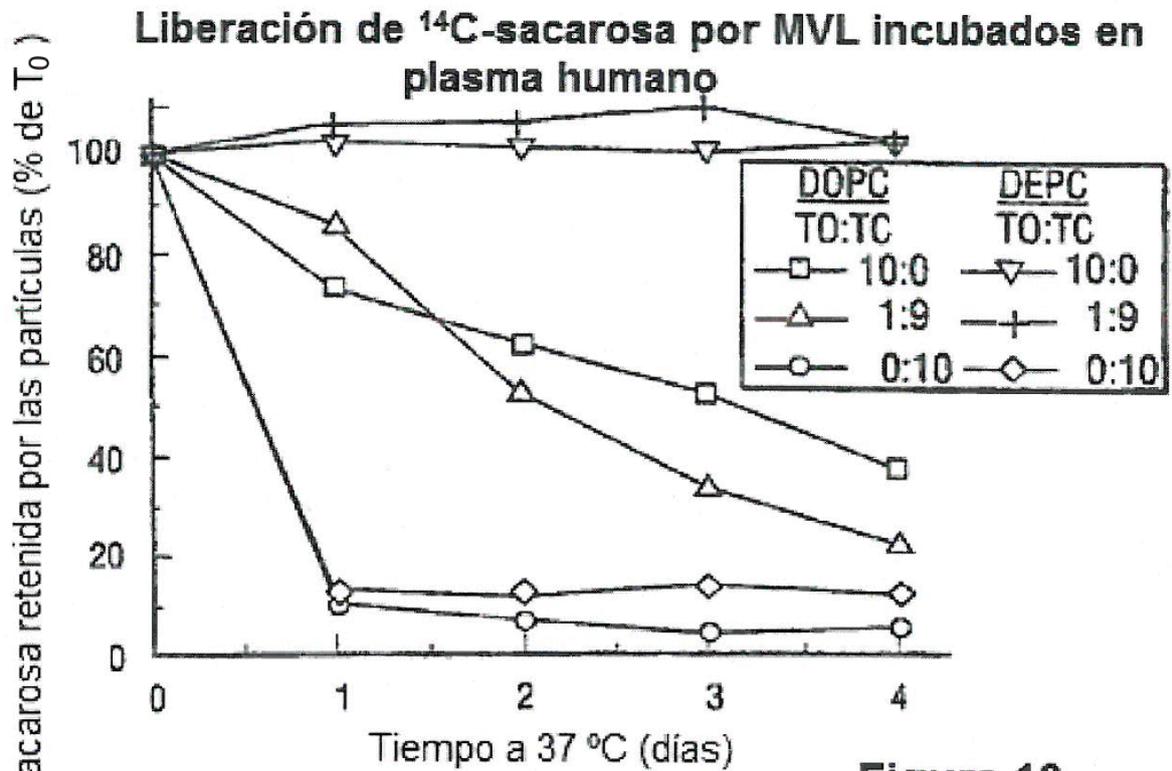


Figura 13

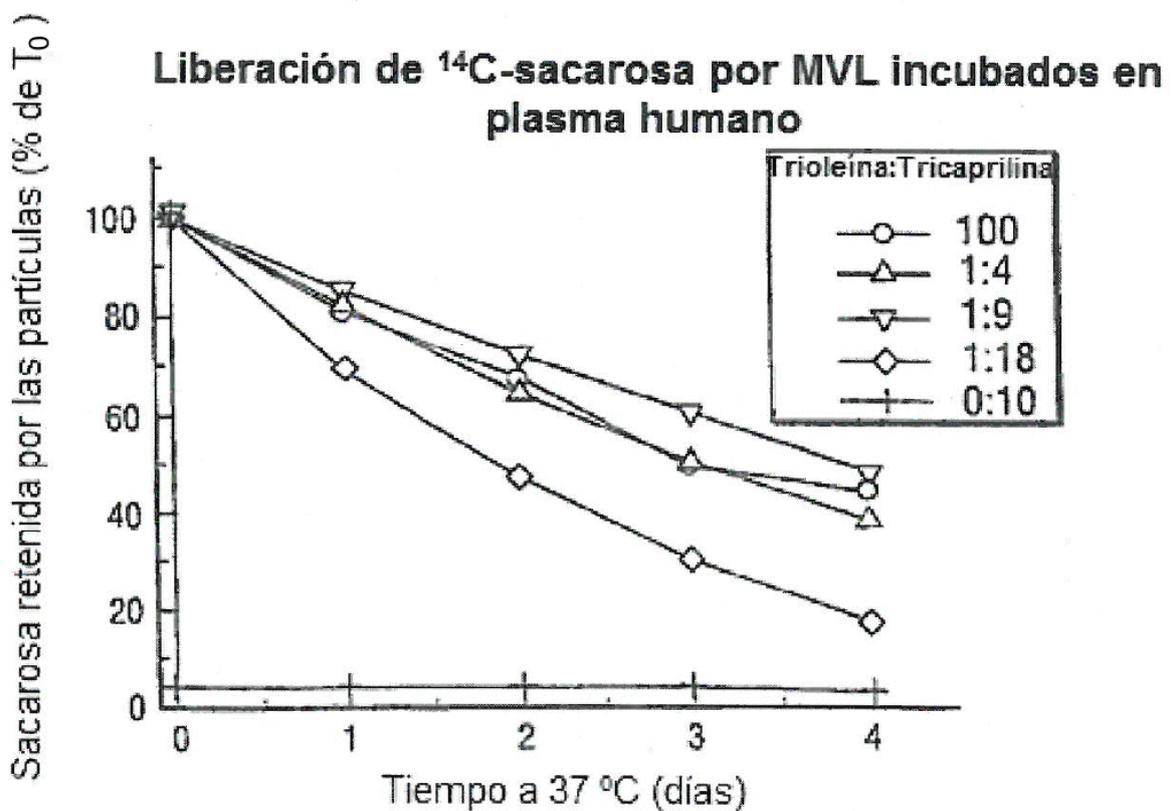
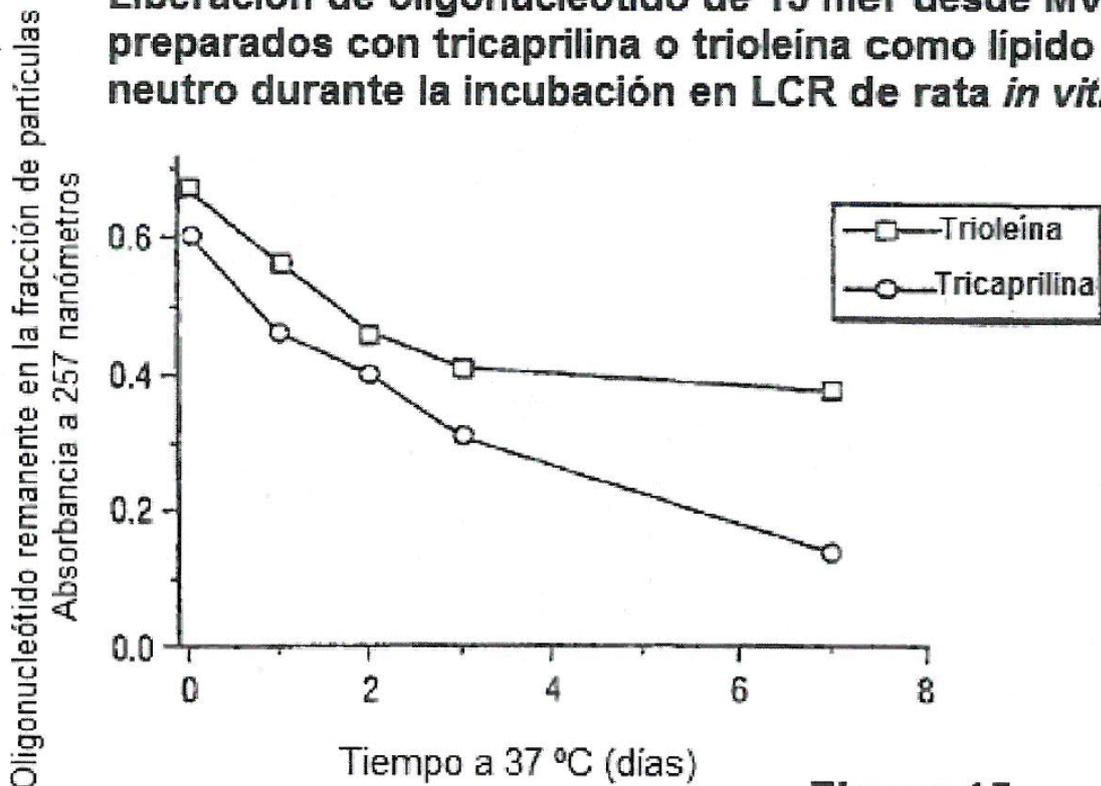


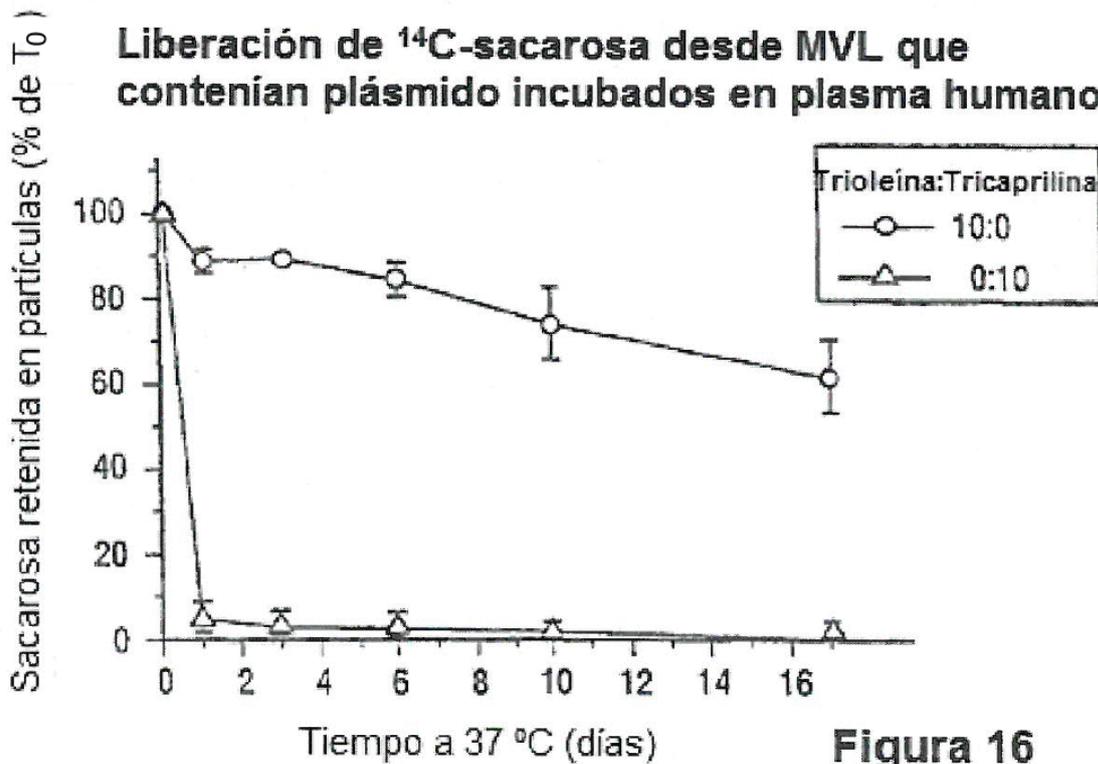
Figura 14

**Liberación de oligonucleótido de 15 mer desde MVL preparados con tricaprilina o trioleína como lípido neutro durante la incubación en LCR de rata *in vitro***



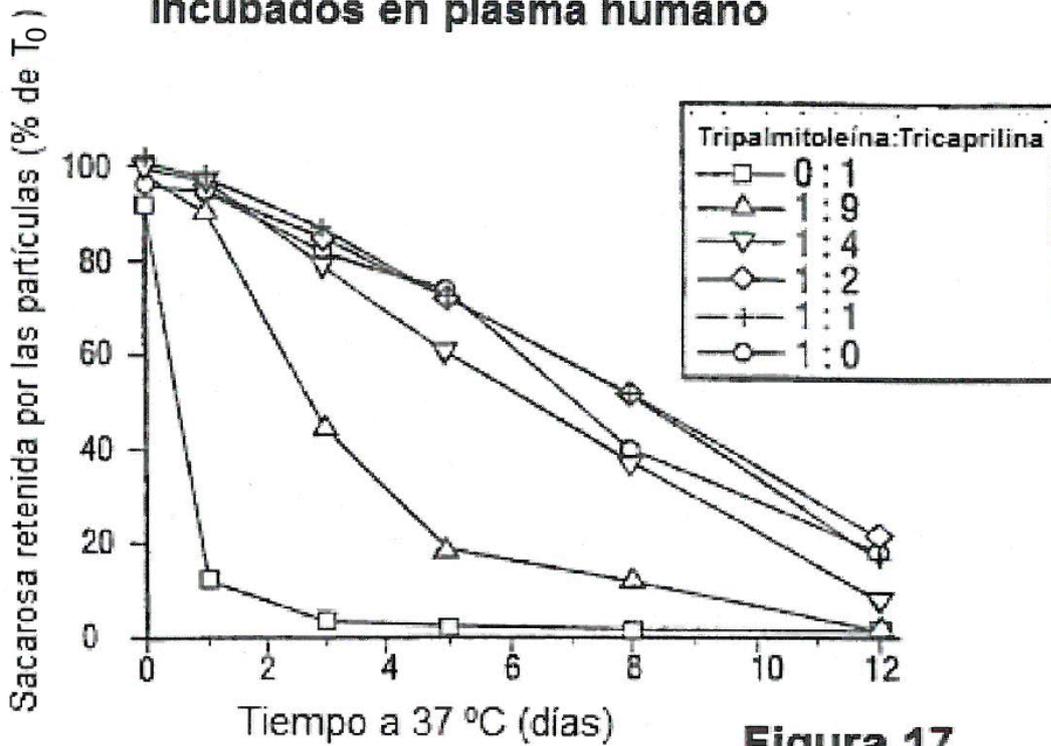
**Figura 15**

**Liberación de <sup>14</sup>C-sacarosa desde MVL que contenían plásmido incubados en plasma humano**



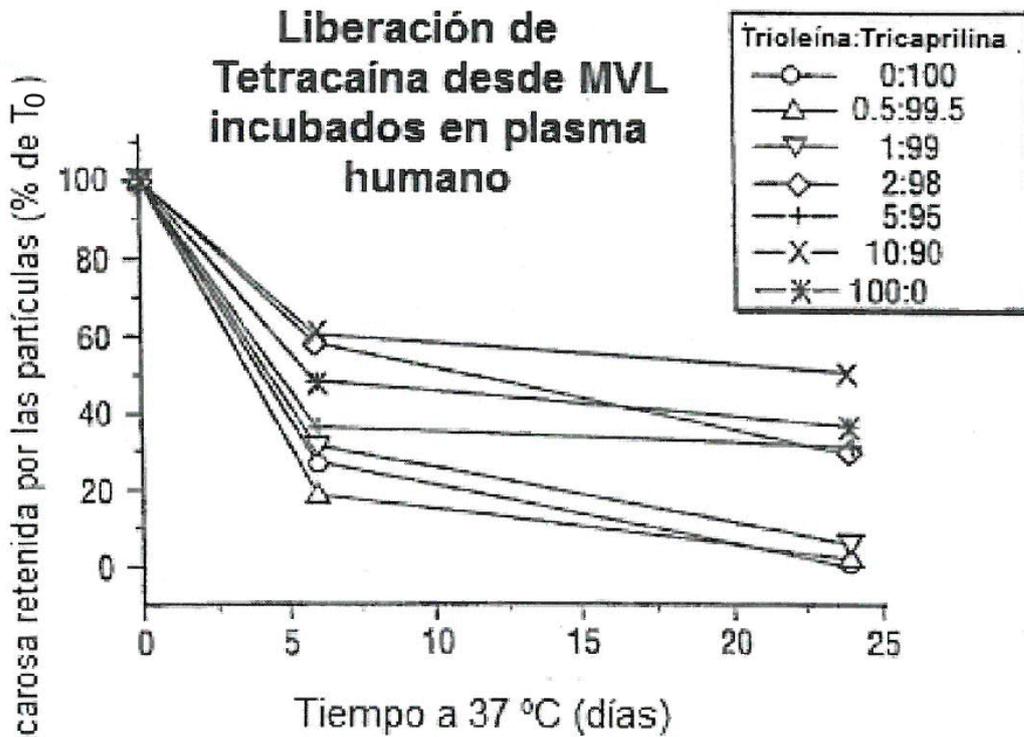
**Figura 16**

**Liberación de <sup>14</sup>C-sacarosa desde MVL incubados en plasma humano**

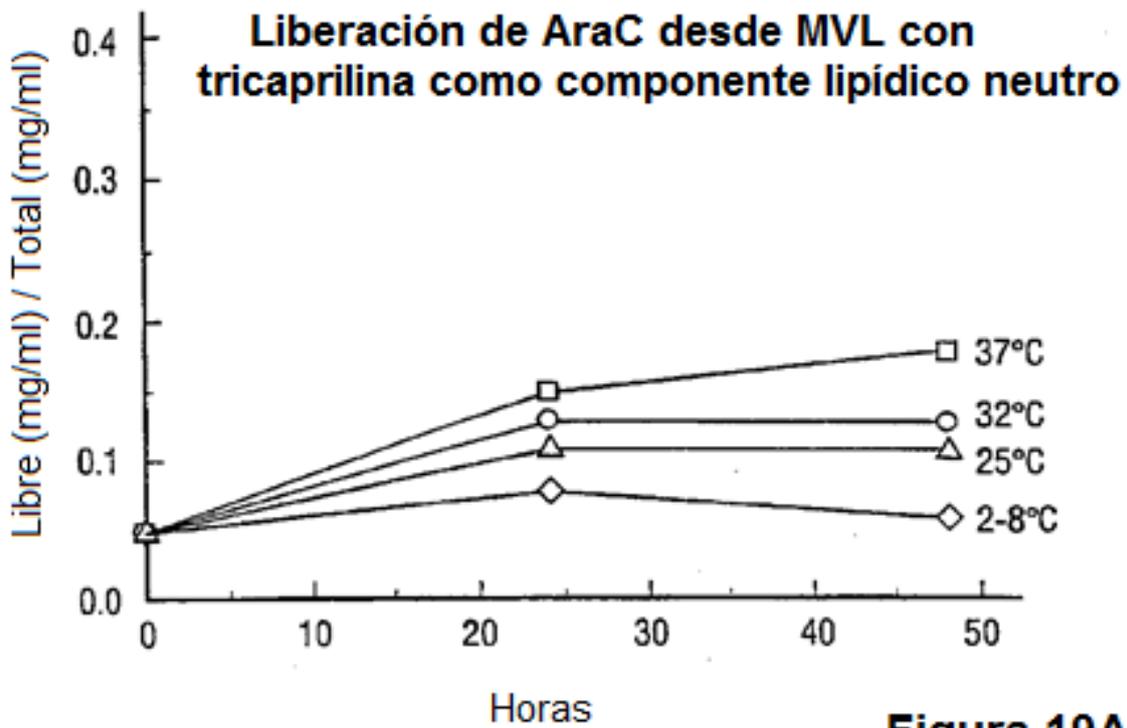


**Figura 17**

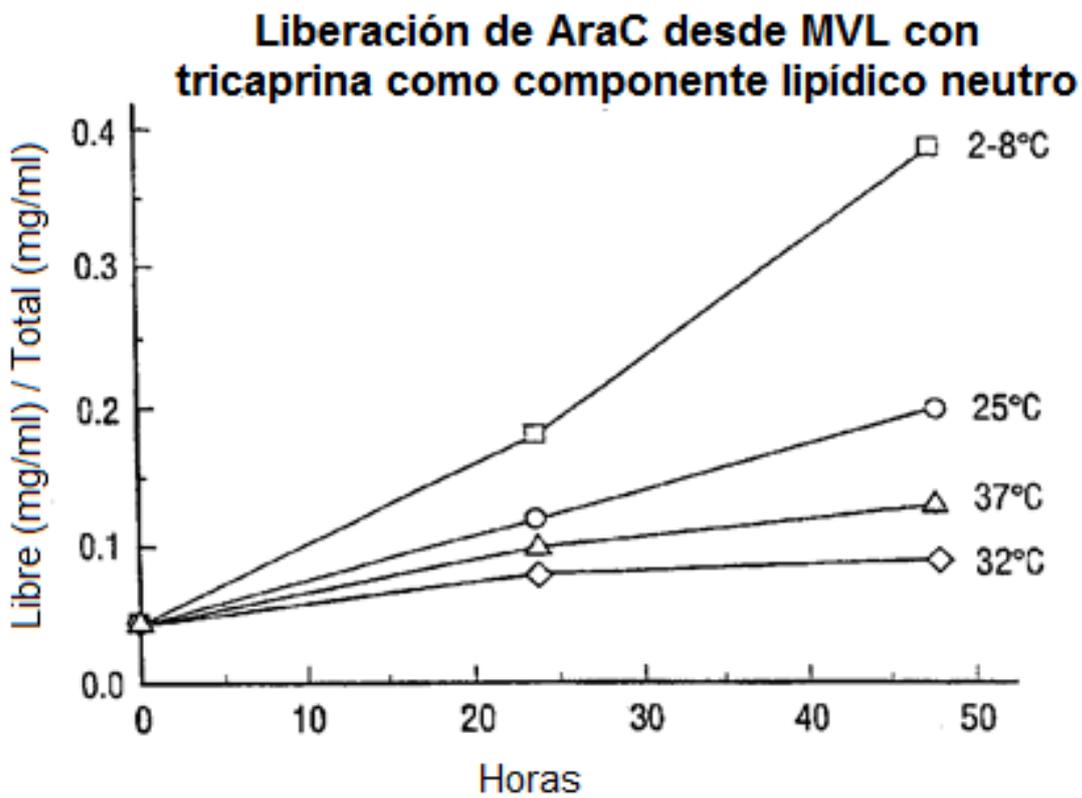
**Liberación de Tetracaína desde MVL incubados en plasma humano**



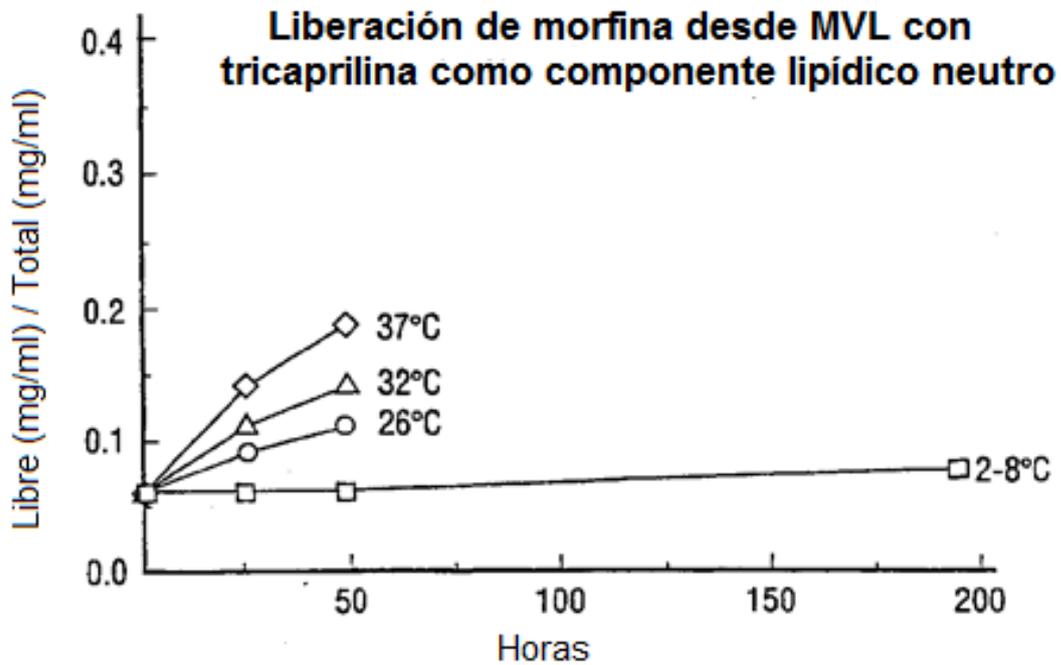
**Figura 18**



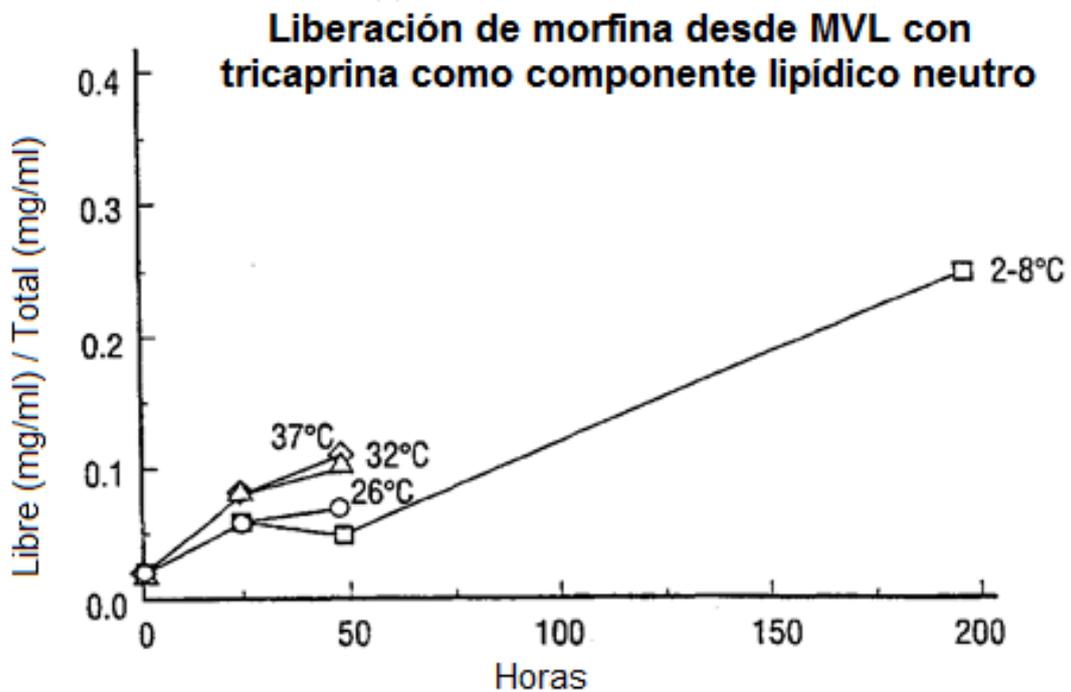
**Figura 19A**



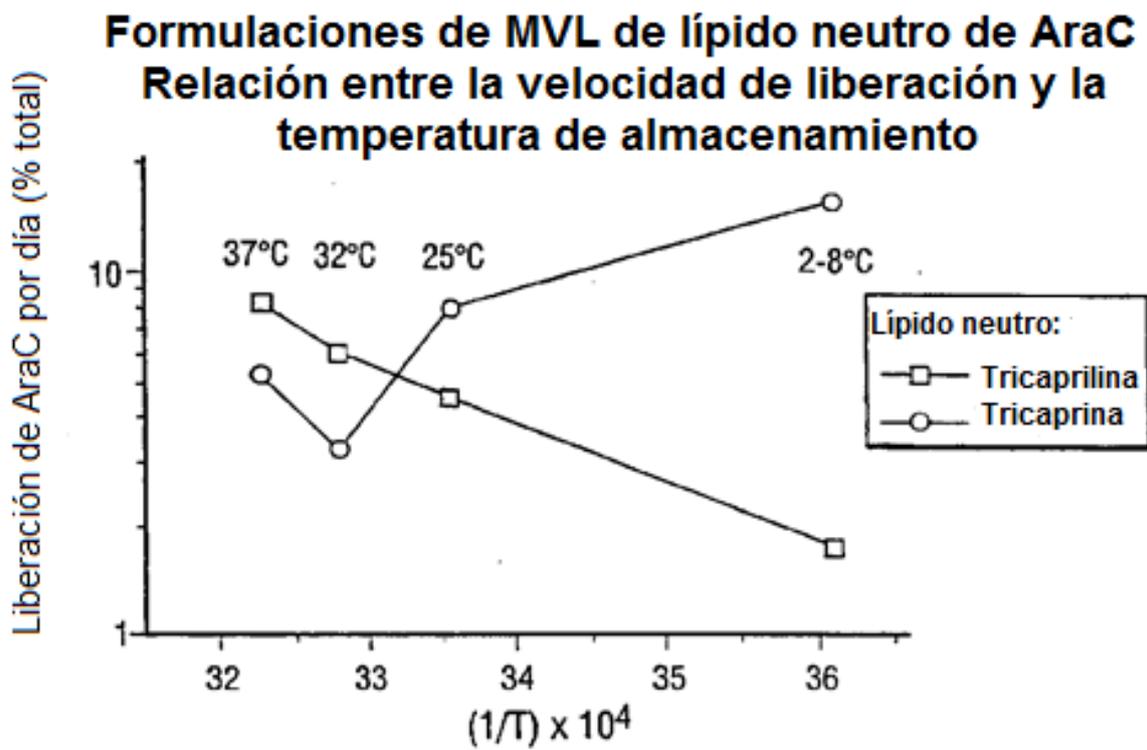
**Figura 19B**



**Figura 19C**



**Figura 19D**



**Figura 20**