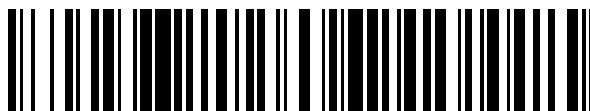


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 563**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 31/337** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2011 PCT/EP2011/058275**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011 WO11144745**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2011 E 11720776 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2571492**

54 Título: **Formulaciones de liposomas mejoradas de compuestos lipófilos**

30 Prioridad:

**21.05.2010 US 347222 P**  
**21.05.2010 EP 10163643**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.11.2017**

73 Titular/es:

**SYNCORE BIOTECHNOLOGY CO., LTD (100.0%)**  
**84 Chung Shan Road**  
**Tung Shan Shine, I-Lan, TW**

72 Inventor/es:

**HAAS, HEINRICH y**  
**FATTLER, URSULA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 640 563 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

Formulaciones de liposomas mejoradas de compuestos lipófilos

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la preparación de liposomas con capacidad de carga mejorada para agentes farmacéuticamente y/o diagnósticamente activos y/o agentes cosméticos que son solubilizados sustancialmente por las membranas liposomales, a dispersiones de liposomas con estabilidad mejorada con respecto a la liberación del agente activo y/o agente cosmético de los liposomas que se pueden obtener por el procedimiento y a composiciones farmacéuticas o cosméticas que comprenden dichas dispersiones de liposomas estabilizadas. La preparación puede implicar etapas de deshidratación y rehidratación de dispersiones de liposomas que pueden llevarse a cabo por secado por pulverización.

### Antecedentes

15 Los liposomas son estructuras vesiculares artificiales constituidas por membranas únicas o múltiples encerrando un compartimento acuoso. Lo más típicamente, las membranas de liposomas están formadas de bicapas de lípidos, pero pueden consistir también en otros compuestos anfífilos monoméricos y poliméricos, incluyendo otros tipos de anfífilos, polímeros y polipéptidos (Antonietti y Forster 2003). Los liposomas se forman de manera espontánea cuando los lípidos se dispersan en un entorno acuoso en condiciones adecuadas. La mayoría de los liposomas no son tóxicos, no son antigénicos y son biodegradables por naturaleza, puesto que presentan las características moleculares de las membranas de mamíferos. Pueden incorporarse fármacos y compuestos lipófilos o anfífilos a la membrana liposomal, pueden encapsularse fármacos y compuestos hidrófilos en los núcleos acuosos de los liposomas.

25 En los últimos años, los liposomas han llegado a ser una herramienta importante en la industria farmacéutica para el suministro de fármacos (Gregoriadis 1995). Los liposomas pueden influir en la farmacocinética mediante una liberación prolongada del fármaco al cuerpo o reducir los efectos secundarios limitando la concentración libre de un fármaco. Uniendo los ligandos al liposoma o haciendo su carga, los liposomas facilitan un suministro fijado como objetivo de fármacos a un sitio de acción deseado. Además del uso farmacéutico, los liposomas también se usan con frecuencia para productos cosméticos.

30 Si se usan liposomas para la administración de agentes activos en un uso farmacéutico o cosmético, es importante controlar y optimizar la eficacia de carga del compuesto activo para la formulación liposomal y la estabilidad de la formulación liposomal cargada con el principio activo o compuesto cosmético. La estabilidad de la formulación es una característica crucial durante la fabricación, almacenamiento y aplicación de la formulación. En muchos casos, la estabilidad física o química de los productos de liposomas está limitada, que tiene que ser considerado para planear los procedimientos de fabricación (tiempo de retención), almacenamiento (estabilidad de vida útil) y aplicación del producto (estabilidad en uso).

35 Para aplicación farmacéutica, con frecuencia se administran formulaciones de liposomas por inyección. Así, los liposomas deben estar presentes en una fase acuosa en condiciones adecuadas para administración intravenosa (iv) o intraperitoneal (ip).

40 Las formulaciones de liposomas farmacéuticas se someten a criterios de calidad extremadamente rigurosos. La mayoría de los productos de liposomas líquidos, presentes, no son estables durante un periodo de almacenamiento prolongado, debido a que pueden experimentar una variedad de procedimientos de degradación químicos y físicos. Sin embargo, para productos farmacéuticos es deseable tener formulaciones finales que sean estables durante al menos seis meses a dos años a temperatura ambiente o a la temperatura de refrigeración. Estos factores restringen el uso de los liposomas como portadores prácticos de compuestos biológicamente activos. Para los liposomas, se han desarrollado técnicas para deshidratación para satisfacer estos requerimientos.

45 La estabilidad a largo plazo de las formulaciones de liposomas mejora enormemente cuando se deshidratan y se almacenan como formulaciones secas en vez de líquidas. Antes de la inyección, los productos liposomales secos tienen que ser rehidratados en un medio acuoso adecuado generando suspensiones acuosas para administración. Debido a que la estabilidad de las formulaciones de liposomas rehidratadas puede estar limitada de nuevo por procedimientos de degradación químicos y físicos, el incremento de la estabilidad en uso de dicha suspensión liposomal lista para uso es otro importante objetivo de la tecnología de las formulaciones farmacéuticas.

50 Un método de estabilización comúnmente usado para suspensiones acuosas de liposomas por secado por congelación se describe en las patentes de EE. UU. números 4 229 360 y 4 247 411. En el procedimiento de secado por congelación, se congela una suspensión liposomal y se somete con posterioridad a presión reducida, lo que conduce a eliminación del agua congelada por sublimación. Normalmente, la suspensión acuosa comprende un excipiente, tal como un azúcar, para evitar o minimizar la formación de defectos inducida por congelación y deshidratación. El procedimiento de secado por congelación da como resultado liposomas en una matriz protectora de excipiente a partir de la cual, después de rehidratación, se tiene que obtener el producto líquido antecedente. Como se describe en la patente de EE. UU. 4 880 635, los liposomas pueden ser protegidos de efectos perjudiciales

de las etapas de deshidratación y rehidratación por la presencia de un azúcar protector, no sólo en el exterior, sino también en el interior del liposoma.

El método de secado por congelación, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 5 089 181, proporciona un procedimiento alternativo para preparar una formulación liposomal deshidratada, estable. El procedimiento ha sido adaptado de la industria alimentaria y emplea la atomización de suspensiones en pequeñas gotitas mediante pulverización de dicha suspensión y la posterior evaporación del medio de las gotitas a temperaturas elevadas. Como en el procedimiento de secado por congelación, la suspensión liposomal puede comprender un excipiente, tal como un azúcar, para proteger las membranas liposomales. En comparación con el secado por congelación, el procedimiento de secado por pulverización presenta considerables ventajas con respecto a la aplicación industrial a gran escala, debido a que permite mayores capacidades de fabricación a menor coste y con esfuerzos tecnológicos razonables. Sin embargo, las elevadas temperaturas implicadas en este método aplican tensión al agente activo encapsulado, así como a las membranas lipídicas.

Para estabilizar las suspensiones que comprenden un fármaco soluble en agua encapsulado en liposomas para secado por pulverización, la patente de EE. UU. 4 895 719 describe equilibrar una alta osmolaridad interna generada por una alta concentración interna del fármaco soluble con una osmolaridad uniformemente alta del medio circundante.

Para estabilizar fármacos hidrófobos en la fase acuosa de liposomas, la patente internacional WO 2007/005754 describe la complejación de tales fármacos por ciclodextrinas previamente a la encapsulación. El fármaco hidrófobo complejado es retenido en el liposoma a altas concentraciones, incluso en presencia de un gradiente osmótico transmembrana producido por la ciclodextrina. Sin embargo, no se describe una estabilización para los agentes activos embebidos en la membrana liposomal.

La presencia de solutos que son osmóticamente activos, tales como azúcares o iones, en el interior o exterior de las membranas liposomales genera fuerzas osmóticas. La manera cómo actúan los gradientes osmóticos transmembrana sobre la estructura y la dinámica de las membranas biológicas se ha investigado en la bibliografía y se han propuesto modelos para describir fenómenos como la relación tensión-tracción y lisis (Ertel, Marangoni et al. 1993; Hallett, Marsh et al. 1993). En pocas palabras, los experimentos por los autores y los análisis adjuntos subrayan que el hinchamiento de los liposomas a una tensión osmótica determinada depende de su tamaño. Se describió hinchamiento hasta un tamaño dependiente del límite de elasticidad crítico al cual tuvo lugar lisis (fuga). Se proporcionaron condiciones en las que se espera que los liposomas residan en un estado consistentemente forzado.

Con respecto a la producción de liposomas que comprende un fármaco lipófilo que presenta una vida útil mejorada, la patente internacional WO 2004/002468 describe la preparación de liposomas que comprende paclitaxel. Los liposomas se forman en un tampón acuoso que comprende trehalosa, que da como resultado una suspensión liposomal con la misma osmolaridad en el interior y exterior del liposoma. La suspensión liposomal acuosa se deshidrata con posterioridad. El procedimiento de deshidratación puede ser realizado por secado por congelación o secado por pulverización. La solicitud describe varios protocolos para el secado por congelación de dichas suspensiones liposomales. Después de deshidratación, la preparación liposomal puede rehidratarse por la adición de agua o una disolución acuosa. El documento no proporciona datos comparativos sobre la estabilidad en uso de preparaciones liposomales que se deshidrataron por secado por congelación o por secado por pulverización previamente a su rehidratación.

A la vista del estado descrito de la técnica, el problema subyacente de la presente invención fue la preparación de liposomas, que comprende al menos un agente activo lipófilo y/o agente cosmético con una alta relación agente a lípido y con estabilidad mejorada, especialmente considerando la estabilidad física y la liberación del agente del liposoma. Especialmente, la invención se refiere al problema de proporcionar un procedimiento para fabricar dichas preparaciones de liposomas que presentan un tiempo de retención prolongado durante la fabricación y estabilidad en uso, en la que el procedimiento implica una etapa de deshidratación rápida.

Así, la solución del problema anterior se consigue según la presente invención proporcionando realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y representadas además en la descripción de la invención.

### Sumario de la invención

La solución del problema anterior se proporciona por preparaciones de liposomas donde se aplica tensión de tracción en las membranas de liposomas por fuerzas osmóticas y un procedimiento para preparar dichos liposomas. Específicamente, se proporciona la disolución por un procedimiento para la preparación de una suspensión liposomal en una fase acuosa con al menos un agente activo y/o agente cosmético presente en la membrana liposomal, en la que dicha suspensión comprende al menos una sustancia osmóticamente activa en la fase acuosa y en la que la osmolaridad de la fase acuosa en el interior del volumen liposomalmente encapsulado,  $O_{int}$ , es mayor que la fase acuosa en el exterior del volumen liposomalmente encapsulado,  $O_{ext}$ . El agente activo presenta un log P mayor que 1 y dicho agente activo es un taxano. Los liposomas se caracterizan por la presencia de tensión de tracción en las membranas de liposomas (liposomas sometidos a tensión). Pueden obtenerse directamente durante la formación de liposomas o en cualquier etapa de tratamiento después de la formación de los liposomas.

Los liposomas sometidos a tensión pueden obtenerse afectando directamente a la osmolaridad de la fase acuosa interior y/o exterior de los liposomas o cambiando las características de membrana, tales como empaquetamiento molecular, de la membrana liposomal donde los liposomas están presentes en un medio de una osmolaridad determinada.

- 5 Los liposomas sometidos a tensión pueden prepararse directamente con el agente activo y/o agente cosmético presente en la membrana liposomal. Alternativamente, los liposomas sometidos a tensión pueden prepararse sin el agente, que se añade con posterioridad a los liposomas.

Un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de una preparación liposomal que comprende:

- 10 a) proporcionar una primera preparación liposomal que comprende una suspensión de liposomas en una fase acuosa, en la que los liposomas comprenden al menos una membrana, en la que la membrana encierra un volumen liposomalmente encapsulado de la fase acuosa y la fase acuosa comprende al menos una sustancia osmóticamente activa y presenta una osmolaridad total inicial,  $O_1$ ,
- 15 b) generar después un gradiente osmolar en la fase acuosa de dicha preparación en la que la osmolaridad de la fase acuosa en el exterior del volumen liposomalmente encapsulado,  $O_{ext}$ , es menor que la osmolaridad de la fase acuosa en el interior del volumen liposomalmente encapsulado,  $O_{int}$ , para proporcionar una segunda preparación liposomal (sometida a tensión),
- c) opcionalmente deshidratar la segunda preparación liposomal (sometida a tensión) para obtener una preparación deshidratada y
- 20 d) opcionalmente rehidratar la preparación deshidratada.

El agente activo presenta un log P mayor que 1 y dicho agente activo es un taxano. La preparación liposomal de la etapa a) comprende preferiblemente al menos un agente activo o agente cosmético en la membrana liposomal. Alternativamente, el agente puede ser añadido en una fase a continuación del procedimiento de fabricación.

- 25 La etapa b) puede realizarse reduciendo la osmolaridad total inicial,  $O_1$ , de la suspensión liposomal procedente de la etapa a) para proporcionar una preparación liposomal sometida a tensión con una osmolaridad total,  $O_2$ , que es menor que la osmolaridad  $O_1$ .

La etapa b) puede realizarse diluyendo la suspensión liposomal procedente de la etapa a) con un medio acuoso con una osmolaridad que es menor que  $O_1$  o sometiendo a diálisis la suspensión contra un medio acuoso con una osmolaridad que es menor que  $O_1$ . En el modo más simple, la suspensión liposomal se diluye con agua.

- 30 Según el concepto general de la invención, un gradiente osmolar puede generarse o modificarse en diferentes fases durante la fabricación de la preparación de liposomas. También se puede modificar el gradiente osmolar una vez o múltiples veces en varias fases del procedimiento de producción. Esto puede conseguirse posiblemente por el mismo procedimiento o por procedimientos diferentes como se describe en lo siguiente. El procedimiento de producción de la preparación liposomal se refiere a todas las etapas realizadas antes de la aplicación final de la suspensión liposomal.
- 35

La etapa b) del procedimiento inventivo puede comprender las etapas de:

- b1) deshidratar la preparación liposomal en la etapa a) para obtener una preparación liposomal deshidratada y
- 40 b2) rehidratar dicha preparación liposomal deshidratada en condiciones para proporcionar una preparación liposomal sometida a tensión, preferiblemente en un medio acuoso.

Preferiblemente, la deshidratación se realiza por secado por pulverización de la suspensión liposomal.

La invención también se refiere a composiciones obtenidas o que se pueden obtener por los procedimientos anteriores.

- 45 También, la invención se refiere a una preparación liposomal que comprende al menos un agente activo o un agente cosmético en la membrana liposomal, en la que la membrana liposomal está bajo tensión de tracción.

Más en particular, la invención se refiere a una preparación liposomal que comprende al menos un agente activo o agente cosmético en la membrana liposomal en la que los liposomas están presentes en una fase líquida con una osmolaridad interior del volumen liposomalmente encapsulado ( $O_{int}$ ) que es mayor que la osmolaridad de la fase líquida exterior del volumen liposomalmente encapsulado ( $O_{ext}$ ).

- 50 Sorprendentemente, los autores han encontrado que las suspensiones liposomales que contienen liposomas, cuya membrana liposomal está bajo tensión de tracción, presentan una solubilidad mejorada para compuestos lipófilos.

Así, la invención también se refiere a un procedimiento para fabricar una preparación liposomal que comprende al menos un fármaco lipófilo o compuesto cosmético, que comprende las etapas de:

- i) proporcionar una preparación liposomal sometida a tensión, que comprende una suspensión de liposomas en una fase acuosa,
- 5 ii) incubar dicha preparación liposomal sometida a tensión con al menos un agente activo lipófilo o agente cosmético, opcionalmente en una forma no solubilizada y
- iii) opcionalmente separar agente no solubilizado de la preparación liposomal, preferiblemente por filtración o centrifugación,
- iv) opcionalmente deshidratar la preparación liposomal incubada y
- 10 v) opcionalmente rehidratar la preparación liposomal deshidratada.

Los liposomas sometidos a tensión pueden obtenerse por cualquiera de los procedimientos ya mencionados. Lo más preferiblemente, está presente al menos una sustancia osmóticamente activa en la fase acuosa de la suspensión liposomal, en la que  $O_{int}$  es mayor que  $O_{ext}$ .

El agente activo o agente cosmético ya mencionado presenta preferiblemente una baja solubilidad en agua.

- 15 El agente activo o agente cosmético ya mencionado es lipófilo y presenta un log P mayor que 1. El compuesto es un taxano, lo más preferiblemente paclitaxel o un derivado del mismo.

Se ha encontrado sorprendentemente que puede mejorarse la eficacia de carga de compuestos deficientemente solubles en agua, lipófilos, tales como paclitaxel, para membranas liposomales y puede reducirse la liberación de tales compuestos de las membranas liposomales, si se somete a tensión la membrana liposomal, en particular, si está comprendido un compuesto osmóticamente activo, soluble en agua, en la fase acuosa liposomalmente encapsulada en una concentración mayor que en el exterior de la fase liposomalmente encapsulada. La mayor eficacia de carga del compuesto lipófilo para estos liposomas comparado con los liposomas sin un gradiente de concentración permite fabricar formulaciones con mayor relación molar de compuesto/lípido y mejorar la estabilidad de formulaciones determinadas debido a que se reduce la tendencia a liberar el compuesto del liposoma.

20 Los liposomas que comprenden un agente lipófilo en el compartimento de membrana son menos susceptibles de la liberación del compuesto al medio acuoso si está presente dicho gradiente osmolar. La fracción de equilibrio de dicha sustancia lipófila en el medio acuoso se reduce. De acuerdo con esto, el riesgo de que la concentración del compuesto lipófilo en la fase acuosa exceda del límite de solubilidad y precipite también se reduce.

Además, se ha encontrado sorprendentemente que los liposomas vacíos que comprenden el gradiente descrito anteriormente presentan una mayor capacidad de carga para compuestos lipófilos, es decir, se solubiliza una mayor cantidad molar de compuesto lipófilo por la misma cantidad de liposomas (como se define por cantidad molar de lípido) en comparación con liposomas sin dicho gradiente. Esto puede realizarse, por ejemplo, por exposición del compuesto lipófilo a liposomas vacíos.

Se ha encontrado sorprendentemente también que las preparaciones liposomales obtenidas por rehidratación de liposomas deshidratados previamente presentan una distribución de tamaño homogénea, como se indica por un bajo índice de polidispersidad (IP). Con respecto al control de calidad, siempre es deseable obtener un producto homogéneo, especialmente para usos farmacéuticos. Además, las suspensiones liposomales de la presente invención presentan un índice de polidispersidad que permanece sustancialmente inalterado durante un periodo de tiempo prolongado. Esto indica que los liposomas en las suspensiones inventivas no forman agregados. Especialmente para suspensiones liposomales administradas por vía intravenosa, tienen que evitarse los agregados, debido a que estos agregados pueden obstruir los vasos sanguíneos y conducir así a embolias.

La presente invención mejora sustancialmente el estado de la técnica proporcionando un procedimiento para estabilizar agentes lipófilos en las membranas liposomales de una preparación liposomal, así como mantener el tamaño y la polidispersidad de una preparación liposomal rehidratada. Como consecuencia, puede prolongarse la estabilidad en uso de una preparación final que comprende liposomas con un compuesto lipófilo. También puede prolongarse la estabilidad de dichos liposomas durante el tratamiento de dichas formulaciones.

En muchos casos el periodo de tiempo para tratar las formulaciones líquidas durante la fabricación (tiempo de retención) de formulaciones de liposomas está limitado debido al riesgo de liberación no deseada del agente de los liposomas. La invención reduce el riesgo de liberación de fármaco y, por lo tanto, permite tratamiento continuo de liposomas durante la fabricación para escalas de tiempo extendidas y permite un diseño más flexible del procedimiento de producción.

Más específicamente, la invención permite la preparación de las formulaciones ya mencionadas por secado por pulverización en vez de secado por congelación. En el secado por congelación los liposomas se congelan y se

estabilizan así directamente después de la fabricación, por lo tanto, el riesgo de liberación durante la fabricación es bajo. En secado por pulverización las formulaciones líquidas encuentran tiempos de retención prolongados en la fase líquida, debido a que la pulverización de un lote determinado puede llevar varias horas o días. Debido a que la invención permite aumentar la estabilidad de una formulación determinada, pueden realizarse sesiones de pulverización más largas sin interrupción. Puesto que el secado por pulverización presenta un rendimiento total mayor comparado con el secado por congelación, se facilita la producción a gran escala y pueden reducirse los costes de producción, mientras se mantiene la calidad del producto.

Además, se reduce el riesgo de liberación de fármaco y cristalización en el periodo entre la reconstitución de la composición liposomal deshidratada y la administración a un paciente (estabilidad en uso). La cristalización puede fomentar la formación de partículas subvisibles que no deben estar presentes más allá de ciertos límites en los productos para administración iv. En muchos casos, sólo se proporciona una estabilidad en uso de unas horas, que es un obstáculo en la práctica clínica. Por lo tanto, es de gran importancia una estabilidad en uso suficiente para aplicación práctica de dichos productos farmacéuticos o cosméticos.

La preparación de liposomas emplea con frecuencia disolventes orgánicos, tales como etanol, que normalmente se encuentra en productos liposomales deshidratados y, de acuerdo con esto, en las suspensiones liposomales rehidratadas derivadas de ahí. Este es especialmente el caso para preparaciones liposomales que fueron deshidratadas por secado por congelación (liofilización). Sin embargo, es deseable que los productos liposomales usados para aplicación a seres humanos comprendan tan poco disolvente orgánico como sea posible. La presente invención permite la deshidratación por secado por congelación, que facilita la eliminación de la mayoría o todo el disolvente orgánico residual, mientras se obtienen liposomas con una alta estabilidad.

Mientras se proporcionan las ventajas ya mencionadas, la invención puede ponerse en práctica fácilmente y no requiere alto coste. Ni requiere complicados dispositivos técnicos ni la adición de ingredientes adicionales a las composiciones ya mencionadas. Las sustancias osmóticamente activas, que se usan para poner en práctica la invención, son ya conocidas de composiciones liposomales que se deshidratan como se describe en la patente de EE. UU. 4 880 635 o la patente internacional WO 2004/002468.

## Definiciones

"Aproximadamente" en el contexto de valores de cantidad se refiere a una desviación promedio de máximo +/- 20 %, preferiblemente +/- 10 % basado en el valor indicado. Por ejemplo, una cantidad de aproximadamente 30 % en moles de lípido catiónico se refiere a 30 % en moles +/- 6 % en moles y preferiblemente 30 % en moles +/- 3 % en moles de lípido catiónico con respecto a la molaridad lípido/anfífilo total.

"Compuesto activo" o "agente activo" se refiere a un compuesto o mezcla de compuestos, que tienen una actividad biológica o física particular basado en que es útil como agente para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de una enfermedad o afección humana o animal. Los agentes terapéuticos tales como sustancias farmacéuticas y agentes de diagnóstico son ejemplos importantes de agentes activos según la presente invención.

"Densidad anhidra" de liposomas dentro de la invención actual significa la masa de todos los compuestos que constituyen dichos liposomas, incluyendo los compuestos encapsulados por los liposomas, pero excluyendo la masa de agua comprendida en dichos liposomas, dividido por el volumen del liposoma en una fase acuosa, basado en el tamaño de partícula liposomal  $Z_{promedio}$ . En un ejemplo muy específico, la densidad anhidra de los liposomas puede referirse a la masa de DOTAP, DOFC, paclitaxel, ácido cítrico y trehalosa comprendidos en un liposoma, dividido por el volumen del liposoma en una fase acuosa. Los liposomas de densidad anhidra pueden determinarse por métodos de ultracentrifugación, como se describe en los ejemplos.

"Medio acuoso", "líquido acuoso" o "fase acuosa" como se usan en la presente memoria se refieren a un material líquido que comprende agua. En algunas realizaciones, el material líquido comprende al menos 50% (p/p), al menos 70% (p/p) o al menos 90% (p/p) de agua. En otras realizaciones, el material líquido está exento de disolventes orgánicos. La fase acuosa puede contener uno o varios compuestos. Así, una dispersión acuosa, suspensión acuosa y una emulsión en que la fase continua es acuosa también son ejemplos de líquidos acuosos. Un líquido acuoso que contiene un material coloidal se refiere a veces de ahora en adelante como una dispersión o disolución coloidal acuosa.

"Catiónico" se refiere a un agente que presenta una carga positiva neta o potencial zeta positivo en las condiciones medioambientales respectivas. En la presente invención, se refiere a condiciones medioambientales donde el pH está en el intervalo entre 3 y 9, preferiblemente entre 5 y 8.

"Estabilidad química" del compuesto lipófilo se refiere a un cambio significativo de su estructura química original y se define como aproximadamente 5% de cambio de actividad a partir del valor inicial de la prueba (compuesto original), preferiblemente aproximadamente 2% o aparición de productos de degradación específicos excediendo de sus criterios de aceptación con respecto a los límites toxicológicos y los aspectos de seguridad. Para compuestos lipófilos tales como paclitaxel la estabilidad química puede definirse por HPLC/LC MS/MS y significa típicamente menos de 5% de productos de degradación de dicho compuesto. Los productos de degradación típicos de paclitaxel

son, por ejemplo, BaccatinIII, 7- Epi-Taxol etc. (Monography of Paclitaxel, USP26, [enero-marzo de 2003], USPC, Inc.).

"Compuesto cosmético" se refiere a un compuesto que presenta un efecto sobre la piel o el cabello humano.

5 "Agente diagnósticamente activo" o "diagnóstico" se refiere a un agente farmacéuticamente aceptable que puede usarse para visualizar una propiedad o estado biológico en un individuo o muestra por varios métodos. La visualización puede usarse para realizar un diagnóstico.

10 "Deshidratación" o "deshidratar" se refiere al procedimiento de retirada de agua de una composición. En algunas realizaciones, el agua se retira de la composición a un contenido residual menor que aproximadamente 10 % (p/p), preferiblemente menor que aproximadamente 5 % (p/p), basado en el contenido en agua presente antes del procedimiento de deshidratación.

15 "Volumen encapsulado" o "fase encapsulada" se refiere a un volumen que está encerrado por al menos una membrana liposomal. El volumen puede ser encerrado por una membrana en liposomas unilaminares o varias membranas en liposomas multilaminares. Así, la fase encapsulada representa el espacio interior de un liposoma, mientras que el volumen exterior del volumen liposomalmente encapsulado o "fase libre (acuosa)" representa el espacio que rodea a un liposoma. En el caso de liposomas multilaminares, los términos, encapsulado y fase libre, se refieren al volumen interior y exterior próximos a una membrana determinada del liposoma multilaminar.

"Tiempo de retención" se refiere al periodo de tiempo para tratar las formulaciones líquidas durante la fabricación de formulaciones de liposomas.

20 "Homogeneidad de tamaño" como se usa en la presente memoria se refiere a la distribución de tamaño de una población de partículas. Una alta homogeneidad de tamaño o distribución de tamaño estrecha se caracteriza por un índice de polidispersidad bajo.

25 "Lípido" se refiere a su sentido convencional como un término genérico que incluye grasas, lípidos, constituyentes solubles en alcohol-éter de protoplasma, que son insolubles en agua. Los lípidos normalmente constan de un resto hidrófilo y uno hidrófobo. En el agua, los lípidos pueden autoorganizarse para formar membranas de bicapa, donde los restos hidrófilos (grupos de cabeza) se orientan hacia la fase acuosa y los restos lipófilos (cadenas de acilo) están embebidos en el núcleo de la bicapa. Los lípidos pueden comprender también dos restos hidrófilos (bolaanfílicos). En ese caso, las membranas pueden estar formadas de una única capa de lípidos y no una bicapa. Ejemplos típicos para lípidos en el presente en contexto son grasas, aceites grasos, aceites esenciales, ceras, esteroide, esteroides, fosfolípidos, glucolípidos, sulfolípidos, aminolípidos, cromolípidos y ácidos grasos. El término incluye lípidos tanto que se encuentran en la naturaleza como sintéticos. Los lípidos preferidos en relación con la presente invención son: esteroides y esteroles, en particular colesterol, fosfolípidos, incluyendo fosfatidilo, fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas y esfingomielinas. En el caso de que haya ácidos grasos, podían ser cadenas de aproximadamente 12-24 carbonos de longitud, conteniendo hasta 6 dobles enlaces. Los ácidos grasos se unen a la cadena principal, que puede proceder de glicerol. Los ácidos grasos en un lípido pueden ser diferentes (asimétricos) o pueden tener sólo 1 cadena de ácido graso presente, por ejemplo, lisolecitinas. También son posibles formulaciones mixtas, en particular cuando los lípidos no catiónicos proceden de fuentes naturales, tales como lecitinas (fosfatidilcolinas) purificadas de yema de huevo, corazón bovino, cerebro, hígado o soja.

30

35

40 Los "liposomas" son estructuras vesiculares de autocierre, artificiales, de varios tamaños y estructuras, donde una o varias membranas encapsulan un núcleo acuoso. Lo más típicamente, las membranas de liposomas se forman de membranas de bicapa de lípidos, donde los grupos de cabeza hidrófila se orientan hacia el entorno acuoso y las cadenas de lípidos están embebidas en el núcleo lipófilo. Los liposomas pueden formarse también de otras moléculas monoméricas y poliméricas anfílicas, tales como polímeros, como copolímeros de bloque o polipéptidos. Las vesículas unilaminares son liposomas definidos por una única membrana encerrando un espacio acuoso. Por el contrario, las vesículas oligo- o multilaminares están formadas de varias membranas. Típicamente, las membranas son de prácticamente 4 nm de espesor y están constituidas por lípidos anfílicos, tales como fosfolípidos, de origen natural o sintético. Opcionalmente, las propiedades de membrana pueden modificarse por la incorporación de otros lípidos tales como derivados de esteroides o ácido cólico. Los liposomas con membranas particularmente flexibles a base de fosfolípidos con una baja temperatura de transición de fase (es decir, por debajo de la temperatura corporal) se refieren a veces como transférsomas.

45

50 "Suspensión liposomal" se refiere a una composición que comprende liposomas en un medio acuoso.

"Preparación liposomal" o "composición liposomal" se refiere a cualquier composición que comprende liposomas incluyendo una suspensión liposomal o una composición deshidratada obtenida de dicha suspensión por deshidratación.

55 "Lipófilo" se refiere a la propiedad de un compuesto para disolver preferentemente en una fase de tipo grasa (por ejemplo, hidrocarburo), tal como una fase que está constituida sustancialmente por lípidos. La propiedad lipófila de un compuesto puede describirse por el coeficiente de partición (log P). Los compuestos de interés en el presente contexto tienen un log P mayor que aproximadamente 1, más preferiblemente mayor que aproximadamente 2, lo

más preferiblemente mayor que aproximadamente 3.

"Log P" se refiere al coeficiente de partición de un compuesto entre una fase de agua y una de octanol a 25 °C. Generalmente, un número de log P superior significa que un agente es soluble mejor en octanol. El log P se define como ( $\frac{\text{concentración del agente en octanol}}{\text{concentración del agente en agua}}$ ). Es conocido para el experto en la materia cómo puede determinarse el log P de un cierto compuesto de manera experimental.

"Baja solubilidad en agua" se refiere a una solubilidad de un compuesto que es menor que 0,1 mg/ml, más preferiblemente menor que 0,01 mg/ml y lo más preferiblemente menor que 0,001 mg/ml en agua a pH fisiológico a 25°C en ausencia de aditivos que faciliten la solubilidad.

La "osmolaridad total" de una suspensión liposomal es la cantidad total de sustancias osmóticamente activas presentes en un cierto volumen de dicha suspensión dividida por el volumen de la suspensión. Para el cálculo de la osmolaridad total, se consideran asimismo sustancias osmóticamente activas en el interior y exterior del volumen liposomalmente encapsulado de la suspensión. En el presente contexto, las abreviaturas  $O_1$  y  $O_2$  se refieren a la osmolaridad total.

" $O_{int}$ " y " $O_{ext}$ " se refiere a la osmolaridad interior y exterior de una membrana de liposomas de autocierre. Para liposomas unilaminares,  $O_{ext}$  es la osmolaridad de la fase acuosa libre y  $O_{int}$  es la osmolaridad del volumen encapsulado. Para liposomas multilaminares  $O_{int}$  y  $O_{ext}$  se refieren a las osmolaridades interiores y exteriores de cada membrana autocerrada individual. En el presente contexto, las situaciones donde  $O_{int}$  es mayor que  $O_{ext}$  son de particular relevancia. Las relativas diferencias entre  $O_{int}$  y  $O_{ext}$  pueden investigarse por técnicas de centrifugación, por ejemplo, por centrifugación o ultracentrifugación analítica o preparativa. Debido a que normalmente un compuesto osmóticamente activo cambia la densidad de la fase acuosa, pueden reconocerse diferencias entre  $O_{int}$  y  $O_{ext}$  del comportamiento de sedimentación de los liposomas (Goormaghtigh y Scarborough 1986, Huang y Charlton 1971). Además, los gradientes osmólares pueden afectar a parámetros estructurales de la membrana liposomal, tal como puede determinarse por métodos como dispersión de rayos X o de neutrones o tamaño del liposoma, tal como puede determinarse por dispersión de luz y de rayos X.

Una "sustancia osmóticamente activa" en el presente contexto se refiere a una sustancia soluble en agua que no puede permear sustancialmente la membrana liposomal. Son ejemplos típicos, por ejemplo, iones o azúcares, como glucosa o trehalosa que pueden ser atrapados de manera eficaz en los liposomas, mientras que las moléculas de agua muestran una alta permeabilidad y, por lo tanto, en el contexto actual, el agua no se considera una sustancia osmóticamente activa. La selectividad para la permeación de diferentes compuestos es una característica clave de los liposomas (Bangham et al., 1965). La permeabilidad de un compuesto a través de una membrana depende de la composición de membrana, el estado de la fase de otras condiciones de frontera.

"Osmolaridad" es la suma de las concentraciones molares de solutos presentes en la disolución acuosa, incluyendo la sustancia biológicamente activa y cualquier molécula auxiliar, tal como excipientes osmóticos usados para retardar la velocidad de liberación del agente activo. Si está presente el soluto en una forma disociada, ionizada o agregada, la osmolaridad se define como la suma de las concentraciones molares de las formas disociadas, ionizadas o agregadas. La contribución a la osmolaridad de una disolución hecha por cualquier soluto en la disolución es aproximadamente equivalente a la concentración del soluto en la disolución dividido por su peso molecular. Así, como principio general, cuanto mayor el peso molecular de un soluto, menor la osmolaridad del soluto y menor la contribución de ese soluto a la osmolaridad total de la disolución. Las diferencias en osmolaridad pueden determinarse a partir de cambios en varios parámetros fisicoquímicos, tales como densidad, densidad electrónica, índice de refracción o viscosidad, que pueden determinarse por métodos establecidos en química física.

"Lípidos cargados negativamente" se refiere a lípidos que presentan una carga neta negativa.

"Composición farmacéutica" se refiere a una combinación de dos o más componentes diferentes con diferentes propiedades farmacéuticas que las poseídas por el componente. En la presente invención, dos o más componentes se refiere a un lípido o dispersión coloidal y un agente activo, opcionalmente junto con un portador, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

"Estabilidad física" de un liposoma se refiere al cambio de estado físico del liposoma. Un liposoma es estable cuando se mantiene el estado físico. Un aspecto importante de la estabilidad física es la liberación de compuesto embebido en la membrana liposomal al medio acuoso de suspensión liposomal. La liberación de compuesto es una característica de inestabilidad física. La liberación de compuesto de la membrana puede conducir a concentración elevada y agregación del compuesto en el medio acuoso. En el caso de taxanos, la agregación es visible por la formación de agujas del taxano. La cristalización de un taxano puede medirse por inspección visual de formulación liposomal líquida, microscopía de luz, medición de bloqueo de la luz o dispersión de la luz. El tamaño liposomal y la distribución de tamaño son también características del estado físico de la suspensión liposomal.

"Polidispersidad" es la anchura de la distribución del tamaño de partícula en una muestra de partículas determinada, por ejemplo, una suspensión liposomal. Una medida para la polidispersidad se proporciona por el índice de polidispersidad (IP), cuando se obtiene de análisis acumulativo de datos de espectroscopia de correlación fotónica



(PCS, por sus siglas en inglés).

El "índice de polidispersidad" (IP) es un número adimensional cuando se obtiene de análisis denominado acumulativo de resultados de mediciones de espectroscopia de correlación fotónica (PCS) (Koppel 1972). El análisis acumulativo permite ajuste libre de modelo de datos de PCS de los que se obtiene el  $Z_{\text{promedio}}$ , como una medición para el tamaño de partícula y el valor de IP, como una medida para la polidispersidad. Los cálculos de estos parámetros se definen en el documento 13321:1996 E de estándar ISO. En el contexto de las mediciones de tamaño de partícula, con frecuencia se usan los términos PCS y Difusión Dinámica de Luz (DLS, por sus siglas en inglés), como sinónimos. Esta técnica mide las fluctuaciones dependientes del tiempo en la intensidad de luz dispersada que tiene lugar debido a que las partículas están experimentando movimiento Browniano. El análisis de estas fluctuaciones de intensidad permite la determinación de los coeficientes de difusión de las partículas que se convierten en una distribución de tamaño. Dentro del significado de la presente invención, se determinan el IP y  $Z_{\text{promedio}}$  como se describe en el Ejemplo 6.

"Espectroscopia de correlación fotónica" es una técnica que mide las fluctuaciones dependientes del tiempo en la intensidad de luz dispersada que tienen lugar debido a que las partículas están experimentando movimiento Browniano. El análisis de estas fluctuaciones de intensidad permite la determinación de los coeficientes de difusión de las partículas que se convierten en una distribución de tamaño. En el contexto de mediciones de tamaño de partícula, con frecuencia PCS y DLS se usan a modo de sinónimos.

"Lípidos cargados de manera positiva" se usa como un sinónimo para lípidos catiónicos (para la definición véase definición de "lípidos catiónicos"). En la presente invención, se refiere a entornos donde el pH está en el intervalo entre 3 y 9, preferiblemente entre 5 y 8.

"Estabilidad" puede referirse a estabilidad física de un liposoma y a la estabilidad química de los únicos constituyentes (por ejemplo, lípidos y compuesto activo) comprendidos en el liposoma.

"Liposomas sometidos a tensión" o "preparaciones liposomales sometidas a tensión" se refieren a liposomas en los que la membrana liposomal está bajo tensión de tracción y a preparaciones que comprenden tales liposomas.

"Tensión de tracción" en la membrana liposomal en el contexto actual puede ejercerse por aplicación de un gradiente de concentración de un compuesto osmóticamente activo entre la fase acuosa en el interior y exterior de un volumen liposomalmente encapsulado. Si la osmolaridad interior  $O_{\text{int}}$  es mayor que la osmolaridad exterior  $O_{\text{ext}}$ , esto dará como resultado un incremento del gradiente de presión,  $\Delta P$ , entre el volumen encapsulado y libre por fuerzas osmóticas. La presión en exceso se equilibra por la tensión superficial,  $\gamma$ , en la membrana liposomal, donde la correlación entre el gradiente de presión y la tensión superficial se proporciona por la ecuación de Young-Laplace conocida (Evans y Wennerström, 1994).

$$\gamma = \frac{\Delta P \cdot r}{2}$$

(Fórmula 1)

Para los presentes sistemas de liposomas tiene que tenerse en cuenta que la tensión superficial ejercida conduce a una expansión de área de la membrana liposomal que puede dar como resultado cambios del radio, volumen encapsulado, y, por consiguiente, a cambios de la osmolaridad de ese volumen encapsulado. La expansión del área,  $\Delta A$ , como una función de la tensión superficial depende del módulo elástico de la membrana,  $\kappa$ , y se proporciona por la ecuación de Young como:

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\gamma}{\kappa}$$

(Fórmula 2)

La fórmula 1 aclara, que la relación entre tensión superficial y presión es dependiente del radio. A un gradiente de presión determinado, la tensión superficial aumenta con el radio creciente. El incremento del área y el correspondiente incremento de tamaño de los liposomas es mayor para liposomas grandes que para los más pequeños. Para los sistemas con tensión superficial determinada, tales como burbujas de jabón, el gradiente de presión  $p_{\text{interior}} - p_{\text{exterior}}$  aumenta con la disminución del radio o, en otras palabras, con el aumento de curvatura.

"Agente terapéuticamente activo" o "agente terapéutico" se refiere a un agente que evita o reduce la extensión de un estado patológico en un animal, en particular en un mamífero, preferiblemente en seres humanos.

"Molécula pequeña" se refiere a una molécula con un peso molecular menor que aproximadamente 2000 Da.

"Potencial zeta" se refiere a potencial electrostático medido de una partícula coloidal en entorno acuoso, medido como un instrumento tal como un Zetasizer 3000 usando microelectroforesis Laser Doppler en disolución de KCl

aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente pH 7,5. El potencial zeta describe el potencial en la frontera entre la disolución volumétrica y la región de cizallamiento hidrodinámico o capa difusa. El término es sinónimo con "potencial electrocinético" debido a que es el potencial de las partículas que actúan externamente y es responsable del comportamiento electrocinético de la partícula.

## 5 Descripción detallada

Un procedimiento inventivo para la fabricación de una preparación liposomal puede realizarse por las siguientes etapas:

- 10 a) proporcionar una primera preparación liposomal que comprende una suspensión de liposomas en una fase acuosa, en la que los liposomas comprenden al menos una membrana, en la que la membrana encierra un volumen liposomalmente encapsulado de la fase acuosa y la fase acuosa comprende al menos una sustancia osmóticamente activa y presenta una osmolaridad total inicial,  $O_1$ , después
- 15 b) generar un gradiente osmolar en la fase acuosa de dicha preparación en la que la osmolaridad de la fase acuosa exterior del volumen liposomalmente encapsulado,  $O_{ext}$ , es menor que la osmolaridad de la fase acuosa interior del volumen liposomalmente encapsulado,  $O_{int}$ , para proporcionar una segunda preparación liposomal (sometida a tensión),
- c) opcionalmente deshidratar la segunda preparación liposomal (sometida a tensión) para obtener una preparación deshidratada y
- d) opcionalmente rehidratar la preparación deshidratada.

20 El agente activo presenta un log P mayor que 1 y dicho agente activo es un taxano. La preparación liposomal de la etapa a) comprende preferiblemente al menos un agente lipófilo presente en la membrana liposomal. Los agentes lipófilos, sin embargo, también pueden añadirse en etapas más adelante del procedimiento de producción.

La etapa b) puede realizarse reduciendo la osmolaridad total inicial,  $O_1$ , de la preparación liposomal procedente de la etapa a) para proporcionar una preparación liposomal sometida a tensión con la osmolaridad total,  $O_2$ , que es menor que la osmolaridad  $O_1$ .

25 En el contexto de la presente invención, reducir la osmolaridad total  $O_1$  se refiere a un procedimiento en el que se reduce inicialmente la osmolaridad del medio acuoso exterior del volumen liposomalmente encapsulado,  $O_{ext}$ . Si se asume inicialmente una concentración idéntica en todos los compartimentos,  $O_1 = O_{ext} = O_{int}$ , la dilución afecta primero de todo a sólo la fase acuosa libre,  $O_{ext}$ , que da como resultado  $O_{ext} < O_{int}$ . Por consiguiente, se genera un gradiente osmótico entre el interior y el exterior del volumen liposomalmente encapsulado. Se entiende que, en presencia de un gradiente osmótico, los liposomas pueden hincharse, debido a que las membranas son permeables para las moléculas de agua. Por lo tanto, como un efecto secundario de dilución, también puede disminuir en cierta extensión la osmolaridad del medio acuoso encapsulado,  $O_2$ . Los cambios absolutos de osmolaridad dependen de varios factores como, fracción de volumen encapsulado, tamaño del liposoma, elasticidad de la membrana (módulo de Young) etc. Así, la relación entre  $O_1$  y  $O_2$ , no es necesariamente idéntica a la relación entre  $O_{int}$  y  $O_{ext}$  después de dilución.

35 Sin embargo, la reducción de la osmolaridad en la fase acuosa no encapsulada, libre, conducirá a un incremento del gradiente de osmolaridad  $O_{int} - O_{ext}$  entre el exterior y el interior de la fase encapsulada. Si tiene lugar hinchamiento como respuesta a la tensión osmótica más allá de un cierto factor, pueden formarse defectos de membrana, permitiendo la liberación de soluto de la fase de mayor osmolaridad a la fase de menor osmolaridad. Esto reducirá el gradiente osmolar y la tensión osmolar. Las membranas pueden volver a sellarse en condiciones de máxima tensión de tracción y máximo límite crítico de gradiente osmótico para formación de poros. Por lo tanto, el sistema puede considerarse autoestabilizante, en el sentido, de que si se aplica un gradiente en exceso, sin tener en cuenta las condiciones detalladas, el sistema adoptará el estado de máximo gradiente osmótico. Dicho efecto puede ser considerado favorable para asegurar condiciones reproducibles durante la fabricación.

45 Los liposomas usados dentro del contexto de la presente invención pueden comprender lípidos neutros, aniónicos y/o catiónicos. Pueden seleccionarse lípidos neutros o aniónicos, de esteroides o lípidos tales como colesterol, fosfolípidos, lisolípidos, lisofosfolípidos, esfingolípidos o lípidos pegilados con una carga neta neutra o negativa. Los lípidos neutros y aniónicos útiles incluyen de ese modo: fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol (no limitado a un azúcar específico), ácidos grasos, esteroides, conteniendo un grupo ácido carboxílico, por ejemplo, colesterol, 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, incluyendo, pero no limitado a, 1,2-dioleilfosfoetanolamina (DOFE), 1,2-dihexadecilfosfoetanolamina (DHFE), 1,2-diacil-glicero-3-fosfocolinas, 1,2-diestearilfosfatidilcolina (DEFC), 1,2-dipalmitilfosfatidilcolina (DPFC), 1,2-dimiristilfosfatidilcolina (DMFC), fosfatidilcolina preferiblemente FC de huevo, FC de soja y esfingomielina. Los ácidos grasos ligados a la cadena principal de glicerol no están limitados a una longitud específica o número específico de dobles enlaces. Los fosfolípidos también pueden presentar dos ácidos grasos diferentes. Preferiblemente, los lípidos adicionales están en el estado cristalino líquido a temperatura ambiente y son miscibles (es decir, puede formarse una fase uniforme y no tiene lugar separación de fases o formación de dominios) con el lípido catiónico usado, en la relación como se aplican. En una realización preferida, el

lípidos neutros es 1,2-dioleilfosfatidilcolina (DOFC).

Los lípidos catiónicos preferidos de la preparación liposomal son sales de N-[1-(2,3-dioleiloil)propil]-N,N,N-trimetilamonio, por ejemplo, la sal de metilsulfato. Compuestos representativos preferidos de la familia de lípidos -TAP (metilsulfato de trimetilamonio) son DOTAP (dioleoil-), DMTAP (dimiristoil-), DPTAP (dipalmitoil-) o DSTAP (diestearoil-). Otros lípidos útiles para la presente invención pueden incluir: BDDA, bromuro de dimetil dioctadecilamonio; 1,2-diaciloxi-3-trimetilamoniopropanos, (incluyendo, pero no limitado a: dioleoil, dimiristoil, dilauril, dipalmitoil y diestearoil; también pueden unirse dos cadenas de acilo diferentes a la cadena principal de glicerol); N-[1-(2,3-dioleiloil)propil]-N,N-dimetilamina (DODAP); 1,2-diaciloxi-3-dimetilamoniopropanos, (incluyendo, pero no limitado a: dioleoil, dimiristoil, dilauril, dipalmitoil y diestearoil; también pueden unirse dos cadenas de acilo diferentes a la cadena principal de glicerol); cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloil)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA); 1,2-dialquiloxi-3-dimetilamoniopropanos, (incluyendo, pero no limitado a: dioleoil, dimiristoil, dilauril, dipalmitoil y diestearoil; también pueden unirse dos cadenas alquílicas diferentes a la cadena principal de glicerol); dioctadecilamidoglicilpermina (DOGE);  $3\beta$ -[N-(N,N'-dimetilamino-etano)carbamoil]colesterol (DC-Col); trifluoroacetato de 2,3-dioleiloil-N-(2-(esperminocarboxamido)-etil)-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOEPA);  $\beta$ -alanilcolesterol; bromuro de cetil trimetilamonio (BCTA); diC14-amidina; N-*terc*-butil-N'-tetradecil-3-tetradecilamino-propionamida; 14Dea2; cloruro de N-(alfa-trimetilamonioacetil)didodecil-D-glutamato (TMAG); cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(trimetilamonio-acetil)diolanolamina; 1,3-dioleiloil-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOESPER); yoduro de N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis(2-hidroxi-etil)-2,3-dioleiloil-1,4-butanodiamonio; derivados de cloruro de 1-[2-(aciloxi)etil]2-alquil(alquenoil)-3-(2-hidroxi)etil-imidazolinio, como se describe por Solodin et al. (Solodin et al., 1995), tales como cloruro de 1-[2-(9(Z)-octadecenoiloil)etil]-2-(8(Z)-heptadecenoil-3-(2-hidroxi)etil)imidazolinio (DOTIM), cloruro de 1-[2-(hexadecanoiloil)etil]-2-pentadecil-3-(2-hidroxi)etil-imidazolinio (DPTIM), derivados de compuestos de 2,3-dialquiloxipropilamonio cuaternario, que contienen un resto hidroxialquilo en la amina cuaternaria, como se describe, por ejemplo, por Felgner et al. (Felgner et al., 1994) tal como: bromuro de 1,2-dioleoil-3-dimetilhidroxietilamonio (DORI), bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DORIE), bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetilhidroxipropilamonio (DORIE-HP), bromuro de 1,2-dioleil-oxi-propil-3-dimetilhidroxibutilamonio (DORIE-HB), bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetilhidroxipentilamonio (DORIE-Hpe), bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), bromuro de 1,2-dipalmitiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DPRIE), bromuro de 1,2-diesteriloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DERIE); ésteres catiónicos de acilcarnitinas como indica Santaniello et al. (patente de EE.UU. 5 498 633); triésteres catiónicos de fosfatidilcolina, es decir, 1,2-diacil-sn-glicerol-3-etilfosfocolinas, donde las cadenas hidrocarbonadas pueden ser saturadas o insaturadas y ramificadas o no ramificadas con una longitud de cadena de C<sub>12</sub> a C<sub>24</sub>, no siendo necesariamente idénticas las dos cadenas de acilo.

Los liposomas pueden tener diferentes tamaños, laminaridad y estructura. Preferiblemente, los liposomas tienen un diámetro promedio  $Z_{promedio}$  de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 500 nm. Lo más preferido es un tamaño  $Z_{promedio}$  de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 nm. Los liposomas pueden ser liposomas uni-, oligo- o multilaminares. Preferiblemente, los liposomas son liposomas unilaminares.

El agente activo o agente cosmético empleado en las diferentes realizaciones del compuesto de la invención presenta preferiblemente un log P mayor que 1, más preferiblemente mayor que aproximadamente 2, lo más preferiblemente mayor que aproximadamente 3.

El agente activo o agente cosmético empleado en las diferentes realizaciones de la invención presenta preferiblemente una baja solubilidad en agua. Preferiblemente, el compuesto presenta una solubilidad menor que 0,1 mg/ml, más preferiblemente menor que 0,01 mg/ml y lo más preferiblemente menor que 0,001 mg/ml en agua a pH fisiológico a temperatura normal.

Preferiblemente, el agente activo comprendido en los liposomas de la presente invención es un agente terapéuticamente o diagnósticamente activo. Lo más preferiblemente, el compuesto es terapéuticamente activo.

Preferiblemente, el agente activo o agente cosmético es una molécula con un peso molecular menor que 2000 Da, más preferiblemente menor que 1000 Da.

En un aspecto, el agente activo puede seleccionarse del grupo que comprende: abarelix, altretamina, anastrozol, aprepitant, bicalutamida, camptotecinas, capecitabina, clorotrianiseno, estrógenos conjugados, ciclosporina, dactinomicina, dietilestilbestrol, docetaxel, dolasetrón, dromostanolona, epirrubicina, epotilones, por ejemplo, epotilón B, epotilón D o derivados de epotilón, por ejemplo, como se describe en las patentes internacionales WO2004048372, WO2004007492, WO2005051947 y WO2005030767 (cuyo contenido se incorpora en la presente memoria por referencia), suberlotinib, etinilestradiol, exemestano, fentanilo, flavopiridol, fluoximesterona, fulvestrant, gefitinib, granisetrón, hesperetina, hidromorfoina, irinotecán, ketoconazol, lapatinib, letrozol, leuprolida, lomustina, lucantona, marinol, masoprocol, megestrol, nabilona, nilutamida, palonosetrón, porfimer, quinestról, quinestról, tamoxifeno, taxanos, temsirolimus, testolactona, topotecán, toremifeno, trimetrexato, valrubicina, vinblastina, vitamina E y derivados de estos compuestos. El compuesto mencionado en las reivindicaciones es un taxano, lo más preferiblemente paclitaxel o un derivado del mismo.

En un cierto aspecto de la invención, el agente activo no es una molécula de nucleótido o polinucleótido como una

molécula de ADN o ARN.

En otro aspecto, el alcance de la invención no comprende agentes activos que se ionicen durante la formulación y/o agentes activos que sean compuestos muy solubles en agua como, por ejemplo, adriamicina.

5 Preferiblemente, los liposomas de la invención comprenden entre aproximadamente 2,5 % en moles y aproximadamente 4,5 % en moles de paclitaxel en las membranas liposomales. Así, el paclitaxel puede representar preferiblemente una cantidad de entre aproximadamente 2,5 % en moles y aproximadamente 4,5 % en moles de la cantidad de todas las moléculas presentes en las membranas tales como lípidos y moléculas relacionadas y paclitaxel. Más preferiblemente, estos liposomas muestran una liberación de fármaco impedida como una suspensión y/o después de rehidratación y/o no forman sustancialmente cristales durante el almacenamiento, como se define en la presente memoria a continuación.

10 En una realización especialmente preferida de la invención, los liposomas son liposomas catiónicos, por ejemplo, liposomas catiónicos que comprenden DOTAP, DOFC y paclitaxel en una relación molar de aproximadamente 50:47:3. Las formulaciones de esta composición son conocidas en la técnica como MBT-0206 o EndoTAG-1. La fabricación de preparaciones liposomales que comprenden DOTAP, DOFC y paclitaxel se describe en la patente internacional WO 2004/002468, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria como referencia.

15 En general, los liposomas pueden prepararse por métodos que son conocidos para el experto en la materia. Varios métodos para preparar liposomas son descritos por New et al. (1990).

Preferiblemente, los liposomas empleados en la presente invención se preparan por inyección de etanol.

20 En una realización especial de la invención, los liposomas presentan un potencial zeta positivo, más preferiblemente a potencial zeta mayor que aproximadamente + 30 mV.

La sustancia osmóticamente activa empleada en el método inventivo o comprendida en las composiciones inventivas es una sustancia soluble que no puede permear sustancialmente de una bicapa de lípidos. Preferiblemente, la sustancia osmóticamente activa está presente en el interior y exterior de los liposomas.

25 La sustancia osmóticamente activa puede ser una molécula orgánica como un sacárido, por ejemplo, un mono-, di-, oligo- o polisacárido, un alcohol de azúcar, un aminoácido, un péptido, una proteína, un polímero soluble en agua, una sal orgánica o inorgánica, ión o una combinación de los mismos.

30 Los sacáridos útiles incluyen azúcar y alcoholes de azúcar, oligosacáridos, polisacáridos solubles en agua y derivados de los mismos. Los sacáridos preferidos según la invención incluyen glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, celobiosa, galactosa, maltotriosa, maltopentosa, rafinosa, dextrina, dextrano, inulina, manitol, sorbitol, xilitol, quitosán y lo más preferiblemente trehalosa.

Ejemplos de polímeros solubles en agua son polietilenglicoles, alcohol polivinílico, poliacrilatos o polivinilpirrolidona.

35 En un cierto aspecto, el uso de una sustancia osmóticamente activa en el método inventivo o composiciones inventivas excluye el uso de agentes complejantes que faciliten la solubilización de compuestos que presentan una baja solubilidad en agua. Ejemplos de tales agentes complejantes son ciclodextrinas como describen Zhang et al., en la patente internacional WO 2007/005754 o MacLachlan et al., en la patente internacional WO 2007/012191.

El medio acuoso o la fase acuosa usados en el contexto de la presente invención pueden comprender uno o más constituyentes adicionales que sean al menos parcialmente miscibles con agua, tales como alcoholes (por ejemplo, alcoholes C<sub>1-4</sub> tales como etanol) o cetonas (por ejemplo, cetonas C<sub>1-4</sub> tales como acetona). En una realización preferida de la invención, la fase acuosa contiene etanol.

40 La fase acuosa puede comprender además una sustancia tampón u otros agentes estabilizantes. Las sustancias tampón adecuadas se seleccionan de, por ejemplo, ácido cítrico, Tris, Bis, ácido fosfórico, ácido láctico y similares, preferiblemente ácido cítrico. La sustancia tampón puede estabilizarse a pH del medio acuoso entre aproximadamente 3 y 7, preferiblemente entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5.

45 Preferiblemente, la preparación liposomal de la etapa a) se fabrica mezclando una disolución orgánica (por ejemplo, etanol) que comprende lípidos y opcionalmente un agente activo o agente cosmético en un medio acuoso que comprende al menos una sustancia osmóticamente activa caracterizada por una osmolaridad total O<sub>1</sub>.

El intervalo preferido de gradientes osmóticos, O<sub>int</sub>-O<sub>ext</sub>, es entre 10 mOsm y 2000 mOsm, más específicamente entre 50 mOsm y 1000 mOsm e incluso más específicamente entre 100 mOsm y 1000 mOsm.

50 Los gradientes osmóticos también pueden indicarse por la diferencia de concentración/peso entre la concentración/peso de la sustancia osmóticamente activa interior del volumen liposomalmente encapsulado y la concentración/peso de la sustancia osmóticamente activa exterior del volumen liposomalmente encapsulado. El intervalo preferido de gradientes osmóticos es una diferencia de concentración/peso entre 5% y 30% en peso, es decir, un gradiente entre 0% y 30% en peso de la sustancia osmóticamente activa exterior al volumen encapsulado y

entre 10% y 40% en peso de la sustancia interior al volumen encapsulado.

La preparación liposomal procedente de la etapa a) puede someterse a una etapa de homogenización, que puede realizarse por extrusión, filtración por filtros de membrana, homogenización de alta presión y/u homogenización de alta velocidad y lo más preferido por extrusión a través de una membrana, por ejemplo, con un tamaño de poro de aproximadamente 200 nm bajo presión. También pueden usarse membranas con otros tamaños de poro tales como 50 nm, 100 nm, 150 nm, 400 nm, conocidos en la técnica. Puede realizarse filtración a través de filtros de membrana por filtración por membranas constituidas por filtros de PVDF, PES, nailon, pero también pueden usarse otros materiales si se define que sean adecuados. El tamaño de poro de las membranas está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 200 nm a 450 nm, pero el tamaño de poro no está limitado a los tamaños mencionados. Pueden combinarse diferentes materiales y diferentes tamaños de poro de una manera para obtener una disolución que pueda tratarse por una filtración de grado esterilización. En una realización preferida, los liposomas procedentes de la etapa a) son sometidos a homogenización antes de que se genere un gradiente osmolar.

Puesto que la esterilidad es una característica imperativa para los productos farmacéuticos, las suspensiones liposomales empleadas en el procedimiento inventivo pueden ser esterilizadas en alguna fase durante el procedimiento. Preferiblemente, las suspensiones son esterilizadas por filtración a través de la membrana de filtración estéril de grado esterilización (0,22 µm). En una realización preferida, las suspensiones liposomales son esterilizadas por filtración después de que se genera un gradiente osmolar según la etapa b) de la invención.

Según el concepto general de la invención, el gradiente osmótico entre el volumen encapsulado y el volumen libre puede generarse o modificarse una vez o varias veces en diferentes fases durante el procedimiento de producción de una preparación liposomal. Esto puede conseguirse posiblemente por los mismos procedimientos o diferentes como se describe en lo que sigue.

En una realización preferida de la invención, la etapa b) del procedimiento inventivo puede comprender las etapas de:

b1) deshidratar la preparación liposomal procedente de la etapa a) para obtener una preparación deshidratada liposomal y

b2) rehidratar dicha preparación deshidratada liposomal, preferiblemente en un medio acuoso en condiciones, en las que se obtiene una preparación liposomal sometida a tensión.

Dentro del significado de la presente invención "preparación liposomal procedente de la etapa a)" se refiere a una preparación liposomal preparada en la etapa a) o cualquier preparación liposomal que pueda obtenerse de la preparación liposomal preparada en la etapa a) por diferentes etapas del procedimiento. Estas etapas del procedimiento pueden incluir, por ejemplo, homogenización y/o esterilización como se describió anteriormente.

En una realización preferida, la generación o alteración de un gradiente osmótico se realiza al menos una vez después de la fabricación de la primera preparación liposomal en la etapa a) y antes de la deshidratación de dicha preparación liposomal procedente de la etapa a). Preferiblemente, la generación o alteración del gradiente osmolar se realiza después de una etapa de extrusión y/o después de filtración estéril. Como se mencionó anteriormente, el gradiente osmolar mejora la estabilidad de la suspensión liposomal sometida a las etapas del procedimiento.

Preferiblemente, la deshidratación se realiza a temperaturas por encima de la temperatura ambiente.

En una realización especialmente preferida de la invención, la deshidratación de la etapa b1) se realiza por secado por pulverización de la suspensión liposomal. En el procedimiento de secado por pulverización, se atomiza primero la suspensión liposomal en gotitas pequeñas pulverizando dicha suspensión. Con posterioridad, se secan los liposomas por la evaporación del medio de las gotitas a temperaturas elevadas. El secado de los liposomas después de la formación de gotitas puede conseguirse poniendo en contacto las gotitas con una corriente gaseosa, posiblemente calentada, seca, proporcionada, para obtener partículas sólidas. La posible corriente gaseosa puede ser un gas inerte o aire. El gas de secado puede ser preferiblemente un gas pobre en oxígeno que contenga menos de 0,1% en volumen, preferiblemente menos de 0,05% en volumen, oxígeno o un gas exento de oxígeno. Los gases inertes aumentan la seguridad de sistemas de secado caliente que contienen disoluciones muy inflamables, bombeando nitrógeno, dióxido de carbono, helio, neón, argón, kriptón, xenón y radón o algunos otros gases inertes para desplazar el oxígeno. El efecto de estos sistemas es eliminar completamente el oxígeno o reducirlo a un nivel insignificante. En una realización preferida, se usa nitrógeno como un gas inerte. En otra realización de la invención, el gas inerte protege los ingredientes activos y los excipientes contenidos en la formulación. Preferiblemente, se realiza el secado por pulverización en un dispositivo adecuado para secado por pulverización. Los liposomas deshidratados se separan de la corriente gaseosa y se recogen. El secado por pulverización puede realizarse a presión en exceso, presión normal o vacío parcial. Puede existir un intervalo de presión del procedimiento favorable si se produce polvo conforme a la memoria descriptiva con el gas de secado a la máxima temperatura del sistema permisible y a la máxima capacidad. Para la selección de condiciones de secado, tiene que tenerse en cuenta la combinación de parámetros como velocidad de alimentación líquida, velocidad de gas de secado, temperatura del

- gas de secado, parámetros termodinámicos de los excipientes y límites de estabilidad de los compuestos. Son parámetros importantes la temperatura de entrada del gas de secado  $T_{\text{interior}}$  y la temperatura de salida,  $T_{\text{exterior}}$ , que está presente en el interior del secador por pulverización. La  $T_{\text{exterior}}$  es sustancialmente menor que la  $T_{\text{interior}}$  debido a enfriamiento adiabático en la evaporación. La temperatura real de la superficie de las partículas puede ser significativamente menor que  $T_{\text{exterior}}$ , dependiendo de la velocidad de evaporación local. Por lo tanto, no pueden definirse parámetros de secado por pulverización genéricos. Para secar liposomas, la temperatura en el interior de la cámara del procedimiento puede oscilar entre 10°C y 200°C. Más típicamente, la suspensión se seca por el método de la invención con 30°C a 150°C y más preferiblemente de aproximadamente 60°C a aproximadamente 120°C.
- El equipo para el procedimiento de secado por pulverización puede obtenerse de Büchi (Flawil, Suiza) o GEA Niro (Soeborg, Dinamarca) o fabricado por encargo. El experto en la materia puede seleccionar las condiciones del procedimiento de secado, por ejemplo, velocidades de alimentación y temperaturas, dependiendo de la suspensión que se tenga que secar, el equipo usado y las especificaciones deseadas.
- Especialmente, las condiciones de la etapa de deshidratación pueden elegirse para obtener una composición liposomal deshidratada con una cantidad muy baja de disolvente orgánico. La deshidratación por secado por pulverización es adecuada especialmente para obtener cantidades bajas de disolvente orgánico residual.
- También, la deshidratación por secado por pulverización como se describe en la presente memoria da como resultado una composición de liposomas deshidratada en forma de un polvo vertible. Dichos polvos presentan propiedades de manipulación mejoradas, por ejemplo, con respecto a la carga de dichas composiciones deshidratadas, cuando se compara con composiciones deshidratadas obtenidas por secado por congelación que presentan una estructura tipo tarta.
- En un aspecto de la invención, la deshidratación no afecta sustancialmente a la relación entre compuesto osmóticamente activo encapsulado y libre cuando se compara la relación en la suspensión liposomal que ha sido sometida a secado por pulverización y la relación en la preparación secada por pulverización después de rehidratación en agua.
- En un cierto aspecto de la invención, la deshidratación por liofilización o secado por congelación, en la que se congela una suspensión liposomal y se somete con posterioridad a presión reducida para retirar moléculas de agua, no está incluida dentro del alcance de la invención.
- La composición deshidratada, por ejemplo, como se obtiene en la etapa b1) o c) puede ser cargada en contenedores adecuados y puede ser almacenada durante un cierto periodo de tiempo. Preferiblemente, la composición es cargada y almacenada en condiciones estériles. El tiempo de almacenamiento puede ser de varios días a varios meses o incluso años. La composición puede ser almacenada a temperatura ambiente, a temperaturas entre 2°C y 8°C o por debajo de 0°C.
- Antes de que se use la composición liposomal deshidratada, por ejemplo, administrada a un paciente en el caso de una composición liposomal usada como composición farmacéutica, o tratada adicionalmente, la composición deshidratada se rehidrata según la etapa b2) o c). Para este fin, la composición deshidratada obtenida como se describió anteriormente se mezcla con un medio acuoso. Para mejorar la rehidratación, la mezcla puede ser agitada o removida.
- La osmolaridad del medio acuoso usado para rehidratación es menor que la osmolaridad total  $O_1$  de la suspensión que había sido sometida a la etapa de deshidratación. Preferiblemente, en medio acuoso usado para rehidratación no comprende sustancialmente sustancias osmóticamente activas. Lo más preferiblemente, se usa agua de calidad farmacéutica para inyección para rehidratación.
- En algunas realizaciones, el volumen de medio acuoso usado para rehidratación puede ser mayor que el volumen de suspensión liposomal que ha sido deshidratada para obtener la cantidad perspectiva de composición liposomal deshidratada.
- Según la invención, la osmolaridad del medio acuoso usado para rehidratación y el volumen del medio usado para rehidratación se seleccionan en una combinación para obtener una suspensión rehidratada que presenta una osmolaridad  $O_2$  total que es menor que la osmolaridad  $O_1$  de la suspensión que ha sido sometida a la etapa de deshidratación.
- En otro aspecto de la invención, la etapa b) se realiza por dilución de la suspensión liposomal procedente de la etapa a) para proporcionar un medio acuoso con una osmolaridad  $O_2$  total que es menor que  $O_1$ .
- La suspensión liposomal se diluye con un medio acuoso como se describió anteriormente. En una realización preferida, la suspensión liposomal se diluye con agua. En una realización, el medio acuoso usado para diluir la suspensión liposomal no comprende un agente activo, especialmente no un agente activo que tenga que estar encapsulado en los liposomas.
- En una realización preferida de la invención,  $O_2$  es al menos 10 mOsm menor que  $O_1$ , más preferiblemente  $O_2$  es al

menos 50 mOsm menor que  $O_1$  e incluso más preferiblemente  $O_2$  es al menos 100 mOsm menor que  $O_1$ .

En otro aspecto de la invención, la etapa b) se realiza por diálisis de la suspensión liposomal procedente de la etapa a) contra un medio acuoso con una osmolaridad total que es menor que  $O_1$ .

5 Preferiblemente, se realiza diálisis en condiciones para proporcionar un gradiente osmótico entre  $O_1$  y la osmolaridad del medio acuoso contra el que se realiza la diálisis de al menos 10 mOsm, más preferiblemente al menos 50 mOsm e incluso más preferiblemente al menos 100 mOsm.

Alternativamente, la etapa b) puede realizarse por otros métodos adecuados. Por ejemplo, la concentración de la sustancia osmóticamente activa puede ser reducida por métodos cromatográficos adecuados, tales como cromatografía de intercambio iónico o de afinidad.

10 En un aspecto más de la invención, puede deshidratarse la suspensión liposomal sometida a tensión obtenida según la etapa b) el procedimiento descrito como anteriormente. La deshidratación de dicha suspensión liposomal sometida a tensión puede realizarse por cualquier procedimiento adecuado conocido para el experto en la materia. Los procedimientos de secado adecuados son, por ejemplo, secado por congelación, secado por pulverización y congelación o secado por pulverización. En una realización preferida, puede realizarse deshidratación por secado por pulverización como se describió anteriormente para la etapa b<sub>1</sub>). En un aspecto más de la invención, la  
15 preparación liposomal deshidratada resultante se rehidrata como se describió anteriormente.

En una realización específica, la invención se refiere a un procedimiento en el que una suspensión liposomal inicial, que comprende preferiblemente liposomas catiónicos que comprenden DOTAP y opcionalmente DOFC como lípidos y que comprende además un agente activo lipófilo, preferiblemente paclitaxel, en la membrana liposomal, se prepara  
20 en una fase acuosa de trehalosa. La concentración de los constituyentes de la suspensión liposomal está presente en una concentración aproximadamente tres veces cuando se compara con la suspensión liposomal producida por el procedimiento que se usa finalmente, por ejemplo, administrada a un ser humano. Preferiblemente, la suspensión liposomal inicial presenta una concentración de lípidos aproximadamente 30 mM y aproximadamente 30 mg/ml, más preferiblemente 29,4 mg/ml de trehalosa. La suspensión liposomal inicial está opcionalmente homogeneizada por  
25 extrusión por una membrana en la siguiente etapa. Con posterioridad, la osmolaridad total de la suspensión liposomal es reducida, preferiblemente por un factor de 1,5, preferiblemente diluyendo el volumen de la suspensión liposomal con agua, por ejemplo, al volumen de 1,5 veces. Con posterioridad, la suspensión liposomal es esterilizada opcionalmente, preferiblemente por filtración. En la siguiente etapa, la suspensión liposomal se deshidrata, preferiblemente por secado por pulverización, para proporcionar una suspensión liposomal deshidratada.  
30 La suspensión liposomal deshidratada se rehidrata finalmente para proporcionar una suspensión liposomal, que se usa para su respectivo propósito, tal como administración a un ser humano. La última suspensión liposomal presenta preferiblemente una concentración de lípidos aproximadamente 10 mM y aproximadamente 10 mg/ml, preferiblemente 9,79 mg/ml de trehalosa.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para fabricar una preparación liposomal, que comprende:

- 35 i) proporcionar una suspensión liposomal, en la que al menos una sustancia osmóticamente activa está comprendida en la fase acuosa de la suspensión, en la que está presente una mayor osmolaridad en el interior del volumen liposomalmente encapsulado que en el exterior del volumen liposomalmente encapsulado,
- ii) incubar dicha suspensión liposomal con un componente lipófilo, opcionalmente en una forma no solubilizada,
- 40 iii) opcionalmente separar cualquier compuesto no solubilizado de la suspensión liposomal, por ejemplo, por filtración, centrifugación u otros métodos adecuados,
- iv) opcionalmente deshidratar la preparación liposomal y
- v) opcionalmente rehidratar la preparación liposomal deshidratada.

El agente activo presenta un log P mayor que 1 y dicho agente activo es un taxano.

45 Preferiblemente, el gradiente osmótico entre el interior y el exterior del volumen liposomalmente encapsulado está entre 10 mOsm y 2000 mOsm, más específicamente entre 50 mOsm y 1000 mOsm e incluso más específicamente entre 100 mOsm y 1000 mOsm.

En una realización preferida de la invención, la suspensión liposomal de la etapa i) no comprende un agente activo o agente cosmético.

50 Los liposomas que comprenden un gradiente osmótico de la etapa i) pueden prepararse como se describió anteriormente. En una realización preferida de la invención, no se añade principio activo o agente cosmético en la fabricación de la suspensión liposomal de la etapa i). La forma no solubilizada del agente activo o agente cosmético puede ser, por ejemplo, una forma cristalina, por ejemplo, de diferente morfología y tamaño o una forma de polvo.

En una realización de la invención, se separa agente no solubilizado de la dispersión después de la incubación. En

una realización preferida, el compuesto no disuelto se separa por centrifugación o filtración. La filtración puede realizarse en un filtro de jeringa.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a una preparación liposomal obtenida u obtenible por los procedimientos como se describió anteriormente. La preparación puede ser en forma deshidratada o en forma de una suspensión acuosa.

La preparación liposomal de la presente invención se usa preferiblemente en medicina, por ejemplo, en medicina humana o veterinaria. La preparación se administra preferiblemente por vía intravenosa. Más preferiblemente, la preparación es usada para el tratamiento de cáncer, tal como cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, leucemia, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario, cáncer de próstata y a tumores malignos infantiles tales como glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral, ependimoma, sarcoma de Ewing/familia de tumores, tumor germinal, extracraneal, enfermedad de Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, cáncer de hígado, meduloblastoma, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de tejido blando, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineales, tumores malignos poco comunes de la niñez, glioma de la vía visual e hipotalámico, tumor de Wilms y otros tumores de riñón infantiles y a tumores malignos menos comunes incluyendo leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda del adulto, linfoma no Hodgkin de adulto, tumor cerebral, cáncer cervical, tumores malignos infantiles, sarcoma infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cáncer esofágico, leucemia de células pilosas, cáncer de riñón, cáncer hepático, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer pancreático, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de piel, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de la vesícula biliar y de conductos biliares, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células uroteliales, carcinoma de la glándula tiroides, carcinoma testicular, cáncer vaginal, angiosarcoma, sarcoma de tejido blando, mesotelioma y carcinoma hepatocelular. En particular, el cáncer puede ser un cáncer metastásico y/o un cáncer resistente a (quimio)terapia clásica. La administración de la composición de la invención puede retardar o detener el progreso de la enfermedad o puede conducir a una remisión parcial o completa en un ser humano. Lo más preferiblemente, se trata el cáncer pancreático o de mama, especialmente cáncer de mama triple receptor negativo. La preparación liposomal de la presente invención puede administrarse en una dosis unitaria de aproximadamente 11 mg/m<sup>2</sup> de paclitaxel a aproximadamente 44 mg/m<sup>2</sup> de paclitaxel, preferiblemente en una dosis unitaria de aproximadamente 22 mg/m<sup>2</sup> de paclitaxel. Preferiblemente, las preparaciones se administran una vez o dos veces a la semana. Las preparaciones liposomales pueden usarse como se describe en las patentes internacionales WO2005/039533, WO 2006/117220 y WO 2007/107305.

Además, la preparación liposomal de la presente invención puede usarse como una preparación de diagnóstico o cosmética.

35 Además, la invención se refiere a una suspensión liposomal que comprende un principio activo o compuesto cosmético en las membranas liposomales, en la que los liposomas encapsulan un medio acuoso de una osmolaridad que es mayor que la osmolaridad del medio acuoso en el exterior del volumen liposomalmente encapsulado. El medio acuoso de la suspensión comprende al menos una sustancia osmóticamente activa. La diferencia entre osmolaridad del medio en el interior del liposoma y en el exterior del liposoma es preferiblemente al menos 10 mOsm, preferiblemente al menos 50 mOsm.

40 La diferencia de osmolaridad en el interior y en el exterior del liposoma induce un gradiente de presión osmótica que conduce a tensión de tracción en la membrana liposomal, tal como se describe en Hallet et al., 1993. De acuerdo con esto, la invención se refiere a una suspensión liposomal que comprende un principio activo o compuesto cosmético en la membrana liposomal, en la que la membrana liposomal está bajo tensión de tracción.

45 Los liposomas en los que la membrana liposomal está bajo tensión de tracción pueden obtenerse por aplicación de gradientes osmóticos como se describió anteriormente.

Pueden aplicarse varios métodos de caracterización fisicoquímica para determinar los gradientes osmolares y la tensión de tracción en preparaciones de liposomas. En muchos casos, las disoluciones de componentes osmóticamente activos presentan una densidad mayor que la del agua y la densidad cambia de manera invariable con la concentración del compuesto. Si la osmolaridad del volumen encapsulado del liposoma es mayor que el del volumen libre, esto afecta a la densidad de liposomas. Para trehalosa a una concentración de 5 % (150 mOsm) en agua la densidad es aproximadamente 0,02 g/l mayor que la del agua pura (Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press, Boca Raton, Florida). Por consiguiente, la diferencia de osmolaridad en el interior y en el exterior del liposoma conduce a una densidad diferente del medio en el interior del volumen liposomalmente encapsulado y el medio en el exterior del volumen liposomalmente encapsulado.

55 Así, es un aspecto más de la invención describir suspensiones liposomales, en las que el volumen liposomalmente encapsulado presenta una densidad mayor que el medio en el exterior del volumen liposomalmente encapsulado. La diferencia en densidad se proporciona por el gradiente osmolar preferido y la densidad de la disolución del respectivo compuesto osmóticamente activo. La densidad de las partículas coloidales, tales como liposomas, puede determinarse por ejemplo por métodos de ultracentrifugación.



Una realización específicamente preferida de las suspensiones liposomales inventivas que comprende un gradiente osmolar es una suspensión liposomal que comprende liposomas que comprenden DOTAP, DOFC y paclitaxel, preferiblemente en una relación molar de 50:47:3, a una concentración total de lípidos de aproximadamente 10 mM, trehalosa y opcionalmente ácido cítrico, suspendidos en una fase acuosa que comprende aproximadamente 10 mg/ml, especialmente 9,79 mg/ml de trehalosa y opcionalmente aproximadamente 0,011 mg/ml de ácido cítrico, en la que dichos liposomas presentan una densidad anhidra de al menos aproximadamente 1,1 g/ml, especialmente al menos aproximadamente 1,15 g/ml, al menos aproximadamente 1,17 g/ml o al menos aproximadamente 1,17 g/ml. Preferiblemente, dichos liposomas tienen un  $Z_{\text{promedio}}$  de aproximadamente 140 nm.

El procedimiento ya descrito permite la preparación de suspensiones liposomales que comprenden liposomas como se describió anteriormente que se caracterizan además por una distribución de tamaño de partícula controlado, donde la anchura del perfil de distribución de tamaños no se ensancha sustancialmente por el procedimiento de fabricación, como se caracteriza por ejemplo, por cambios del índice de polidispersidad (IP). Preferiblemente, el IP de la suspensión liposomal inventiva que comprende un gradiente osmolar no se eleva por más de 0,2, más preferiblemente no se eleva por más que 0,1, por la generación del gradiente osmolar.

En un aspecto más de la invención, el principio activo o compuesto cosmético sólo está sustancialmente comprendido en el compartimento de membrana de los liposomas en las preparaciones liposomales inventivas. Así, al menos aproximadamente 98 %, preferiblemente al menos aproximadamente 99 % de la cantidad molar de todo principio activo o compuesto cosmético presente en la preparación está embebido en la fase lipídica de las membranas liposomales. Sólo puede solubilizarse la cantidad restante en la fase acuosa de la preparación o puede estar presente en forma de principio activo o compuesto cosmético cristalizado.

Las suspensiones descritas en la presente memoria que pueden obtenerse por el procedimiento descrito son más estables con respecto a liberación de fármaco que las suspensiones liposomales convencionales comparables que se preparan sin un gradiente osmótico. La estabilidad temporal con respecto a liberación de fármaco de los liposomas es mayor y la formulación es menos susceptible de liberación de fármaco cuando se somete a tensión mecánica y/u otras tensiones. Preferiblemente, la liberación de fármaco puede ser impedida al menos durante 6 horas, preferiblemente al menos durante 12 horas, al menos durante 24 horas, al menos durante 2 días, al menos durante 7 días o al menos durante 14 días o más a 25°C, comparado con una suspensión sin un gradiente osmótico. La determinación de la liberación de fármaco depende del tipo de fármaco. Para liposomas cargados de paclitaxel, la liberación de fármaco puede ser controlada de manera sensible determinando partículas de fármaco (cristales) que se forman después de la liberación. Las partículas pueden determinarse, por ejemplo, por mediciones de difracción de rayos X o técnicas de dispersión de la luz.

En una realización de la invención, al menos aproximadamente 90 %, preferiblemente al menos aproximadamente 95 %, lo más preferiblemente 99% de la cantidad de principio activo o compuesto cosmético solubilizado por las membranas liposomales es mantenido en los liposomas durante al menos aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente y no es liberado a la fase acuosa de las suspensiones. Puesto que la liberación de principio activo o compuestos cosméticos lipófilos, que presentan una baja solubilidad en dicha fase acuosa, pueden conducir a formación de cristal, las suspensiones inventivas no forman sustancialmente cristales en una cantidad correspondiente a más de aproximadamente 10%, preferiblemente más de aproximadamente 5%, lo más preferiblemente más de aproximadamente 1 % del material solubilizado en 24 horas a 25°C.

También, las suspensiones liposomales inventivas obtenidas por rehidratación de una composición liposomal deshidratada, como se describió anteriormente, no forman agregados durante un periodo de al menos aproximadamente 24 horas a 25 °C. La formación de agregados puede determinarse midiendo cambios en el  $Z_{\text{promedio}}$  e IP por espectroscopía de correlación fotónica (PCS, por sus siglas en inglés). Las suspensiones inventivas se caracterizan por cambios del  $Z_{\text{promedio}}$  por no más de un factor de aproximadamente 1,5, preferiblemente no mayor que 1,25 y cambios del valor del IP por no más de un factor de aproximadamente 2, preferiblemente no mayor que aproximadamente 1,5, lo más preferiblemente no mayor que aproximadamente 1,25 durante 24 horas. Preferiblemente, las suspensiones liposomales con estas propiedades proceden de la rehidratación de una composición liposomal deshidratada.

Puesto que los disolventes orgánicos se usan con frecuencia en la preparación de liposomas, por ejemplo, como se describió anteriormente para el método de inyección de etanol, se encuentra normalmente disolvente orgánico residual, tal como etanol, en el producto liposomal deshidratado y, de acuerdo con esto, en la suspensión liposomal rehidratada procedente de ahí. Este es especialmente el caso para preparaciones liposomales que han sido deshidratadas por secado por congelación (liofilización). Sin embargo, es deseable para producto liposomal usado para aplicación a seres humanos comprender tan poco disolvente orgánico como sea posible. La presente invención permite la deshidratación por secado por pulverización, que facilita la eliminación de la mayoría o todo el disolvente orgánico residual, mientras se obtienen liposomas con una alta estabilidad. De acuerdo con esto, es otro aspecto de la invención, describir preparaciones liposomales deshidratadas, como se describió anteriormente, que comprenden aproximadamente menos de 1 % p/p, más preferiblemente aproximadamente menos de 0,5 % p/p, lo más preferiblemente aproximadamente menos de 0,1 % p/p de disolvente orgánico basado en el peso total de la preparación deshidratada. Por rehidratación de estas preparaciones liposomales deshidratadas, se obtienen suspensiones liposomales, que comprenden aproximadamente menos de 1 mg/ml, más preferiblemente

aproximadamente menos de 0,5 mg/ml, lo más preferiblemente aproximadamente menos de 0,1 mg/ml de disolvente orgánico. Preferiblemente, el disolvente orgánico es etanol.

Además, las suspensiones liposomales inventivas, que se obtienen por rehidratación de una composición liposomal deshidratada como se describió anteriormente, presentan un perfil de distribución de tamaño muy similar comparado con las suspensiones liposomales originales que fueron deshidratadas como se describió anteriormente. Más específicamente, se mantiene bien el tamaño de los liposomas y no se encuentra una formación significativa de agregados lipídicos cuando se determina a partir de medición de PCS. En una realización de la invención, la suspensión liposomal sometida a deshidratación y la suspensión liposomal obtenida por rehidratación como se describió anteriormente se caracterizan por un  $Z_{promedio}$  que difiere por menos de un factor de 1,5 y un valor de IP que difiere por menos de un factor de dos (de mediciones de PCS). El IP de la suspensión liposomal rehidratada 1 hora después de reconstitución es preferiblemente menor que 0,4, más preferiblemente menor que 0,3, lo más preferiblemente menor que 0,25. Preferiblemente, el IP de dichas suspensiones sólo cambia ligeramente durante 24 horas a 25°C, como se describió anteriormente.

En una realización especial, la invención se refiere a una suspensión liposomal acuosa rehidratada que comprende liposomas catiónicos que comprenden hasta aproximadamente 5 % en moles, preferiblemente hasta aproximadamente 3 % en moles de paclitaxel en las membranas liposomales, en la que el IP de la suspensión liposomal 1 hora después de reconstitución es menor que 0,4, más preferiblemente menor que 0,3, lo más preferiblemente menor que 0,25 y además se caracteriza por cambios del  $Z_{promedio}$  por no más de un factor de aproximadamente 1,5, preferiblemente no mayor que 1,25 y cambios en el valor del IP por no más que un factor de aproximadamente 2, preferiblemente no mayor que aproximadamente 1,5, lo más preferiblemente no mayor que aproximadamente 1,25 durante 24 horas a 25°C.

Preferiblemente, los liposomas de la suspensión liposomal rehidratada descrita anteriormente no liberan más de aproximadamente 2% en peso, preferiblemente no más de aproximadamente 1% en peso, de paclitaxel (basado en el peso total de paclitaxel) de las membranas liposomales en el medio acuoso en 24 horas a 25°C.

## 25 Leyendas de las figuras

**Figura 1:** Cantidad de paclitaxel solubilizado por preparaciones de liposomas con una concentración lipídica de 10 mM y una concentración total de trehalosa de 10 % (p/p). Los liposomas fueron obtenidos de formulaciones de precursor concentradas por dilución con agua. La abscisa muestra la concentración inicial, es decir, los datos en trehalosa al 10% fueron obtenidos a partir de una suspensión que no fue diluida y los datos en trehalosa al 40% fueron obtenidos a partir de una suspensión no diluida que era originalmente 40% (p/p) en trehalosa y 40 mM en lípido y que fue diluida 1+3 con agua.

**Figura 2:** Tasa de recuento de liposomas DOTAP/DOFC 10 mM obtenido de una formulación concentrada de lípido 30 mM en 30% (p/p) de trehalosa. La disolución fue diluida con mezclas de agua/trehalosa para diferente concentración total de trehalosa entre 30% y 10 % (p/p). Todas las formulaciones tuvieron la misma concentración final de lípidos de 10 mM, pero el gradiente de concentración de trehalosa entre fase acuosa encapsulada y libre fue como se indica mediante el eje x.

## Ejemplos

Carga de paclitaxel a liposomas con diferentes gradientes de trehalosa

Sumario

Se investigó el efecto de los gradientes osmolares sobre el reparto de paclitaxel en los liposomas en equilibrio con una fase acuosa saturada. Se produjeron liposomas con diferentes gradientes osmolares y se incubaron para cristales de paclitaxel. Todas las formulaciones tuvieron la misma composición; más precisamente, la concentración de lípidos y la concentración de trehalosa fueron  $C_{lipido} = 10$  mM y  $C_{trehalosa} = 10\%$  (p/p). Algunas de las formulaciones se prepararon y se extruyeron a mayor concentración de lípidos y trehalosa y se diluyeron con agua después de extrusión a la concentración final. De esta manera, se diluyó la fase acuosa libre, pero no se diluyó la fase acuosa encapsulada (despreciándose los efectos de hinchamiento e intercambio de soluto por los defectos). Se estableció un gradiente osmolar entre la fase acuosa encapsulada y la libre, que aumentó al aumentar la dilución. Se incubaron los liposomas así formados con paclitaxel seco y se determinó la cantidad de paclitaxel que era solubilizada por los liposomas. Se encontró un incremento invariable de paclitaxel solubilizado con dilución creciente (gradiente de concentración). Los resultados indican que la cantidad de paclitaxel que se reparte en la membrana de liposomas en equilibrio aumenta con el aumento de gradiente osmolar.

Materiales

## ES 2 640 563 T3

Paclitaxel, Lote 06/150	Cedarburg Pharmaceuticals
DOTAP, Lote MBA 113	Merck Eprova
DOFC, Lote G181 PC49	Avanti Polar Lipids
Agua, Milli-Q -Síntesis	Millipore
Trehalosa-Dihidratada, altamente pura	Senn Chemicals
Cloroformo, p.a.	Merck
Acetonitrilo, grado HPLC (ACN)	Merck
Tetrahidrofurano, grado HPLC (THF)	Merck
Acetato de amonio, p.a.	Merck
Ácido trifluoroacético, p.a.	Merck
Filtro de jeringa minisart	Sartorius
Tamaño de poro 0,2 µm, diámetro 25 mm	
Membrana: Acetato de celulosa	
HPLC System 1100	Agilent
Desgasificador (G1379A)	
Bomba binaria (G1312A)	
Automuestreador termostatzado (Autoinjektor G1329A, Thermostat G1330B)	
Compartimento de columna termostatzado (G1316A)	
Detector de red de diodos (G1315B) o detector de longitud de onda variable (G1314A)	
ChemStation para LC 3D, Rev. A.09.01	
Extrusora, 10 ml	Northern Lipids
Zetasizer 3000	Malvern Instruments

### Métodos

#### Preparación de liposomas vacíos

- 5 Las formulaciones de DOTAP/DOFC (relación 1:1) o formulaciones que comprenden solo DOTAP o DOFC, se prepararon por el método de película. Se pesaron las cantidades requeridas de lípidos en un matraz redondo y se disolvieron en cloroformo. Se evaporó el disolvente a sequedad en un evaporador rotatorio (Heidolph, Alemania) a una presión de aproximadamente 15 kPa (150 mbar) a una temperatura de aproximadamente 40°C durante aproximadamente 15 minutos. Se secó la película a 1 kPa (10 mbar) durante 60 minutos y se hidrató con
- 10 posterioridad en una disolución de trehalosa en agua agitando suavemente el matraz. Se eligieron cantidades de lípidos, concentración de trehalosa y volumen de disolución de trehalosa para dar como resultado suspensiones comprendiendo concentraciones de lípidos entre 10 mM y 40 mM y concentraciones de trehalosa entre 9,8% y 39,2% (p/v) para formulaciones de DOTAP/DOFC y concentración de lípido entre 10 mM y 30 mM y concentraciones

## ES 2 640 563 T3

- de trehalosa entre 9,8% y 29,4% (p/v) para DOTAP o DOFC solo formulaciones. Las suspensiones resultantes de liposomas multilaminares se extruyeron cinco veces por una membrana de policarbonato de un tamaño de poro de 200 nm a una presión de aproximadamente 500 kPa (5 bar). Después de extrusión, se diluyeron las suspensiones con agua para proporcionar suspensiones con concentraciones de lípido de 10 mM y una concentración total de trehalosa de 9,8% (p/v).

### Carga de paclitaxel

Se añadieron 5 ml de las suspensiones comprendiendo liposomas vacíos preparadas como se describió anteriormente a 2,6 mg de paclitaxel seco (que corresponde a una concentración teórica de paclitaxel de 600 µM) en tubos Falcon de 15 ml. Se agitaron los lotes durante 1 h a temperatura ambiente (agitador magnético).

- 10 Después de agitación, no se separó paclitaxel ligado liposomal por filtración de 2 ml de cada lote por un filtro de jeringa (Sartorius minisart, 0,2 µm, membrana de acetato de celulosa). Se analizó con posterioridad la concentración de paclitaxel y lípidos en los líquidos filtrados resultantes por HPLC.

### Métodos analíticos

#### Determinación de contenido de paclitaxel

- 15 Se diluyeron muestras en ACN/THF/acetato de amonio 2 mM 48/18/34 (v/v/v).

Fase estacionaria:	LiChroCART <sup>®</sup> 250-4; LiChrospher 60, RP-select B longitud 250 mm, DI: 4 mm, tamaño de partícula 5 µm
Fase móvil:	ACN/THF/acetato de amonio 2 mM 32/12/56 (v/v/v)
Caudal:	1 ml/min
Temperatura compartimento de columna:	35°C
Longitud de onda del detector:	229 nm
Volumen inyectado:	10 µl
Tiempo de funcionamiento:	40 min

#### Determinación de contenido en lípidos

El contenido en lípidos de los lotes antes y después de filtración fue analizado por HPLC para controlar una pérdida potencial de material liposomal por el procedimiento de filtración. Se diluyeron las muestras en ACN/agua 50/50.

Fase estacionaria:	Phenomenex Luna 5 µ C8(2) 100 Å, 150 mm x 2 mm
Fase móvil:	Acetonitrilo con TFA al 0,1%, agua con TFA al 0,1%

20

#### Determinación de lípidos del gradiente;

tiempo (min)	ACN (%)
0	50
4,12	50
7,06	75
14,13	100

## ES 2 640 563 T3

tiempo (min)	ACN (%)
21,20	100
23,56	50
30,00	50

Caudal:	0,4 ml/min
Temperatura compartimento de columna:	45°C
Longitud de onda del detector:	205 nm
Volumen inyectado:	5 µl
Tiempo de funcionamiento:	30 min

### Resultados

#### 5 Formulaciones de DOTAP/DOFC

En la figura 1 se muestra la cantidad de paclitaxel que se solubilizó por incubación con diferentes formulaciones de liposomas DOTAP/DOFC. Todas las formulaciones contenían la misma cantidad de lípido (liposomas) y trehalosa. Se obtuvieron de diferentes formulaciones más concentradas por dilución con agua. Excepto de la concentración absoluta, todas las formulaciones originales fueron equivalentes y se trataron de la misma manera. La abscisa proporciona la concentración de trehalosa inicial, antes de dilución. Debido a que en todos los casos la concentración final de trehalosa total fue 10%, el gradiente de trehalosa aumenta con valores crecientes de la abscisa. Como puede observarse, la cantidad de paclitaxel que fue solubilizada por los liposomas aumentó de manera invariable con el gradiente de trehalosa (dilución). La capacidad de carga de los liposomas aumentó con el gradiente creciente de trehalosa.

#### 15 Formulaciones de DOTAP y DOFC

La siguiente tabla muestra la cantidad de paclitaxel solubilizada por formulaciones de liposomas de DOTAP y DOFC (componentes únicos) dependiendo de la concentración inicial de trehalosa usada para la preparación:

Tabla 1: Formulaciones de DOTAP y DOFC

C <sub>0</sub> trehalosa (%)	Concentración de paclitaxel (µM)	
	DOTAP	DOFC
9,8	163	159
12,3	192	167
14,7	225	192
17,2	297	224
19,6	289	217
24,5	297	289

C <sub>0</sub> trehalosa (%)	Concentración de paclitaxel (µM)	
	DOTAP	DOFC
29,4	339	221

5 También para los liposomas de lípido puro se observó una clara de tendencia en la capacidad de solubilización del gradiente de trehalosa. Para formulaciones de DOTAP, se observó un incremento de la capacidad de carga de paclitaxel con una diferencia de concentración de trehalosa creciente en el interior y en el exterior del liposoma comparable con los resultados para formulaciones de DOPTAF/DOFC. El efecto fue menos pronunciado para liposomas consistiendo en 100% DOFC.

## 2. Carga de paclitaxel para liposomas con diferentes gradientes de trehalosa después de secado por pulverización

### 2.1 Sumario

10 El objetivo de este ejemplo fue ensayar si había el efecto positivo del gradiente osmótico sobre la carga de paclitaxel para los liposomas si los liposomas eran secados por pulverización entre la formación y el ajuste del gradiente de trehalosa. Se prepararon liposomas de DOTAP/DOFC en dos concentraciones diferentes, es decir, lípido 10 mM en disolución de trehalosa al 10% (p/p) y lípido 20 mM en disolución de trehalosa al 20% (p/p). Las dos formulaciones fueron secadas por pulverización a la respectiva concentración. Los polvos secados por pulverización fueron reconstituidos ambos con agua a una concentración de lípido de 10 mM y una correspondiente concentración de trehalosa de 10% (p/p). Las formulaciones líquidas fueron expuestas a paclitaxel como se describió anteriormente y se determinó la cantidad de paclitaxel solubilizada. Se encontró que la formulación que era secada por pulverización a partir de la doble formulación de estado concentrado (lípido 20 mM / trehalosa al 20% (p/p)) solubilizó más paclitaxel que la que se secó por pulverización del estado concentrado único (lípido 10 mM, trehalosa al 10 % p/p).

20 Los resultados indican que la distribución de trehalosa en el interior/exterior de los liposomas no se vio afectada por el secado por pulverización en las condiciones seleccionadas. Después de la reconstitución del doble producto concentrado anteriormente, se obtuvieron liposomas con un gradiente de concentración de trehalosa, correspondiendo al efecto de dilución directa de la formulación líquida.

### 2.2 Métodos

#### Formación de liposomas

25 Las formulaciones fueron preparadas por inyección de etanol. Se inyectaron las cantidades apropiadas de disolución de lípidos en etanol (DOTAP-Cl 200 mM, DOFC 188 mM) con agitación en una disolución de trehalosa en agua. La concentración de trehalosa fue 20% (p/p) para los liposomas 20 mM y 10 % (p/p) para los liposomas 10 mM. La cantidad requerida de disolución de lípidos en etanol fue aproximadamente 2,5 ml/l para la formulación 10 mM y 5 ml para la formulación 20 mM.

30 Se extruyeron las formulaciones de liposomas polidispersas resultantes cinco veces a través de membranas de policarbonato de tamaño de poro de 200 nm a una presión de aproximadamente 500 kPa (5 bar).

#### Secado por pulverización

35 Se realizó secado por pulverización con un secador por pulverización Niro SD micro usando una boquilla de dos fluidos. Las condiciones de pulverización fueron como sigue: Temperatura de salida = 100°C, temperatura de entrada = 145°C, caudal= 340 g/h, velocidad del gas del atomizador 2,3 kg/h, velocidad del gas de secado 30 kg/h.

#### Reconstitución

Los polvos secos, ambos de la formulación previamente 10 mM y la formulación previamente 20 mM, fueron reconstituidos con agua a la concentración de lípidos de 10 mM.

#### Prueba de carga de paclitaxel

40 Se realizó carga de paclitaxel a los liposomas como se describe en

### 2.3 Resultados

Se muestran los resultados como se obtuvieron a partir de la carga de paclitaxel para los polvos reconstituidos en la tabla 2. Como puede observarse, la formulación que fue secada por pulverización a una concentración de lípidos 20

5 mM solubilizó mucho más paclitaxel que la formulación con la concentración inicial de lípidos de 10 mM. Se concluyó que la elevada carga de paclitaxel para la formulación 20 mM anterior era debida a un gradiente osmolar entre la fase acuosa encapsulada y libre, que no estaba presente en la formulación 10 mM anterior. El secado por pulverización y la reconstitución del polvo seco no condujo a equilibración de trehalosa entre la fase acuosa interior y la exterior y, por lo tanto, la osmolaridad de la fase acuosa encapsulada fue mayor en el caso de la formulación 20 mM anterior.

10 Tabla 2: Solubilización de paclitaxel por formulaciones obtenidas por reconstitución de polvos secados por pulverización. La concentración de lípidos y trehalosa fue idéntica en ambos casos (lípidos 10 mM, trehalosa al 10% p/p), pero antes de secar por pulverización una formulación fue lípidos 10 mM, trehalosa al 10% y la otra formulación fue lípidos 20 mM, trehalosa al 20%.

Concentración inicial de lípidos de la formulación	Concentración de paclitaxel solubilizado
10 mM (PD_L_07030)	164 (µM)
20 mM (PD_L_07031)	340 (µM)

### 3. Estabilidad de los liposomas cargados

#### 3.1 Sumario

15 Para evaluar la cuestión, si las preparaciones de liposomas con un gradiente de trehalosa interior/exterior no presentaban solo una mayor capacidad de carga, sino también una mayor estabilidad con respecto a la liberación de paclitaxel, la liberación de paclitaxel de los liposomas fue seguida como una función del tiempo. Se prepararon formulaciones con una fracción de paclitaxel relativamente alta, es decir 5% en moles y con diferentes gradientes de trehalosa entre 0 % y 20 % (p/p). Los liposomas que comprendían un gradiente de trehalosa no mostraron liberación de paclitaxel sustancial dentro del periodo ensayado de 21 días, mientras que en los liposomas sin un gradiente de trehalosa, la fracción retenida de paclitaxel disminuyó a menos de 1%.

#### 3.2 Método

##### Formulaciones de DOTAP/DOFC

25 Se prepararon liposomas DOTAP/DOFC que comprendían aproximadamente 5% en moles de paclitaxel (para valores exactos véase la tabla), 10 a 30 mM de lípidos y 9,8% a 29,4% (p/v) de trehalosa según el método de película descrito anteriormente por adición de la cantidad perspectiva de lípidos y paclitaxel a la disolución de cloroformo. Con posterioridad, se diluyeron los lotes 30 mM a una concentración de lípidos de 10 mM (concentración de trehalosa total 9,8% p/v) con agua.

Se almacenaron las muestras a 4°C y se determinó el contenido en paclitaxel de los liposomas después de 0, 1, 5, 14 y 21 días por el método descrito anteriormente usando filtración y análisis por HPLC.

#### 30 3.3 Resultados

Los resultados se resumen en la Tabla 3. Se muestra la concentración de paclitaxel (µM) retenido en los liposomas. La concentración de lípidos fue 10 mM, por lo tanto, la concentración de paclitaxel de 100 µM corresponde a una concentración molar con respecto a lípidos de 1 %.

35 En la formulación sin gradiente de trehalosa, la fracción de trehalosa retenida decayó invariablemente a un valor menor que 100 µM (menor que 1 % en moles con respecto a lípidos) después de 21 días. Por el contrario, con gradiente de trehalosa el paclitaxel retenido no cayó por debajo de 400 µM. No se observó decaimiento invariable en ese caso, en otras palabras, parece que el valor de aproximadamente 400 µM representa un estado físicamente estable de paclitaxel en los liposomas.

Tabla 3: Retención de paclitaxel en liposomas de DOTAP/DOFC.

	gradiente de concentración de trehalosa		
	0	10%	20%
	Paclitaxel liposomalmente retenido ( $\mu\text{M}$ )		
antes de filtración	470	444	425
t (d) después de filtración			
0	453	446	411
1	438	428	407
5	391	429	420
14	90	427	412
21	79	409	400

Las fracciones finales de paclitaxel retenido son similares a los valores como se obtienen a partir de la prueba de carga para liposomas tratados de manera equivalente. Por lo tanto, los datos de la prueba de carga pueden ser considerados como predictivos para el límite de estabilidad de liposomas cargados. Si no tienen lugar otros efectos, las cifras de la prueba de carga proporcionarán información acerca de la cantidad de paclitaxel que es retenido por los liposomas en las condiciones dadas. Como una conclusión adicional de los presentes ejemplos, parece que el gradiente de trehalosa y la estabilidad mejorada se mantiene completamente durante varios días. En el caso presente, el efecto se mantuvo durante 21 días.

#### 4. Métodos para la determinación de gradientes de trehalosa en preparaciones de liposomas in situ

##### 4.1 Sumario

Se prepararon formulaciones concentradas de liposomas en trehalosa a una concentración  $c_1$  y se diluyeron con agua o con disolución de trehalosa en diferentes relaciones para obtener medios con concentración  $c_2$  de trehalosa, donde  $c_2 \leq c_1$ . Todas las formulaciones tenían la misma concentración final de lípidos de 10 mM. Se analizaron las formulaciones basándose en cambios locales de propiedades ópticas (índice de refracción). Se usaron tasas de recuento de mediciones de dispersión de luz dinámica para demostrar los cambios de dispersión de intensidad. Con el incremento del gradiente de trehalosa,  $c_1$ - $c_2$ , la tasa de recuento de mediciones de dispersión de luz dinámica (PCS) aumentaron de manera invariable.

##### 4.2 Método

Se midió la dispersión de luz dinámica con un goniómetro BI-200SM de Brookhaven Instruments (Holtville USA). Se realizaron mediciones con un láser de 30 mW de una longitud de onda de 641 nm a un ángulo de  $90^\circ$ . Para el análisis de los datos se realizó transformación de Laplace inversa con técnicas de regularización optimizada.

##### 4.3 Muestras

Se prepararon liposomas de DOTAP/DOFC (relación molar 1:1) con una concentración total de lípidos de 30 mM en una disolución de trehalosa al 30%. Se extruyó la preparación de liposomas de lípido 30 mM, trehalosa al 30% a través de 200 membranas de extrusión. Con posterioridad, se diluyeron los liposomas con agua, disolución de trehalosa al 30% o mezclas de las mismas en relaciones como se indica en la tabla.

A: liposomas 30 mM en trehalosa al 30%

B: trehalosa al 30% en agua

C: Agua



Tabla 4: Protocolo de dilución para formulaciones de lípido 10 mM en una fase acuosa con trehalosa a concentraciones entre 10 % y 30 % (p/p)

#	Vol. A	Vol. B	Vol. C	Composición final
1	1	2	-	liposomas 10 mM en trehalosa al 30%
2	1	1,5	0,5	liposomas 10 mM en trehalosa al 25%
3	1	1	1	liposomas 10 mM en trehalosa al 20%
4	1	0,5	1,5	liposomas 10 mM en trehalosa al 15%
5	1	-	2	liposomas 10 mM en trehalosa al 10%

5 La concentración de lípidos en la preparación final fue siempre 10 mM, pero la concentración total de trehalosa varió entre 10% (dilución con agua) y 30% (dilución con disolución de trehalosa al 30%). Con la concentración inicial de trehalosa de 30%, esto dio como resultado un gradiente numérico de concentración de trehalosa entre 0% (concentración total = 30%) y 20 % (concentración total =10%). Una hora después de la dilución, se realizó medición de dispersión de luz dinámica.

#### 4.4 Resultados

10 La Figura 2 muestra los resultados de las mediciones de dispersión de luz dinámica. La tasa de recuento se proporciona como una función del gradiente de trehalosa. La tasa de recuento aumentó invariablemente con el gradiente de trehalosa creciente. Esto puede correlacionarse con el aumento de gradiente de índice de refracción y los efectos de hinchamiento sobre el gradiente de trehalosa creciente. Se sabe que los liposomas pueden actuar como osmómetros ideales y pueden determinarse gradientes osmolares a partir de propiedades de dispersión de la luz y de absorción de la luz en condiciones adecuadas (de Gier 1993; Cabral, Hennies et al. 2003). Además, la intensidad de la dispersión de luz cuasielástica, también pueden usarse otras técnicas de dispersión de la luz, así como mediciones de absorción y turbidimetría. Las presentes observaciones indican que analizar la tasa de recuento en mediciones de dispersión de la luz dinámica puede usarse como una herramienta para controlar el éxito de la formación de gradiente de trehalosa para una formulación determinada. Además, los datos confirman que el cambio de la osmolaridad del medio acuoso de una suspensión liposomal proporciona las propiedades físicas de los liposomas.

### 5. Influencia de un gradiente de trehalosa sobre la estabilidad física de formulaciones líquidas de liposomas de DOTAP/DOFC de paclitaxel

#### 5.1 Sumario

25 En este ejemplo, se investigó además el efecto estabilizador de gradientes de trehalosa sobre formulaciones de liposomas de DOTAP/DOFC de paclitaxel como se muestra por el Ejemplo 3. Se prepararon liposomas a una concentración de 30 mM (en disolución de trehalosa al 32 % p/p), diluida con diferentes disoluciones de trehalosa/agua y se determinó la liberación de paclitaxel después de tensión mecánica.

30 Se encontró que la estabilidad física aumentaba con el aumento del gradiente de trehalosa. Los hallazgos confirmaron el efecto estabilizador de los gradientes de trehalosa sobre paclitaxel comprendiendo liposomas también para tratamiento a escala piloto.

#### 5.2 Métodos y materiales

##### Fabricación de liposomas

35 Se produjeron liposomas por la técnica de inyección de etanol. Brevemente, se inyectó una disolución de DOTAP 200 mM y DOFC 188 mM (concentración total de lípidos 388 mM) con agitación a una temperatura de 2-8°C en la fase acuosa (8,11 ml de disolución de lípidos en etanol para 100 ml de fase acuosa) para proporcionar liposomas polidispersos con una concentración de lípidos de aproximadamente 30 mM. Para la fase acuosa se seleccionó una disolución de trehalosa dihidratada al 32,1 % p/p con ácido cítrico 184,5 µM.

40 Se realizó extrusión como se indica a una presión de 300 kPa (3 bar) con membranas de policarbonato de 220 nm de tamaño de poro. Se realizó filtración estéril como se indica usando filtros estériles milipak 20 o membranas durapore (Millipore, Molsheim, Francia).

Gradientes de concentración

Se diluyeron con agua las formulaciones de liposomas 30 mM iniciales en disolución de trehalosa al 30 % (p/p) (PD-L-09111) a diferentes concentraciones finales de lípidos y trehalosa.

Tabla 5: Dilución de muestras ensayadas

Nombre	PD-L-09111 (ml)	Agua (ml)	C <sub>lipido</sub> (mM)	C trehalosa (% p/p)	Δc trehalosa (% p/p)
PD-L-09111	100	0	30	30	0
PD-L-09112	70	70	15	15	15
PD-L-09113	90	54	18,8	18,8	11,2
PD-L-09114	100	0	30	30	0
PD-L-09115	80	64	16,7	16,7	13,3
PD-L-09116	100	40	21,4	21,4	8,6
PD-L-09119	100	24	25	25	5

5

Ensayo de estabilidad

Se pusieron las muestras en un agitador y se agitaron a 16 rad/s (150 rpm) a 25°C o a 2-8°C, respectivamente. Después de 24 y 48 horas, se analizaron las muestras y se determinó la cantidad de paclitaxel retenida en los liposomas.

10 Determinación de retención/liberación de paclitaxel en las preparaciones de liposomas

Se investigó la retención de paclitaxel en liposomas por filtración de las preparaciones de liposomas para retirar cristales de paclitaxel del producto liposomal (como se describe en el Ejemplo 3). Se cuantificó el paclitaxel restante por análisis HPLC. Adicionalmente, se usó microscopía óptica para investigar en las muestras cristales de paclitaxel.

5.3 Resultados

15 Los resultados se proporcionan en las Tablas 6-12. Por simplicidad, la concentración inicial de trehalosa se aproxima como 30% (p/p). Los gradientes de concentración como se representan se calculan de la concentración inicial de trehalosa y el factor de dilución. Los gradientes de concentración reales entre la fase acuosa encapsulada y libre tendrán la misma tendencia, pero los valores absolutos pueden diferir ligeramente de los proporcionados en las tablas.

20 Como puede observarse, la estabilidad aumenta al aumentar el gradiente de trehalosa. La cantidad de paclitaxel liposomalmente retenido aumenta y se observan menos cristales de paclitaxel. La estabilidad es mayor a 5 °C comparado con 25 °C.

Tabla 6: Estabilidad a gradiente de trehalosa al 0%

Número de partículas			Temp (°C)	tiempo (h)	Pérdida PXL en filtración (%)	Cristales en microscopía
> 1 μM	> 1 μM	> 25 μM				
PD-L-09111	30	0	5	24	<5	No
PD-L-09111	30	0	5	24	8	Sí
PD-L-09111	30	0	5	48	8	Sí
PD-L-09111	30	0	5	48	19	Sí

ES 2 640 563 T3

Número de partículas			Temp (°C)	tiempo (h)	Pérdida PXL en filtración (%)	Cristales en microscopía
> 1 µM	> 1 µM	> 25 µM				
PD-L-09111	30	0	25	24	86	Sí
PD-L-09111	30	0	25	24	86	Sí
PD-L-09111	30	0	25	48	85	Sí
PD-L-09111	30	0	25	48	85	Sí

Tabla 7: Estabilidad a gradiente de trehalosa al 5%

Muestra	C <sub>lipido</sub> (mM)	Δ C <sub>tre</sub> (p/p) (%)	Temp (°C)	tiempo (h)	Pérdida PXL en filtración (%)	Cristales en microscopía
PD-L-09119	25	5	5	24	<5	No
PD-L-09119	25	5	5	24	<5	No
PD-L-09119	25	5	5	48	<5	No
PD-L-09119	25	5	5	48	<5	No
PD-L-09119	25	5	25	24	29	Sí
PD-L-09119	25	5	25	24	44	Sí
PD-L-09119	25	5	25	48	70	Sí
PD-L-09119	25	5	25	48	69	Sí

Tabla 8: Estabilidad a gradiente de trehalosa al 8,6%

Muestra	C <sub>lipido</sub> (mM)	ΔC <sub>tre</sub> (p/p) (%)	temp (°C)	tiempo (h)	Pérdida PXL en filtración (%)	Cristales en microscopía
PD-L-09116	21,4	8,6	5	24	<5	No
PD-L-09116	21,4	8,6	5	24	<5	No
PD-L-09116	21,4	8,6	5	48	<5	No

ES 2 640 563 T3

Muestra	C <sub>lipido</sub> (mM)	ΔC <sub>tre</sub> p/p (%)	temp (°C)	tiempo (h)	Pérdida PXL en filtración (%)	Cristales en microscopía
PD-L-09116	21,4	8,6	5	48	<5	No
PD-L-09116	21,4	8,6	40	24	<5	No
PD-L-09116	21,4	8,6	40	24	<5	No
PD-L-09116	21,4	8,6	40	48	<5	Sí
PD-L-09116	21,4	8,6	40	48	<5	Sí

Tabla 9: Estabilidad a gradiente de trehalosa al 11,2%

Muestra	C <sub>lipido</sub> (mM)	Δ C <sub>tre</sub> p/p (%)	temp (°C)	tiempo (h)	Pérdida PXL en filtración (%)	Cristales en microscopía
PD-L-09113	18,8	11,2	5	24	<5	No
PD-L-09113	18,8	11,2	5	24	<5	No
PD-L-09113	18,8	11,2	5	48	<5	No
PD-L-09113	18,8	11,2	5	48	<5	No
PD-L-09113	18,8	11,2	40	24	<5	No
PD-L-09113	18,8	11,2	40	24	<5	No
PD-L-09113	18,8	11,2	40	48	<5	No
PD-L-09113	18,8	11,2	40	48	<5	No

Tabla 10: Estabilidad a gradiente de trehalosa al 13,3%

Muestra	C <sub>lipido</sub> (mM)	Δ C <sub>tre</sub> (% p/p)	temp (°C)	tiempo (h)	Pérdida PXL en filtración (%)	Cristales en microscopía
PD-L-09115	16,7	13,3	5	24	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	5	24	<5	No

ES 2 640 563 T3

Muestra	C <sub>lipido</sub> (mM)	Δ C <sub>tre</sub> (% p/p)	temp (°C)	tiempo (h)	Pérdida PXL en filtración (%)	Cristales en microscopía
PD-L-09115	16,7	13,3	5	48	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	5	48	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	40	24	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	40	24	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	40	48	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	40	48	<5	No

Tabla 11: Estabilidad a gradiente de trehalosa al 13,3%

Muestra	C <sub>lipido</sub> (mM)	Δ C <sub>tre</sub> (% p/p)	temp (°C)	tiempo (h)	Pérdida PXL en filtración (%)	Cristales en microscopía
PD-L-09115	16,7	13,3	5	24	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	5	24	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	5	48	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	5	48	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	40	24	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	40	24	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	40	48	<5	No
PD-L-09115	16,7	13,3	40	48	<5	No

Tabla 12: Estabilidad a gradiente de trehalosa al 15%

Muestra	C <sub>lipido</sub> (mM)	Δ C <sub>tre</sub> (% p/p)	temp (°C)	tiempo (h)	Pérdida PXL en filtración (%)	Cristales en microscopía
PD-L-09112	15	15	5	24	<5	No

Muestra	C <sub>lipido</sub> (mM)	$\Delta$ C <sub>tre</sub> (p/p) (%)	temp (°C)	tiempo (h)	Pérdida PXL en filtración (%)	Cristales en microscopía
PD-L-09112	15	15	5	24	<5	No
PD-L-09112	15	15	5	48	<5	No
PD-L-09112	15	15	5	48	<5	No
PD-L-09112	15	15	40	24	<5	No
PD-L-09112	15	15	40	24	<5	No
PD-L-09112	15	15	40	48	<5	No
PD-L-09112	15	15	40	48	<5	No

6. Estabilidad de liposomas cargados de paclitaxel secados por pulverización

6.1. Métodos y materiales

Se usaron materiales como se describió en los ejemplos previos.

- 5 Se formaron liposomas que consistían en DOTAP, DOFC y paclitaxel (relación molar 50/47/3) por las técnicas de inyección de etanol como se describió anteriormente. Se solubilizó el paclitaxel con los lípidos en la disolución de etanol. Se prepararon liposomas a una concentración de lípido 20 mM en trehalosa al 20% p/p (lote PD-L-09031) y lípido 10 mM en trehalosa al 10% (lotes MDG09.108-08-001 y PD-L-09032). Se extruyeron los liposomas cinco veces a través de membranas de policarbonato de 200 nm de tamaño de poro y se filtraron estériles como se describió anteriormente.

10 Después de la preparación de las suspensiones liposomales, se deshidrataron los liposomas. Se secaron por pulverización los lotes PD-L-09031 y PD-L-09031 en un secador de pulverización Niro SD-Micro con parámetros de secado por pulverización como se describió en el Ejemplo 2.

15 Se deshidrató el lote MDG09.108-08-001 por secado por congelación, usando una unidad de secado por congelación Epsilon 2-12D (Christ). La suspensión liposomal se mantuvo a 4°C durante 1 hora y se congeló a -40°C durante aproximadamente 5 horas. Después de congelación, se aumentó la temperatura a -16°C y se realizó secado primario a una presión de 10 kPa (0,1 bar) durante 90 horas. Para un secado secundario, se aumentó la temperatura a 20°C, mientras se reducía la presión a 1 kPa (0,01 bar).

20 Se reconstituyeron los polvos secos con agua a una concentración de lípido de 10 mM en trehalosa al 10,5 % (p/p). Se investigaron los productos liposomales líquidos resultantes una hora después de la reconstitución y 24 horas después de la reconstitución con mediciones de dispersión de la luz dinámica usando un Malvern Zetasizer 1000HSA, Serie DTS5101 (Ajustes: Análisis = monomodal, Dilatación = 1,2; Orden de ajuste = 3; Selección de punto primera = 18; Selección de punto última = Por número 22; Ponderación puntual = cuadrática; Atenuador = x16; Viscosidad 1,2 Pa.s (1.200 cp); Índice de refracción = 1,348; Número de mediciones= 3; Retardo entre mediciones= 0; Duración de la medición = Auto) para determinar  $Z_{prom}$  e IP. Antes de la medición se diluyeron las muestras diez veces con disolución de trehalosa deshidratada al 10,5 % (p/p).

25 6.2 Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 13.

30 Los hallazgos para la formulación que se secó por pulverización a la misma concentración de lípido y trehalosa que en el producto rehidratado fueron sustancialmente diferentes de los resultados para el producto que había sido pulverizado de alimentación líquida doble concentrada y había sido generado un gradiente de trehalosa en la

- rehidratación. La formulación sin gradiente de concentración mostró valores significativamente mayores de  $Z_{prom}$  e IP y aumentaron en 24 horas después de la reconstitución, mientras que la formulación con gradiente de concentración no mostró dicho incremento. Se considera que el incremento en  $Z_{prom}$  e IP está relacionado con la liberación de paclitaxel de la formulación sin gradiente de concentración, que era menos estable. Los datos están de acuerdo con los resultados del Ejemplo 2, donde podía cargarse más paclitaxel a los liposomas que habían sido obtenidos después de secado por pulverización a doble concentración y posterior generación de un gradiente de trehalosa. El secado por pulverización de las formulaciones de liposomas de paclitaxel a mayores concentraciones de trehalosa y posterior generación de un gradiente de trehalosa mejora la estabilidad de la formulación después de la reconstitución.
- 10 En comparación con las muestras secadas por pulverización, la formulación secada por congelación mostró un IP mucho mayor ya después de la reconstitución.

Tabla 13: Comparación de métodos de deshidratación y rehidratación

Lote	$\Delta C_{trehalosa}$	1 h		24 h	
		$Z_{prom}$ (nm)	IP	$Z_{prom}$ (nm)	IP
MDG09.108-08-001	0%	170,3	0,480	175,4	0,493
PD-L-09032	0%	167	0,331	260	0,65
PD-L-09031	10%	160,8	0,203	160,5	0,199

## 7. Fabricación a gran escala y secado por pulverización

### 15 7.1 Material

#### 7.1.1 Materiales básicos

- Paclitaxel Semisintético API USP, Phyton Biotech, Lote CP209N0014
- DOTAP-Cl, Merck Eprova AG, Lote MBA-020
- DOFC, Avanti Polar Lipids Inc., Lote GN181 PC-12
- $\alpha, \alpha$ -Trehalosa Dihidratada Alta Pureza (Baja Endotoxina), Ferro Pfanstiehl, Lote 33205A
- Etanol absoluto EP, Nova Laboratories Art.-Núm., A4478B
- Ácido cítrico monohidratado EP/USP, Nova Laboratories Art.- Núm., V290
- Agua para inyección, Nova Laboratories Art.- Núm., A15210C

#### 7.1.2 Equipo

- 25
- DI capilar de inyección: 2 mm
  - Cartucho de filtro Memtrex PC 0,2  $\mu$ m de GE, Artículo Núm. MPC92O5FHV, Lote 60240937
  - Filtro estéril Opticap XL4 con 0,22  $\mu$ m membrana Durapore de Millipore, Artículo Núm. KVGLAO4TT3 Lote: COCA1 0972
  - Recipiente-Formulación (Nova Laboratories Ltd.)
- 30
- Recipiente-Extrusión (Nova Laboratories Ltd.)
  - Recipiente-Reducción Biocarga (Nova Laboratories Ltd.)
  - Recipiente- Mantenimiento (Nova Laboratories Ltd.)
  - Bomba peristáltica (Nova Laboratories Ltd.)

- Recipiente de presión de 20 l con tubo vertical (Nova Laboratories Ltd.)
- Conductos de ventilación de mariposa (Nova Laboratories Ltd.)
- Secador de pulverización aséptico ASD-1 (GEA Niro S/A, Copenhagen Dinamarca)

## 7.2 Métodos

### 5 7.2.1 Producción de formulación líquida

#### 7.2.1.1 Preparación de disolución orgánica

Para el lote 001, se disolvieron 349,3 g de DOTAP-CL en solución en 700 g de etanol absoluto y se agitó durante aproximadamente 4 h. Se disolvieron 369,5 g de DOFC en 700 g de etanol absoluto y se agitó durante aproximadamente 3 h. Con posterioridad, se unieron las dos disoluciones de lípidos y se añadieron a 25,617 g de paclitaxel. Se agitó la disolución orgánica resultante durante aproximadamente 2 horas y finalmente se ajustó a un peso total de 2122,5 g por la adición de etanol absoluto. Se prepararon los lotes 002 a 004 de acuerdo con esto.

#### 7.2.1.2 Preparación de disolución acuosa

15 Para el lote 001, se añadieron 10 819 g de trehalosa deshidratada a aproximadamente 20 kg de agua para inyección en un recipiente de formulación y se agitó a 73 rad/s (700 rpm) durante 90 min. Con posterioridad, se añadieron 1.258 g de ácido cítrico monohidratado y se agitó hasta disolución completa. Se ajustó el volumen final de la disolución acuosa a 34,53 kg y se agitó durante otros 10 min. Se prepararon los lotes 002 a 004 de acuerdo con esto.

#### 7.2.1.3 Inyección de etanol

20 Para el lote 001, se inyectó la disolución orgánica en la disolución acuosa mediante una bomba peristáltica con una velocidad de inyección de aproximadamente 250 g/min. Durante la inyección, se agitó la disolución a aproximadamente 52 rad/s (500 rpm). Después de que terminara la inyección se agitó la disolución durante 2 min a 63 rad/s (600 rpm) y con posterioridad durante 1 min a 73 rad/s (700 rpm). Durante el procedimiento total de inyección se mantuvo la temperatura por debajo de 8 °C. Se agitaron los lotes 002 a 004 a 58 rad/s (550 rpm) durante la inyección sin agitación adicional después.

#### 7.2.1.4 Extrusión

25 Se realizaron 8 extrusiones por un cartucho de filtro de 13 cm (5") con una membrana de policarbonato de 0,2 µm. Se ventiló el cartucho de filtro con 40-50 kPa (0,4-0,5 bar) cada uno y se realizó extrusión con una presión de 300 kPa (3,0 bar). La temperatura se mantuvo por debajo de 8°C.

#### 7.2.1.5 Dilución

30 Después de la 8ª extrusión, se determinó el peso de la formulación. Basándose en la densidad de la formulación de 1,106 g/ml se calculó la cantidad de agua que se requería para obtener una formulación 20 mM (basado en concentración total de lípidos), que correspondía a una dilución 1:1,5. Para el lote 001, se añadió la cantidad de agua requerida para inyección a 1,66 l/min mediante una bomba peristáltica por un capilar de DI de 2 mm mientras se agitaba la disolución a aproximadamente 52 rad/s (500 rpm). Se había enfriado el agua añadida para inyección a por debajo de 8°C antes de añadirla a la formulación. Para los lotes 002 a 004 se realizó dilución a 0,62 l/min a 0,83 l/min a una velocidad de agitación de aproximadamente 63 rad/s (600 rpm).

#### 7.2.1.6 Reducción de biocarga

40 Antes de la reducción de biocarga (1ª filtración estéril), se lavó el filtro OpticapXL4 con 20 l de agua para inyección a una presión de aproximadamente 50 kPa (0,5 bar). La carga y la ventilación del filtro se realizaron de manera gravimétrica. Se realizó la filtración a una presión de 250 kPa (2,5 bar), en la que se aplicó la presión de inmediato. Se mantuvo la temperatura de la formulación por debajo de 8°C.

#### 7.2.1.7 Filtración estéril

45 Antes de la filtración estéril, se lavó el filtro OpticapXL4 con 20 l de agua para inyección a una presión de aproximadamente 50 kPa (0,5 bar). Se realizó ventilación del filtro a 50 kPa (0,5 bar). Se realizó la filtración a una presión de 250 kPa (2,5 bar), en la que se aplicó la presión de inmediato. Se mantuvo la temperatura de la formulación por debajo de 8°C.

### 7.2.2 Secado por pulverización

Se secó por pulverización la formulación liposomal en un secador de pulverización aséptico ASD-1 (GEA Niro S/A, Copenhagen, Dinamarca). Se secó el lote 001 como único lote (Realización 1), mientras que se pulverizaron los lotes 002 a 004 de manera secuencial de un modo continuo (Realización 2). Para secado por pulverización se usó



una boquilla de dos fluidos, nitrógeno como gas de secado y los siguientes parámetros:

Tabla 14: ajustes de secado por pulverización

Parámetro	Punto de ajuste
Velocidad del gas de secado	80 kg/h
Presión del gas del atomizador	300 kPa (3 bar)
Velocidad del gas del atomizador	3 kg/h
Temperatura de salida	95°C
Velocidad de alimentación	2 l/h
Temperatura de la alimentación	0°C - 30°C

5 7.3. Estabilidad de los liposomas

7.3.1. Método

10 Se rehidrataron las composiciones liposomales deshidratadas de la Realización 1 en agua para inyección a una concentración total de lípidos de 10 mM, así las condiciones de reconstitución aumentaron además el gradiente osmolar de la preparación que había sido 20 mM antes de la deshidratación. Por comparación, una composición liposomal correspondiente (Lote de referencia) que se preparó sin dilución y había sido deshidratada por liofilización (como se describe, por ejemplo, en la patente internacional WO 2004/002468). La cantidad de paclitaxel (incluyendo productos de degradación de paclitaxel) retenida en los liposomas se determinó según el método descrito en el Ejemplo 1.3 después de la reconstitución de los liposomas y después de 24 horas a 25° C. El porcentaje de paclitaxel retenido y paclitaxel filtrable (cristalizado) se calculó basándose en el paclitaxel total presente en las preparaciones.

15 7.3.2. Resultados

Tabla 15: Liberación de paclitaxel de los productos

Preparación	T0		Después de 24 h a 25°C	
	Paclitaxel liposomalmente retenido [%]	Paclitaxel filtrable [%]	Paclitaxel liposomalmente retenido [%]	Paclitaxel filtrable [%]
Realización 1	99,56	0,44	99,89	0,11
	99,93	0,07	100,09	-0,09
	99,67	0,33	99,87	0,13
Lote Referencia	99,63	0,37	98,88	1,12
	99,48	0,52	98,68	1,32
	99,72	0,28	99,16	0,84

20 Los datos muestran que las preparaciones liposomales preparadas en ausencia de un gradiente osmolar liberan paclitaxel más rápido. Esto ya puede observarse después de un periodo de tiempo relativamente corto de 24 h.

7.4. Análisis de tamaño de partícula y polidispersidad

## 7.4.1. Métodos

Se determinó el tamaño de partícula (zpromedio) y el índice de polidispersidad (IP) por PCS (difracción a 173°) usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). En resumen, muestreo de la Realización 1 (que corresponde al Lote 1) y Realización 2 (que corresponde a las Realizaciones 2-4) y una muestra del Lote de referencia (véase anteriormente) se resuspendieron en agua a una concentración total de lípidos de 10 mM. Para medición, se diluyeron las muestras diez veces con disolución de trehalosa deshidratada al 10,5% (p/p). Se almacenaron las muestras durante 24 horas a 25 °C y se midió de nuevo.

Se usaron los siguientes ajustes para la medición y análisis de los datos: Tipo de medición = Tamaño; Muestra: Material = Látex de poliestireno, IR: 1,590; Absorción: 0,01; Dispersante = Trehalosa al 10,5%, Temperatura: 25 °C, Viscosidad 1,2 Pa.s (1.200 cp); IR: 1,342; Opciones generales = parámetros de Mark-Houwink; Temperatura = 25 °C, Tiempo de equilibrio: 5 minutos; Celda = DTS0012 – Cubeta de tamaño disponible; Medición: Número de realizaciones = 15; Duración de la realización (segundos) = 100; Número de mediciones= 3; Retardo entre mediciones; Avanzado = Posición fijada en la posición 4,65, Atenuador 6; Parámetros del análisis: Modo del análisis = General; Análisis acumulativo: Orden de ajuste = 3; Esquema de ponderación = Cuadrático; Selección de puntos acumulativos: Primer punto automático = Sí; Método de selección último punto = Corte; Fracción de señal = 0,1; Dilatación = 1,2; Intervalo de visualización: Límite inferior = 0,6; Límite superior = 10 000; Filtración: Factor de filtro = 75; Análisis multimodal: Transformación del resultado = Mie; Uso transformación del resultado = Sí; Esquema de ponderación = Cuadrático; Resolución = normal; Selección de puntos – Multimodal; Primer punto automático = Sí; Método de selección último punto = Corte, Fracción de señal = 0,01; Dilatación = 1,2; Clases de tamaños: Número de clases de tamaño = 70; Límite inferior = 0,4; Límite superior = 10 000; Umbrales: Umbral inferior = 0,05; Umbral superior = 0,01; Factor de filtro = por defecto.

## 7.4.2. Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 16:

Muestra		zpromedio (nm)	IP
Lote de referencia		133	0,337
Realización 1	Lote 1	143	0,16
Realización 2	Lote 2	138	0,15
	Lote 3	143	0,17
	Lote 4	144	0,19

Las formulaciones fabricadas con un gradiente osmótico y deshidratadas por secado por pulverización (Realizaciones 1 y 2) mostraron un zpromedio muy similar, pero valores de IP significativamente menores comparado con la muestra de referencia fabricada sin un gradiente osmótico y deshidratada por liofilización. Así, el producto producido por el procedimiento descrito anteriormente es más homogéneo que un producto producido por un procedimiento convencional.

## 7.5. Caracterización por ultracentrifugación

## 7.5.1. Método

Se realizó análisis de ultracentrifugación por Nanolytics (Potsdam, Alemania).

Cada muestra se reconstituyó en H<sub>2</sub>O y una mezcla 1:1 de H<sub>2</sub>O: D<sub>2</sub>O a una concentración de lípidos de 10 mM y se equilibró durante una hora a temperatura ambiente. Con posterioridad, se diluyeron las muestras 1:1 con el respectivo disolvente. Después de otra hora de equilibración, las muestras fueron sometidas a ultracentrifugación. Se sometieron 400 µl de la respectiva dispersión liposomal a una cubeta de ultracentrifugación de titanio con un camino óptico de 12 mm. Se centrifugaron las muestras en una ultracentrífuga analítica Optima XL-I (Beckmann-Coulter, Palo Alto) usando un rotor de 8 posiciones An50Ti (Beckmann-Coulter, Palo Alto) provisto de óptica de interferencia Raileigh a 2094 rad/s (20 000 rpm) y 25°C. Durante la centrifugación, el perfil de concentración por la coordenada radial fue mediante el gradiente de refractividad en la disolución. Las muestras se midieron como duplicados.

## 7.5.2. Análisis de los datos

7.5.2.1 Definición del coeficiente de sedimentación

El indicador primario en la ultracentrifugación analítica es el coeficiente de sedimentación definido como sigue:

$$\frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f} = \frac{u}{\omega^2 r} \equiv s \quad (1)$$

5 En la que, u es la velocidad de sedimentación de la partícula, m la masa de la partícula,  $\bar{v}$  es el volumen específico, f es el término de fricción y  $\rho$  es la densidad del disolvente.

Determinación del coeficiente de sedimentación

El coeficiente de sedimentación se calcula directamente a partir de los datos medidos sin más suposiciones según:

$$\ln \frac{r}{r_m} = s \int \omega^2 dt \quad (2)$$

10 En la que  $r$  es la distancia al eje de rotación y  $r_m$  es el menisco. La integral del tiempo de realización  $\int \omega^2 dt$  se determina por el equipo de medida.

15 7.5.2.3 Distribución de coeficientes de sedimentación

En vez de un solo coeficiente de sedimentación a un radio específico, se puede transformar el eje r total en un eje s. El desplazamiento de la franja en la respectiva posición es proporcional a la concentración másica de las especies particuladas presentes allí, de manera que la amplitud de las mediciones puede tomarse como coordenada y. Sin embargo, se requiere corregir la coordenada y con respecto a la dilución radial. Incluyendo el término de corrección se obtiene la siguiente función g(s), que proporciona la concentración másica de las especies particuladas que sedimentan con velocidad s:

$$g(s) = \frac{1}{c_0} \frac{dc}{dr} \left( \frac{r}{r_m} \right)^2 r \int \omega^2 dt \quad (3)$$

25 La concentración c, respectivamente  $c_0$  se proporciona en unidades de desplazamiento de la franja, en que una franja es igual a una fase completa, así una línea clara y una oscura del patrón de interferencia. El tamaño es directamente proporcional a la concentración proporcionada en g/l en el caso de que se pueda asumir que el incremento de índice de refracción sea igual para todas las especies particuladas, que es el caso para las muestras presentes que son material uniforme químico que está presente simplemente en una distribución polidispersa:

$$30 \quad dc = d\phi \cdot \lambda \cdot \frac{1}{l \frac{dn}{dc}} \quad (4)$$

En la que  $\phi$  es la concentración en unidades de desplazamiento de la franja,  $\lambda$  es la longitud de onda del láser, l la anchura de la cubeta y  $\frac{dn}{dc}$  es el incremento del índice de refracción del soluto en un disolvente determinado. Debido a esta proporcionalidad, la concentración en la ecuación (3) puede indicarse directamente como concentración másica.

35  $g(s)$  (o su forma integrada  $G(s)$ ) puede calcularse en principio por transformación de la coordenada barrido a barrido y el cálculo de la coordenada y según la ecuación (3); el resultado total se obtendría promediando los barridos principales, que son principalmente redundantes. Así, es razonable realizar un ajuste de datos global por todos los barridos. De ese modo, se aísla el ruido independiente del tiempo y el espacio y se reparte el ruido estadístico adicional para obtener el mejor  $g(s)$  a partir de los datos de mediciones totales. Se usó el programa informático SedFit v12.4. de Peter Schuck para el ajuste.

7.5.2.4 Interpretación de la distribución de coeficientes de sedimentación

La distribución de coeficientes de sedimentación en la forma de la función  $g(s)$  ya proporciona información sobre la forma de la distribución; normalmente es deseable transformar el parámetro  $s$  de medición primaria en el diámetro o masa de la partícula. El coeficiente de sedimentación se correlaciona con la masa molar por la ecuación de SVEDBERG

$$M = \frac{s R T}{D (1 - \bar{v} \rho)} \quad (5)$$

por el coeficiente de difusión. Para objetos globulares, en cuanto a los liposomas presentes, puede reemplazarse el coeficiente de difusión por el diámetro de una esfera, a través de lo cual tiene que considerarse, que el liposoma se carga con agua, que no contribuye a la sedimentación sino a la fricción.

Si el coeficiente de difusión en la ecuación 5 es reemplazado por la ecuación de STOKES-EINSTEIN

$$D = 6 \pi \eta R_h \quad (6)$$

y considera el diámetro  $d=2R_h$  para una esfera y una fracción de volumen de agua  $\Phi$ ; la ecuación de SVEDBERG se convierte en:

$$d = \sqrt{\frac{18 \eta s}{(1 - \Phi) (\rho_s - \rho)}} \quad (7)$$

en la que  $\eta$  es la viscosidad del disolvente y  $\rho_s$  es la densidad del soluto.

Para la conversión de la distribución de coeficientes de sedimentación en una distribución de tamaños se requiere que el hinchamiento y la densidad de los liposomas permanezcan constantes o se proporcionen como una distribución dependiente del coeficiente de sedimentación. Así, la densidad se determina de manera experimental.

#### 7.5.2.5 Análisis de la variación de la densidad

La densidad de sedimentación de las partículas puede determinarse por ultracentrifugación analítica en dos disolventes con diferente densidad. En los disolventes que tienen una menor densidad, una partícula normalmente presenta un valor de  $s$  más pequeño, la partícula sedimenta más lentamente, si disminuye la diferencia de densidad para el disolvente circundante. Los dos valores de  $s$ , que describen la misma partícula, satisfacen la ecuación (7) con los parámetros para el respectivo disolvente. Para los dos disolventes (índice 1 y 2) se aplica lo siguiente:

$$\frac{\eta_1 s_1}{[\Phi \rho_1 + (1 - \Phi) \rho_s] - \rho_1} = \frac{\eta_2 s_2}{[\Phi \rho_2 + (1 - \Phi) \rho_s] - \rho_2} \quad (8)$$

La densidad anhidra de la partícula  $\rho_s$  y el parámetro  $\Phi$  de hinchamiento en ambos lados de la ecuación son idénticos, puesto que se refieren al mismo objeto. Se definen partículas idénticas como elementos de la distribución de coeficientes de sedimentación con idéntica coordenada y  $G(s)$ .

Así, la ecuación (8) puede reorganizarse y simplificarse para obtener la densidad anhidra:

$$\rho_s = \frac{\eta_1 s_1 \rho_2 - \eta_2 s_2 \rho_1}{s_1 \eta_1 - s_2 \eta_2} \quad (9)$$

El diámetro puede ser derivado según la siguiente ecuación:

$$d = \sqrt{\frac{18 (\eta_1 s_1 - \eta_2 s_2)}{(1 - \Phi) \cdot (\rho_1 - \rho_2)}} \quad (10)$$

5 Para resolver la ecuación (10), se requiere información independiente tal como el diámetro de las partículas, que puede determinarse de manera experimental por experimentos de dispersión de luz dinámica como se describió anteriormente.

### 7.5.3. Resultados

Table 17: Densidad anhidra de preparación liposomal

Realización de fabricación	Muestra	Densidad anhidra (g/ml)
Realización 1	Muestra 1	1,183
Realización 2	Muestra 1	1,174
	Muestra 2	1,154
	Muestra 3	1,223

**REFERENCIAS**

- Antonietti, M. y S. Forster (2003). "Vesicles and liposomes: A self assembly principle beyond lipids." *Advanced Materials* 15(16): 1323-1333.
- 5      Bangham A. D., Standish M. M., Watkins, J. C. (1965). "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids", *J. Mol. Biol.* 13: 238-52.
- Cabral, E. C. et al. (2003). "Preparation and characterization of diacetylene polymerized liposomes for detection of autoantibodies." *J Liposome Res* 13(3-4): 199-211.
- De Gier, J. (1993). "Osmotic behaviour and permeability properties of liposomes." *Chem Phys Lipids* 64(1-3): 187-196.
- 10     Ertel, A., A. G. Marangoni, et al. (1993). "Mechanical properties of vesicles. I. Coordinated analysis of osmotic swelling and lysis." *Biophysical Journal* 64(2): 426-434.
- Evans, D. F. y Wennerström H. (1994). "The Colloidal Domain", VHC Publishers, Inc., Nueva York, pp 48-49.
- 15     Goormaghtigh, E. y G. A. Scarborough (1986). "Density-based separation of liposomes by glycerol gradient centrifugation." *Anal Biochem* 159(1): 122-31.
- Gregoriadis G. (1995). "Engineering liposomes for drug delivery: Progress and problems". *Trends in biotechnology* 13 (12): 527-537.
- Hallett, F. R., J. Marsh, et al. (1993). "Mechanical properties of vesicles. II. A model for osmotic swelling and lysis." *Biophysical Journal* 64(2): 435-442.
- 20     Huang, C. H., Charlton, J. P. (1971) "Determination of partial specific volumes by sedimentation velocity method", *The Journal of Biological Chemistry*, 246(8): 2555-2560.
- Koppel, D. E. (1972). "Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants." *Journal of Chemical Physics* 57(11): 4814-4820.
- New et al. (1990). *Liposomes. A Practical Approach*. Oxford University Press. Páginas 33-104).

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para la fabricación de una preparación liposomal que comprende:
  - 5 a) proporcionar una primera preparación liposomal que comprende una suspensión de liposomas en una fase acuosa, en la que los liposomas comprenden al menos una membrana, en la que la membrana encierra un volumen liposomalmente encapsulado de la fase acuosa y la fase acuosa comprende al menos una sustancia osmóticamente activa y presenta una osmolaridad total inicial,  $O_1$ , en la que la primera preparación liposomal comprende al menos un agente activo en la membrana liposomal,
  - 10 b) generar después un gradiente osmolar en la fase acuosa de dicha preparación, en la que la osmolaridad de la fase acuosa exterior al volumen liposomalmente encapsulado,  $O_{ext}$ , es menor que la osmolaridad de la fase acuosa interior al volumen liposomalmente encapsulado,  $O_{int}$ , para proporcionar una segunda preparación liposomal y en la que se incorpora al menos un agente activo en la membrana liposomal de la segunda preparación liposomal,
  - c) opcionalmente deshidratar la segunda preparación liposomal para obtener una preparación deshidratada y
  - 15 d) opcionalmente rehidratar la preparación deshidratada,

en el que dicho agente activo presenta un log P mayor que 1 y en el que dicho agente activo es un taxano.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa b) se realiza reduciendo la osmolaridad total inicial,  $O_1$ , de la fase acuosa de la preparación liposomal en la etapa a) para proporcionar una preparación liposomal sometida a tensión con una osmolaridad total,  $O_2$ , que es menor que la osmolaridad  $O_1$ .
- 20 3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa b) se realiza diluyendo la preparación liposomal en la etapa a) con un medio acuoso que presenta una osmolaridad que es menor que  $O_1$ .
4. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa b) se realiza por diálisis de la preparación en la etapa a) contra un medio acuoso con una osmolaridad que es menor que  $O_1$ .
5. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa b) se realiza por:
  - 25 b1) deshidratación de la preparación liposomal en la etapa a) para obtener una preparación liposomal deshidratada y
  - b2) rehidratación de dicha preparación liposomal deshidratada en condiciones para proporcionar una preparación liposomal sometida a tensión, preferiblemente en un medio acuoso.
- 30 6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que el volumen de medio acuoso usado para rehidratación es mayor que el volumen de preparación liposomal que ha sido deshidratado para obtener la respectiva cantidad de composición liposomal deshidratada.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que  $O_2$  es al menos 10 mOsm menor que  $O_1$ , más preferiblemente  $O_2$  es al menos 50 mOsm menor que  $O_1$  e incluso más preferiblemente  $O_2$  es al menos 100 mOsm menor que  $O_1$ .
- 35 8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que gradiente osmótico entre la fase acuosa exterior al volumen liposomalmente encapsulado y la fase acuosa interior al volumen liposomalmente encapsulado es modificado una vez o varias veces en diferentes fases durante el procedimiento de producción de la preparación liposomal.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la deshidratación se realiza a una temperatura por encima de temperatura ambiente.
- 40 10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la deshidratación se realiza por secado por pulverización.
11. Un procedimiento para la fabricación de una preparación liposomal que comprende al menos un agente activo lipófilo, que comprende:
  - 45 i) proporcionar una preparación liposomal sometida a tensión,
  - ii) incubar dicha preparación liposomal sometida a tensión con al menos un agente activo lipófilo, opcionalmente en una forma no solubilizada, obteniendo de ese modo una preparación liposomal sometida a tensión con al menos un agente activo lipófilo incorporado a la membrana liposomal,

en el que la etapa i) se realiza proporcionando una preparación liposomal, en la que al menos una

sustancia osmóticamente activa está comprendida en la fase acuosa de la preparación y en la que la fase acuosa presenta una osmolaridad mayor en el interior del volumen liposomalmente encapsulado que en el exterior del volumen liposomalmente encapsulado y

5           iii) opcionalmente separar compuesto no solubilizado de la preparación liposomal, preferiblemente por filtración o centrifugación,

en el que dicho agente activo presenta un log P mayor que 1 y en el que dicho agente activo es un taxano.

12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que está presente al menos una sustancia osmóticamente activa en el interior y exterior de los liposomas.

10       13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia osmóticamente activa se selecciona del grupo que consiste en moléculas orgánicas e inorgánicas tales como sacáridos, alcoholes de azúcar, aminoácidos, péptidos, proteínas, polímeros solubles en agua, sales orgánicas o inorgánicas, iones y combinaciones de los mismos.

14. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que el sacárido se selecciona de mono-, di-, oligo- o polisacáridos, preferiblemente trehalosa.

15       15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente activo presenta un log P mayor que 2, lo más preferiblemente mayor que 3.

16. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente activo presenta una solubilidad menor que 0,1 mg/ml, más preferiblemente menor que 0,01 mg/ml y lo más preferiblemente menor que 0,001 mg/ml en agua a 25° C.

20       17. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente activo es un taxano seleccionado de paclitaxel o un derivado del mismo.

18. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente activo está presente sustancialmente exclusivamente en el compartimento de membrana de los liposomas.

25       19. Una preparación liposomal obtenida u obtenible por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

20. La preparación liposomal según la reivindicación 19, que está en forma deshidratada o en forma de una suspensión acuosa.

21. La preparación liposomal deshidratada según la reivindicación 20, que es un polvo vertible.

30       22. Una preparación liposomal que comprende una suspensión de liposomas en una fase acuosa, en la que los liposomas comprenden al menos una membrana, en la que está presente al menos un agente activo en la membrana liposomal y está presente al menos una sustancia osmóticamente activa en la fase acuosa, en la que la osmolaridad de la fase acuosa interior a los liposomas,  $O_{int}$ , es mayor que la osmolaridad de la fase acuosa exterior a los liposomas,  $O_{ext}$ .

en la que dicho agente activo presenta un log P mayor que 1 y en la que dicho agente activo es un taxano.

35       23. La preparación liposomal según la reivindicación 22, en la que la diferencia entre  $O_{int}$  y  $O_{ext}$  es al menos 10 mOsm, preferiblemente al menos 50 mOsm y hasta 2000 mOsm.

24. La preparación liposomal según una cualquiera de las reivindicaciones 19-23, para uso como un producto farmacéutico, preferiblemente para el tratamiento de cáncer.

40       25. La preparación liposomal según la reivindicación 19, que comprende una suspensión de liposomas en una disolución acuosa obtenida por rehidratación de una preparación liposomal deshidratada, caracterizada por un diámetro promedio ( $Z_{promedio}$ ) que difiere por menos de un factor de 1,5 y un índice de polidispersidad (IP) que difiere por menos de un factor de dos de la preparación liposomal sometida a deshidratación para obtener dicha preparación liposomal deshidratada, en la que los liposomas comprenden hasta 5 % en moles de paclitaxel.

45       26. La preparación liposomal según la reivindicación 25, en la que el IP de 1 hora después de reconstitución es preferiblemente menor que 0,4, más preferiblemente menor que 0,3, lo más preferiblemente menor que 0,25.

50       27. La preparación liposomal según la reivindicación 19, que comprende una suspensión de liposomas en una fase acuosa obtenida por rehidratación de una preparación liposomal deshidratada, caracterizada por cambios del diámetro promedio ( $Z_{promedio}$ ) por no más de un factor de 1,5, preferiblemente no mayor que 1,25 y cambios del índice de polidispersidad (IP) por no más de un factor de 2, preferiblemente no mayor que 1,5, lo más preferiblemente no mayor que 1,25 durante 24 horas a 25°C, en la que los liposomas comprenden hasta 5 % en



moles de paclitaxel.

28. La preparación liposomal según cualquiera de las reivindicaciones 25-27, en la que los liposomas comprenden hasta 3 % en moles de paclitaxel en las membranas liposomales.

5 29. La suspensión liposomal según cualquiera de las reivindicaciones 25-28, en la que los liposomas comprenden DOTAP, DOFC y paclitaxel, preferiblemente en una relación molar de 50:47:3.

30. Una suspensión liposomal que comprende un gradiente osmolar que comprende liposomas que comprenden DOTAP, DOFC y paclitaxel en una concentración total de lípidos de 10 mM y trehalosa, suspendidos en una fase acuosa que comprende aproximadamente 10 mg/ml, especialmente 9,79 mg/ml de trehalosa, en la que dichos liposomas se caracterizan por una densidad anhidra de al menos 1,1 g/ml.

10 31. La suspensión liposomal según la reivindicación 30, en la que DOTAP, DOFC y paclitaxel están comprendidos en una relación molar de 50:47:3.

32. La suspensión liposomal según las reivindicaciones 30-31, en la que la suspensión liposomal comprendía ácido cítrico.

15 33. La suspensión liposomal según las reivindicaciones 30-31, en la que dichos liposomas presentan un  $Z_{\text{promedio}}$  de 140 nm.

Figura 1

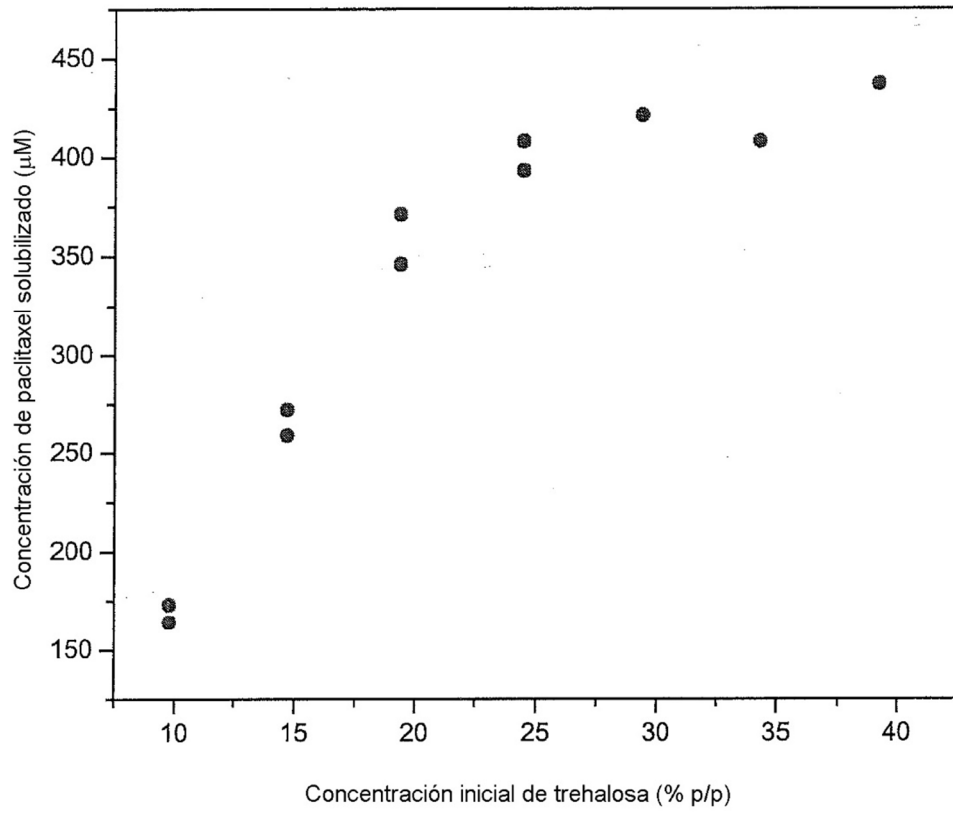


Figura 2

