

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 583**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 9/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2006 PCT/US2006/032714**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2007 WO07024826**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2006 E 06789920 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 1937214**

54 Título: **Método de almacenamiento de formulaciones de nanopartículas**

30 Prioridad:

**23.08.2005 US 710156 P**

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

**25.10.2016**

73 Titular/es:

**CELSION CORPORATION (100.0%)  
10220 Old Columbia Road, Suite L  
Columbia, MD 21046-1705, US**

72 Inventor/es:

**YU, WEIPING y  
MON, JOHN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 587 583 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 de almacenamiento de formulaciones de nanopartículas

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere generalmente a un método para almacenar nanopartículas. Más particularmente, la invención se refiere a un método para almacenar liposomas que tiene características mejoradas de estabilidad y almacenamiento.

Información de antecedentes

15 Se han usado diversas técnicas convencionales para el almacenamiento de liposomas y nanopartículas, tales como refrigeración, congelación/secado (o liofilización) y deshidratación. En el proceso de liofilización, las cargas de conservación (crioprotectores) tales como azúcares y derivados de azúcar, se pueden usar para mejorar el almacenamiento. Estas cargas de conservación contribuyen, pero no siempre solucionan de forma apropiada los problemas de estabilidad o daño de los liposomas durante los procesos de congelación y descongelación. Existen también limitaciones en cuanto a eficiencia económica y comercial de los procesos actuales ya que la incorporación de dichas cargas de conservación puede conducir un período de caducidad limitado en condiciones de refrigeración o congelación. Además, pueden tener lugar cambios negativos en cuanto a las propiedades biológicas, químicas y/o físicas de los agentes activos encapsulados durante los procesos de congelación, descongelación y/o secado o el proceso de deshidratación asociado a la liofilización. Los procesos actuales de liofilización (los ciclos de congelación y secado) también pueden variar muy lentamente y consumir tiempo. Una cuestión significativa es que si la liofilización se lleva a cabo demasiado rápido, o a temperatura no controlada, puede tener como resultado cambios en las propiedades biológicas, químicas y físicas de la membrana de liposomas dando como resultado inestabilidad durante el almacenamiento. Finalmente, esto puede afectar de manera negativa a las propiedades del agente activo encapsulado.

20 Durante los procesos de congelación convencionales, usados solos o en combinación con otros procesos, se puede provocar daño, por ejemplo, por medio de tensión mecánica debido a la elevada presión como resultado de que las membranas de las vesículas de los liposomas están expuestas a la formación de cristales de hielo o mediante expansión y contracción de los solutos dentro de los liposomas durante la congelación, descongelación y/o deshidratación. La expansión de la membrana de los liposomas durante un ciclo de congelación puede provocar debilidad y formación de fistulas y fisuras en la membrana liposómica, lo cual, a su vez, puede tener como resultado la pérdida de integridad y estabilidad conduciendo a problemas de fugas. Además, los liposomas individuales normalmente tienen forma de manojos cerrados unos con respecto a otros, de manera que durante la congelación convencional, la expansión de un liposoma puede provocar presión, lo cual tiene como resultado consecuencias adversas para la integridad de los liposomas adyacentes.

25 Van Bommel et al presentan la estabilidad de doxorubicina-liposomas durante el almacenamiento en forma de dispersión acuosa, congelada o congelada-secada (Van Bommel, Crommelin; International Journal of Pharmaceutics, 22 (1984) 299-310).

30 Generalmente, las tecnologías existentes tienen sus propias limitaciones con respecto al período de caducidad, almacenamiento, manipulación y propiedades de atrapamiento de los liposomas, así como también a la capacidad de mantener la integridad de (i) la composición de liposomas o nanopartículas; y (ii) el agente activo. Además, muchas de las tecnologías presentan limitaciones adicionales debido a la duración de tiempo necesario para llevar a cabo los procesos, y el tamaño resultante de los lotes de producción del proceso, que se suman a los costes totales.

Sumario de la invención

35 La presente invención es un método para almacenar una formulación líquida liposómica en suspensión que tiene: al menos un fosfolípido, al menos un tensioactivo, al menos un polímero hidrófilo y un agente activo, en el que: el fosfolípido es al menos una fosfatidil colina; el tensioactivo es al menos un lisolípido; y el polímero hidrófilo se escoge entre DSPE-mPEG-2000, DSPE-mPEG-5000 y sus mezclas, que comprende congelar dicha formulación y almacenar la formulación congelada durante un período de al menos un mes.

60 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una preparación liposómica tras congelación y descongelación de acuerdo con la presente invención.

65

## Descripción de la invención

A continuación se comentan realizaciones de la invención. En la descripción de las realizaciones, la terminología específica se emplea por cuestiones de claridad. No obstante, no se pretende que la invención se limite a la terminología específica a seleccionar. Mientras que se comentan realizaciones específicas a modo de ejemplo, debería comprenderse que esto se hace con fines únicamente de ilustración.

Según se usa en la presente memoria, las nanopartículas se pueden definir generalmente como vesículas esféricas que tienen una capa externa o membrana formada por un anfífilo, es decir, un componente que tiene una parte hidrófila y una parte hidrófoba, que rodea a un núcleo interno. En general, las dimensiones de las nanopartículas son menores de aproximadamente 1000 nm. De particular interés con respecto a la presente invención son las nanopartículas que se pueden usar en o como sistema de administración de fármacos. Por ejemplo, las nanopartículas útiles en la presente invención se pueden usar para encapsular compuestos para la administración de un sistema biológico que incluye, pero sin limitarse a, (i) compuestos biológicamente activos, tales como un fármaco; o (ii) compuestos no biológicamente activos, tales como un agente de formación de imágenes. Los liposomas son un tipo de nanopartícula a modo de ejemplo que se puede usar con la presente invención. Los liposomas son vesículas que incluyen una bicapa lipídica que rodea a un núcleo acuoso, y que también son capaces de encapsular compuestos biológicamente activos y no biológicamente activos. La presente invención mejora y protege la integridad de la membrana liposómica o de la nanopartícula frente al daño provocado por diversas tensiones tales como congelación, descongelación y agitación. De este modo, la invención mejora las características de estabilidad, almacenamiento y/o período de caducidad de las nanopartículas, tales como liposomas. Según se usa en la presente memoria, la congelación puede ser a cualquier temperatura, generalmente menor de 0 °C, que proporcione un estado sólido, por ejemplo, de aproximadamente -20 °C o menos, aproximadamente -78 °C o menos (es decir, temperaturas de hielo seco), o de aproximadamente -196 °C o menos (es decir, temperaturas de nitrógeno líquido).

Las composiciones de diversos liposomas y otras formulaciones de nanopartículas se conocen bien en la técnica y se usan comercialmente para fines médicos, cosméticos y otros. Las formulaciones liposómicas son combinaciones de diversos lípidos en diferentes relaciones molares, así como otros constituyentes incluyendo, pero sin limitarse, restos de fijación de objetivo y sustancias biológicamente activas. Los procesos de producción de liposomas se conocen de forma general. Los liposomas se pueden preparar de diversos tamaños, por ejemplo, de menos de 20 nm a más de 500 nm de diámetro; y pueden ser vesículas unilamelares o multilamelares. Se pueden usar para encapsular diversas sustancias usadas con fines médicos y no médicos. Los liposomas se pueden usar para atrapar agentes activos tales como agentes farmacológicamente activos, agentes de aroma, agentes diagnósticos, agentes nutricionales, productos genéticos, productos no biológicamente activos tales como agentes de formación de imágenes, y sus mezclas, y para administrar estos agentes a puntos específicos. No obstante, un problema principal con las formulaciones liposómicas ha sido la capacidad de almacenamiento para con fines de investigación o comerciales sin degradación de los lípidos y/o liberación de los agentes activos (por ejemplo, el período de caducidad). De este modo, la estabilidad de las vesículas con respecto a la fuga y degradación del liposoma con el tiempo constituye un problema principal.

Una realización de la invención se refiere al almacenamiento de una formulación de nanopartículas, por ejemplo una formulación liposómica, pero puede resultar aplicable a otros tipos de nanopartículas formadas por anfífilos tales como lípidos. Las formulaciones apropiadas para su uso en la presente invención incluyen nanopartículas que tienen componentes de membrana que incluyen al menos un anfífilo, al menos un tensioactivo, y al menos un polímero hidrófilo. El polímero hidrófilo puede ser no modificado; modificado mediante la adición de grupos funcionales asociados con la membrana de la nanopartícula; o químicamente ligado a un anfífilo, tensioactivo u otro componente de la membrana de la nanopartícula. Un ejemplo de una modificación para asociar un polímero hidrófilo con la membrana de nanopartícula puede incluir la adición de un grupo funcional polar o formador de carga para producir una asociación más intensa con el grupo polar del tensioactivo o anfífilo formador de membrana. El polímero hidrófilo puede, de forma alternativa, unirse covalentemente, al tensioactivo o anfífilo formador de membrana de forma que esté presente sobre la superficie de la nanopartícula o liposoma para proteger y mantener su integridad, o se puede incorporar a la capa lipídica interna del liposoma o formulación de nanopartícula. El polímero hidrófilo se puede unir al anfífilo o tensioactivo a través de un enlace hidrolizable o biodegradable tal como, por ejemplo, un enlace amida o éster, o a través de un enlace más estable tal como enlaces de amina o éter.

Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se piensa que el polímero hidrófilo permite la protección de la integridad de la membrana liposómica o de nanopartículas durante los procesos de congelación, refrigeración, liofilización, deshidratación y/o rehidratación. La protección de la integridad de las membranas liposómicas o de nanopartículas conserva las propiedades físicas, químicas y biológicas de las nanopartículas y la formulación liposómica, y también mantiene las propiedades de cualquier compuesto atrapado o encapsulado dentro del liposoma o la nanopartícula. De este modo, la formulación liposómica o de nanopartículas conserva los encapsulados atrapados para usos médicos, veterinarios y no médicos tales como, pero no de forma limitativa, las técnicas de biotecnología, electrónica, defensa y agrícola y permite el almacenamiento y transporte de las formulaciones liposómicas en estado congelado.

La relación de anfífilo con respecto a tensioactivo es variable y puede ser cualquier relación que resulte apropiada para el uso pretendido del liposoma o la nanopartícula. Se reconoce que tanto el anfífilo como el tensioactivo pueden tener propiedades anfífilas y tensioactivas; no obstante, cuando ambos componentes tienen propiedades similares, para los fines de la presente memoria descriptiva, el anfífilo se puede considerar como el componente de membrana principal, al tiempo que el tensioactivo es el componente secundario. De este modo, la relación de anfífilo con respecto a tensioactivo es de al menos aproximadamente 51:49 y puede ser tan grande como 99:1. En las realizaciones a modo de ejemplo, la relación de anfífilo:tensioactivo es de al menos aproximadamente 70:30 y puede ser de aproximadamente 80:20 a 90:10. Como se sabe en la técnica, la adición de tensioactivo puede provocar variaciones en las propiedades físicas o químicas de la nanopartícula o liposoma para lograr cierta propiedad deseable tal como una reducción en la temperatura de transición de fase o la permeabilidad de la membrana. Dichas variaciones en la composición de la nanopartícula se encuentran dentro del alcance de la invención.

El polímero hidrófilo puede estar presente en la membrana de una nanopartícula o liposoma en cantidades variables que varían de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 por ciento en moles, basado en la cantidad total de anfífilo y tensioactivo. En realizaciones en las que el polímero hidrófilo está ligado a un fosfolípido formador de liposomas que contiene aproximadamente 75-90 % en peso de polímero hidrófilo y 25-10 % en peso de lípidos, esto corresponde de aproximadamente 0,11 a aproximadamente 33 por ciento en moles de fosfolípido modificado con polímero hidrófilo. Como se aprecia por parte de los expertos en la técnica, el porcentaje en moles de conversión de polímero hidrófilo con respecto a porcentaje en moles de anfífilo modificado depende del peso molecular del anfífilo no modificado y del peso molecular del polímero hidrófilo. El cálculo de las relaciones se encuentra dentro del ámbito de las personas expertas en la técnica. Las realizaciones de la invención pueden incluir de aproximadamente 3 a 20 por ciento en moles de polímero hidrófilo (por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 27 por ciento en moles de anfífilo modificado) o de 3 a 10 por ciento en moles de polímero hidrófilo (por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 13 por ciento en moles de anfífilo modificado). Determinadas realizaciones de la invención se preparan a partir de aproximadamente 4 a aproximadamente 5 por ciento en moles de anfífilo modificado, proporcionando de este modo de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,5 por ciento en moles de polímero hidrófilo. La cantidad óptima de polímero hidrófilo se puede determinar fácilmente a través de experimentación rutinaria por parte de las personas expertas en la técnica.

Las composiciones y métodos de la invención pueden ser eficaces con nanopartículas y liposomas preparados a partir de una variedad de composiciones que incluyen, pero no de forma limitativa, fosfolípidos, lípidos de soja, fosfoetanolamina, colesterol, lisolípidos, tensioactivos, y sus mezclas, en combinación con al menos un polímero hidrófilo tal como polietileno glicol, poliácidoilmorfolina, poli-2-etil-oxazolona, polivinilpirrolidona, derivados de metoxipolietileno glicol (MPET) y sus mezclas. Los ejemplos de fosfolípidos de la invención incluyen, pero no de forma limitativa, fosfatidil colinas, fosfatidil gliceroles, fosfatidil inositoles, fosfatidil etanolaminas y esfingomielinas. Los tensioactivos representativos útiles en la invención pueden incluir, pero no de forma limitativa, fosfolípidos de dicadena, lisolípidos, ácidos biliares, tensioactivos de miristoílo, tensioactivos de palmitoílo, tensioactivos de estearoílo, monooleatos de glicerilo, ceramidas, PEG-ceramidas, lisofosfatidil colina ligada a éter-C18, copolímeros de polietileno glicol-polietileno, copolímeros de bloques, ácidos grasos y sus mezclas. Los ejemplos de lisolípidos útiles en la invención incluyen, pero no de forma limitativa monopalmitoil fosfatidilcolina (MPPC), monolauril fosfatidilcolina (MLPC), monomiristoil fosfatidilcolina (MMPC), monoestearoil fosfatidilcolina (MSPC) y sus mezclas. Los polímeros hidrófilos representativos útiles en la invención incluyen, pero no de forma limitativa, polietileno glicol, poliácidoilmorfolina, poli-2-etil-oxazolona, polivinilpirrolidona, y metoxipolietileno glicol (mPEG) y sus mezclas. Los ejemplos de agentes activos útiles en la invención incluyen, pero no de forma limitativa, agentes farmacológicamente activos, agentes de aroma, agentes diagnósticos, agentes nutricionales, productos genéticos, productos no biológicamente activos tales como agentes de formación de imágenes y sus mezclas. Los tipos de agentes activos a modo de ejemplo incluyen anestésicos, anti-histaminas, anti-neoplásicos, anti-ulcerosos, agentes anti-convulsión, relajantes musculares, agentes inmunosupresores, agentes anti-infecciosos, antes no esteroideos y anti-inflamatorios, agentes de formación de imágenes, agentes nutricionales y sus mezclas, por ejemplo. Los agentes anti-neoplásicos a modo de ejemplo incluyen, pero no de forma limitativa, antraciclina, tales como doxorubicina y epirubicina; taxanos, tales como taxol y taxotere; y platinos, tales como cis-platino, carboplatino y oxaliplatino.

Una realización de la invención utiliza una formulación de liposoma que comprende fosfolípido DPPC, el lisolípidos MSPC, y un fosfolípido tal como 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) funcionalizada para incluir un polímero hidrófilo, por ejemplo DSPE-mPEG-2000 y/o DSPE-mPEG-5000, en el que el polímero hidrófilo se une al lípido a través de un enlace amida. Las composiciones de liposoma que comprenden relaciones molares de fosfolípido:lisolípidos:fosfolípidos funcionalizados con polímero hidrófilo tan bajas como 90:10:1 se sabe que son eficaces en el método de congelación y almacenamiento. Por consiguiente, la presente invención tiene una aplicación de base amplia que se puede usar para aumentar la eficacia y rebajar los costes de proceso para los productos liposómicos comerciales. La presente invención se puede aplicar a una formulación liposómica de acuerdo con la reivindicación 1 para proteger la integridad del liposoma durante la congelación.

En una realización, la invención se refiere a un método para almacenar una formulación de nanopartículas, por ejemplo una formulación liposómica, con propiedades mejoradas tales como características de estabilidad, almacenamiento, atrapamiento o liberación. Se ha comprobado que la incorporación de polímeros hidrófilos a la membrana de las nanopartículas, tal como liposomas, mejora las características de estabilidad, almacenamiento,

atrapamiento y liberación de dichas vesículas. La inclusión de los polímeros hidrófilos en las nanopartículas y las formulaciones liposómicas limita los cambios negativos a propiedades biológicas, químicas y deshidratación u otros métodos usados para contribuir al almacenamiento, estabilidad y manipulación de dichas formulaciones. De este modo, la presencia de un polímero hidrófilo junto con la nanopartícula o formulación liposómica protege, mantiene y/o mejora la integridad de la membrana original.

Durante el pasado, no ha sido posible usar de manera eficaz la congelación solo con el fin de almacenar liposomas. La mayoría de los productos liposómicos tienen etiquetas con la leyenda "No Congelar". Los ejemplos de esto se han visto sobre etiquetas de productos comercialmente disponibles tales como Doxil, AmBisome, DepoCyt y diversos liposomas cosméticos. Una formulación útil con la presente invención puede proporcionar una composición en la que los liposomas y nanopartículas se puedan congelar sin dañar la integridad de membrana o los contenidos encapsulados. De este modo, el empleo de formulaciones de la invención permitiría un vial individual y combinaciones de productos de vial múltiple, para congelar y almacenar con fines de distribución. Es decir, una ventaja particular de la presente invención es que se puede congelar una formulación liposómica y se puede transportar en un recipiente individual, que puede ser una forma de dosificación unitaria, en lugar del transporte en recipientes por separado que requieran re-formulación inmediatamente antes de uso.

La invención también incluye un método de formulación y almacenamiento de una formulación de nanopartículas o liposómica, incluyendo el método combinar anfífilos o lípidos apropiados para la formación de una composición liposómica o de nanopartículas con un polímero hidrófilo, congelación y almacenamiento. Dichas nanopartículas y liposomas se pueden formar usando métodos generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante mezcla de los componentes anfífilos con una disolución acuosa en condiciones apropiadas. Los métodos apropiados se conocen bien por parte de los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Needham, la patente de EE.UU. N.º 6.200.598 y 6.276.925; Ogawa, patente de EE.UU. N.º 5.094.854. Las composiciones liposómicas o de nanopartículas se pueden almacenar durante al menos un mes.

Además, el método descrito permite administrar las formulaciones liposómicas y de nanopartículas en dosis unitarias en viales individuales o múltiples antes o después de la congelación y almacenamiento. Las formulaciones liposómicas o de nanopartículas de la invención pueden contener encapsulados al menos uno de: fármacos citotóxicos o no citotóxicos, productos genéticos, o agentes biológicos, así como también agentes no biológicos, por ejemplo, agentes de formación de imágenes, que se pueden usar inmediatamente o se pueden envasar congelados como estuches.

Otra cuestión durante el uso de las composiciones liposómicas y de nanopartículas en humanos y/o animales, es que las composiciones se pueden reconocer y eliminar mediante las defensas corporales naturales, tales como el sistema reticuloendotelial (RES), que limita su utilidad terapéutica y el tiempo de circulación eficaz. Se han examinado diversos métodos, tales como la optimización del tamaño de las composiciones liposómicas y de nanopartículas o preparando composiciones "sigilosas" mediante la adición de determinados constituyentes a las membranas de la composición para protegerlas o "apartarlas" de los procesos biológicos de eliminación. Durante el almacenamiento, las nanopartículas y los liposomas tienen tendencia a aumentar de tamaño lo cual resulta en una pérdida de la integridad y estabilidad de la membrana. El desarrollo de un método para mantener el tamaño y la uniformidad liposómica y nanoparticular deseada, puede contribuir a aumentar y conservar el tiempo de circulación eficaz en un sujeto, como alternativa a la adición de constituyentes por separado específicamente para producir dichas características de "sigilo". Por este motivo, la protección del tamaño de la nanopartícula o el liposoma durante la congelación, refrigeración, deshidratación o liofilización, puede resultar muy importante para su integridad y rendimiento. De este modo, una formulación que mejore la estabilidad de la nanopartícula o el liposoma puede mantener constante el tamaño de la nanopartícula durante el almacenamiento y mantener su efectividad terapéutica.

En una realización a modo de ejemplo, un anfífilo, tensioactivo y una cantidad eficaz de polímero hidrófilo (o anfífilo modificado para contener un polímero hidrófilo) se combinan para formar una nanopartícula usando métodos conocidos. Por ejemplo, el anfífilo, tensioactivos y polímero hidrófilo (o anfífilo modificado para contener el polímero hidrófilo) se pueden combinar en un disolvente orgánico, y se puede retirar el disolvente, seguido de la adición de una solución acuosa. Después se puede introducir un agente activo en el espacio interior de la nanopartícula usando técnicas conocidas tales como, por ejemplo, el uso de un gradiente de pH. Las nanopartículas también se pueden dimensionar usando técnicas conocidas tales como, por ejemplo, extrusión a través de un filtro apropiado de policarbonato. El dimensionamiento también se puede llevar a cabo antes o después de la introducción del agente activo en la nanopartícula. El tamaño final de la nanopartícula puede ser menor de aproximadamente 1000 nm o de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 o de aproximadamente 80 a aproximadamente 125 nm. La cantidad eficaz de polímero hidrófilo puede determinarse por medio de la preparación de la nanopartícula, congelación a la temperatura deseada, almacenamiento durante un período de tiempo apropiado, descongelación de la formulación y medición de una característica de la nanopartícula indicativa de la estabilidad. La característica medida puede ser, por ejemplo, el tamaño de partícula o la fuga de ingrediente activo. La cantidad de polímero hidrófilo en la preparación inicial puede variarse después para lograr el grado de estabilidad deseado.

Tras la preparación de la nanopartícula, la formulación se puede congelar y almacenar en estado sólido a, por ejemplo, aproximadamente -20 °C o menos, aproximadamente -78 °C o menos o aproximadamente -196 °C o menos. En realizaciones a modo de ejemplo, las nanopartículas se pueden almacenar en estado congelado durante aproximadamente tres o más días sin cambio significativo en las propiedades físicas tras la descongelación. En otras realizaciones, la formulación de nanopartícula se puede almacenar durante un mes o más, durante aproximadamente tres meses o más o durante aproximadamente 24 meses, o durante un período de tiempo incluso más amplio. La formulación se puede almacenar como solución en bruto o, antes de la congelación, se puede dividir en dosis unitarias para distribución. Además del almacenamiento, la formulación de nanopartícula congelada se puede transportar al punto de uso. Por ejemplo, la formulación se puede preparar en una instalación de producción, se puede separar en dosis unitarias, se puede congelar y transportar al punto de uso. Esto ofrece las ventajas con respecto a las formulaciones existentes y métodos de distribución. Con el uso de los métodos tradicionales, las formulaciones de nanopartículas con frecuencia se separan en partes de componentes para el transporte con el fin de evitar la pérdida de estabilidad. Por ejemplo, las formulaciones liposómicas con frecuencia se transportan en viales múltiples, con los liposomas en un recipiente y la solución del agente activo en otro recipiente. Antes del uso, los dos recipientes separados se deben combinar de tal forma que se garantice la introducción del agente activo antes de la administración. Los errores en la preparación de esta solución final pueden tener como resultado la ausencia de efectividad. Con el uso de la presente invención, esta etapa de combinación se elimina. De este modo, en el punto de uso, la formulación se descongela y se puede usar o se puede administrar de forma directa. Esto facilita el uso de la composición y garantiza que la composición se prepare de forma correcta para una administración eficaz.

De este modo, la presente invención proporciona un método para almacenar, transportar y administrar una formulación liposómica o de nanopartículas. Las formulaciones almacenadas y/o transportadas de acuerdo con la presente invención se pueden administrar de cualquier forma y resulta útil para la formulación particular. Los métodos de administración incluyen administración oral, rectal, peritoneal, intravenosa y bucal, aunque se puede utilizar cualquier ruta de administración deseable dependiendo del agente activo y su punto de actividad. La formulación se puede administrar sola; es decir, tal y como se fabrica, o combinada con otros agentes o vehículos terapéuticos antes del uso. Los vehículos pueden incluir excipientes sólidos o líquidos tales como soluciones acuosas, suspensiones, emulsiones, vehículos sólidos, agentes de dispersión, etc. La aplicación final es coherente con el uso de la formulación de nanopartículas y se ha utilizado directamente tras la preparación, es decir, antes del almacenamiento y el transporte.

Estas y otras ventajas de la invención se comprenderán mejor a partir del siguiente ejemplo representativo que no se pretende que limite el alcance de la presente invención.

#### Ejemplo Representativo 1

Se disolvieron dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), 1-estearoil-2-liso-fosfatidilcolina (MSPC) y N-(carbonilmetoxipolietilenglicol-2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-etanolamina (DSPE-mPEG-2000) en una relación molar de 90:10:4 en diclorometano. Después, se retiró el disolvente por medio de evaporación rotatoria. La mezcla se hidrató después usando tampón cítrico 300 mM a pH 4 para obtener una concentración final de lípidos de aproximadamente 100 mg/ml. La suspensión formada se sometió después a extrusión a través de dos filtros de membrana de policarbonato. (Hope, M.J. et al. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure, characterization of size, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. Biochim. Biophys. Acta. 812: 55-65, 1985). Las formulaciones liposómicas finales en este ejemplo tuvieron un tamaño medio de partícula inicial entre 98 y 122 nm. (En general, el tamaño de partícula de los liposomas de la invención, varía entre 50-500 nm dependiendo del método de extrusión). Se introdujo el fármaco, doxorubicina, en el liposoma por medio de mezcla de los liposomas con una solución de carbonato de sodio y el fármaco. Brevemente, se añadieron 1,6 ml de solución de doxorubicina (5,8 mg/ml) y 1,2 ml de carbonato de sodio 0,5 mM a 1,9 ml de mezcla de liposomas y se equilibró a 35 °C durante 60 minutos. Los liposomas cargados con fármaco, así como también los liposomas vacíos, se almacenaron después a -20 °C. Se controló el cambio en el tamaño de partícula. Las composiciones liposómicas, sin la adición de mPEG, se prepararon por medio del mismo proceso. La Tabla 1 muestra que con la adición de mPEG, el tamaño de partícula liposómica permanece igual tras la congelación y descongelación, y que el liposoma es estable durante hasta 24 meses, tal y como se mide por medio de ensayos convencionales de la integridad y estabilidad liposómicas. Por el contrario, los liposomas que carecen de mPEG polimérico hidrófilo, no son estables tras la congelación y descongelación. La evidencia de dicha inestabilidad es que el tamaño de partícula aumenta tras la congelación. La Figura 1 muestra una preparación liposómica después de la congelación/descongelación. No existe diferencia significativa en el aspecto visual y el tamaño de partícula antes y después de la congelación/descongelación.

Tabla 1. Cambio en el tamaño de partícula liposómica tras la congelación y la descongelación

Tiempo	Tamaño de Partícula (nm)			
	Liposoma con MPEG		Liposoma sin MPEG	
	Liposoma vacío	Liposoma con doxorubicina	Liposoma vacío	Liposoma con doxorubicina
Inicial	98,5	107	122	121

Tiempo	Tamaño de Partícula (nm)			
	Liposoma con MPEG		Liposoma sin MPEG	
	Liposoma vacío	Liposoma con doxorubicina	Liposoma vacío	Liposoma con doxorubicina
3 días	No sometido a ensayo	No sometido a ensayo	131	137
3 meses	100	105	No sometido a ensayo	No sometido a ensayo
24 meses	99,6	No sometido a ensayo	No sometido a ensayo	No sometido a ensayo

## Ejemplo Representativo 2

5 Se preparó otra preparación liposómica que contenía doxorubicina como en el Ejemplo Representativo 1. Se congelaron las muestras a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 semana, 1 mes y 3 meses. En cada momento de tiempo, se determinaron el contenido de doxorubicina, el % de recuperación a  $1,2\text{ }\mu\text{m}$ , el % de encapsulado, las concentraciones de lípidos, el pH y el tamaño de vesícula. En el momento inicial ( $t = 0$ ), se sometieron a ensayo tres muestras con o sin congelación para determinar el impacto de la formulación liposómica. Además, cada muestra se  
10 expuso a tres ciclos de congelación-descongelación para determinar si los ciclos de congelación-descongelación resultaban perjudiciales.

15 Como se puede observar en la tabla siguiente, a  $t = 0$ , las formulaciones liposómicas tuvieron características similares a las condiciones congeladas o ambientales. Incluso tres ciclos de congelación-descongelación no tuvieron impacto alguno en la integridad de la membrana. Las formulaciones fueron estables durante un período de 3 meses a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No se apreciaron cambios significativos en el tamaño de la vesícula, el contenido de doxorubicina, encapsulado o contenido de lípidos en este marco temporal. Aunque el pH externo medido de las muestras varió ligeramente en los diferentes momentos de tiempo, se apreciaron cambios en las mediciones de pH de los liposomas preparados en el tampón de carbonato se con el tiempo a medida que el gas de  $\text{CO}_2$  escapaba del vial.  
20 No obstante, como se ilustra en la Tabla 2, los cambios en el pH no afectan a la estabilidad de la membrana ya que el pH de 3 meses es similar al de una semana.

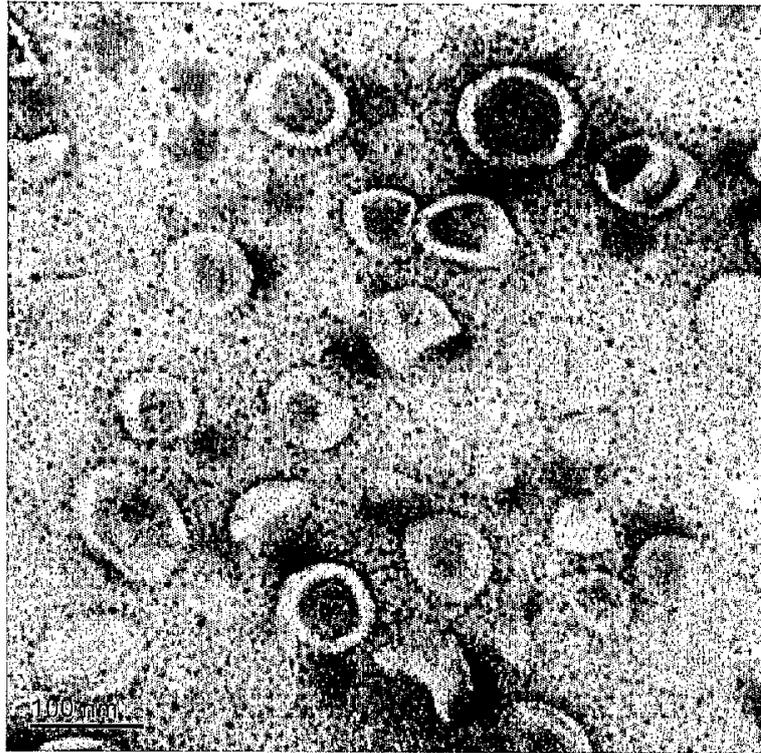
Tabla 2. Estabilidad liposómica tras congelación y descongelación repetida

	t = 0 No Congelado	t = 0 Congelado	t = 0 Congelado/Descongelado 3 veces	1 semana	1 mes	3 meses
DOX (mg/ml)	1,85	1,76	1,77	1,83	1,76	1,73
% de Recuperación 1,2 $\mu\text{m}$	99,2	99,8	99,9	100,2	99,3	100,5
% de Encapsulado	99,9	99,5	99,4	99,5	99,5	98,2
Lípidos Totales (mg/ml)	35,1	35,2	35,0	34,9	34,9	35,7
pH	8,15	7,85	7,85	8,50	8,84	8,52
Tamaño	97,0	98,0	98,3	98,9	96,7	97,8

25 Se pretende que las realizaciones ilustradas y comentadas en la presente memoria descriptiva únicamente muestren a los expertos en la técnica el mejor modo conocido por los inventores para preparar y usar la invención. Nada de lo contenido en la presente memoria descriptiva debe considerarse como limitante del alcance de la presente invención. Todos los ejemplos presentados son representativos y no limitantes. Las realizaciones anteriormente  
30 descritas de la invención se pueden modificar o variar, sin apartarse de la invención, como se aprecia por parte de los expertos en la técnica de las consideraciones anteriores. Por tanto, debe entenderse que, dentro del alcance de las reivindicaciones y sus equivalentes, la invención se puede poner en práctica de una forma diferente de la que se describe de manera específica.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para almacenar una formulación liposómica de suspensión líquida que tiene:
  - 5 al menos un fosfolípido, al menos un tensioactivo, al menos un polímero hidrófilo y un agente activo, en el que:  
el fosfolípido es al menos una fosfatidil colina;  
el tensioactivo es al menos un lisolípido; y  
el polímero hidrófilo se escoge entre DSPE-mPEG-2000, DSPE-mPEG-5000 y sus mezclas,  
10 que comprende congelar dicha formulación y almacenar la formulación congelada durante un período de al menos un mes.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el fosfolípido es al menos una fosfatidil colina; el tensioactivo es al menos uno escogido entre monopalmitoil fosfatidilcolina (MPPC), monolauril fosfatidilcolina (MLPC), monomiristoil fosfatidilcolina (MMPC), monoestearoil fosfatidilcolina (MSPC) y sus mezclas; y el polímero hidrófilo se escoge entre DSPE-mPEG-2000 o DSPE-mPEG-5000 y sus mezclas.  
15
3. El método de la reivindicación 2, en el que el fosfolípido es una dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC); el tensioactivo es monopalmitoil fosfatidilcolina (MPPC); y el polímero hidrófilo se escoge entre DSPE-mPEG-2000, DSPE-mPEG-5000 y sus mezclas.  
20
4. El método de la reivindicación 2, en el que el fosfolípido es dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC); el tensioactivo es monoestearoil fosfatidilcolina (MSPC); y el polímero hidrófilo se escoge entre DSPE-mPEG-2000, DSPE-mPEG-5000 y sus mezclas.  
25
5. El método de la reivindicación 3, en el que la relación molar de DPPC:MPPC:DSPE-mPEG es de aproximadamente 90:10:4.
6. El método de la reivindicación 4, en el que la relación molar de DPPC:MSPC:DSPE-mPEG es de aproximadamente 90:10:4.  
30
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente activo se escoge entre agentes farmacológicamente activos, agentes de aroma, agentes diagnósticos, agentes nutricionales, productos genéticos y sus mezclas.  
35
8. El método de la reivindicación 7, en el que el agente activo se escoge entre anestésicos, anti-histaminas, anti-neoplásicos, anti-ulcerosos, agentes anti-convulsión, relajantes musculares, agentes inmunosupresores, agentes anti-infecciosos, antes no esteroideos y anti-inflamatorios, agentes de formación de imágenes, agentes nutricionales y sus mezclas.  
40
9. El método de la reivindicación 8, en el que el agente activo es al menos un agente anti-neoplásico.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el agente activo es doxorubicina.
- 45 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que además comprende transportar la formulación liposómica congelada y descongelar dicha formulación en otro punto.
- 50 12. El método de la reivindicación 1, en el que al menos una fosfatidil colina es dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), al menos un lisolípido es monoestearoil fosfatidilcolina (MSPC), el polímero hidrófilo es DSPE-mPEG-2000 y el agente activo es doxorubicina, en el que la relación molar de DPPC:MSPC:DSPE-mPEG-2000 es 90:10:4.



**FIG 1**