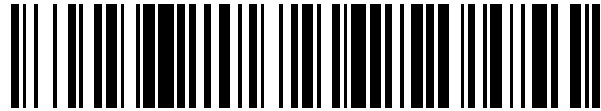


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 554**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2007 PCT/US2007/008500**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2007 WO07117550**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2007 E 07754936 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2012750**

54 Título: **Métodos para la encapsulación liposomal inducida por coacervación y sus formulaciones**

30 Prioridad:

**06.04.2006 US 789688 P**

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

**18.05.2018**

73 Titular/es:

**INSMED INCORPORATED (100.0%)  
10 Finderne Ave, Building 10  
Bridgewater, NJ 08807-3365 , US**

72 Inventor/es:

**MALININ, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 668 554 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

Métodos para la encapsulación liposomal inducida por coacervación y sus formulaciones

**Antecedentes de la Invención**

5 Determinada tecnología de liberación sostenida, adecuada para administración por inhalación, emplea formulaciones basadas en lípidos tales como liposomas para proporcionar un efecto terapéutico prolongado de un agente activo y sistémicamente por liberación sostenida y la capacidad de fijar como objetivo y potenciar la absorción del agente activo en los sitios de la enfermedad.

10 Para un sistema de administración de agentes activos basado en lípidos, a menudo es deseable reducir la relación lípido a agente activo (L/A) lo más posible para minimizar la carga de lípidos para evitar efectos de saturación en el cuerpo. Por ejemplo, para la administración pulmonar por inhalación, esto puede ser particularmente cierto, ya que para un uso crónico, la dosificación de lípidos podría superar el aclaramiento, limitando así la administración y, por lo tanto, la eficacia del producto de agente activo. Cuando el agente activo es un agente activo, una relación L/D más baja permitiría administrar más agente activo antes de alcanzar el umbral de dosificación/aclaramiento.

El documento WO 2004/110346 A describe la producción de una amikacina liposomal/complejada.

**15 Sumario de la invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar formulaciones de agentes activos basadas en lípidos con bajas relaciones de lípido a agente activo.

También es un objeto de la presente invención proporcionar un método para preparar formulaciones de agentes activos basadas en lípidos con bajas relaciones de lípido a agente activo.

20 La presente invención resulta de la comprensión de que las formulaciones de agentes activos basadas en lípidos con bajas relaciones de L/A se consiguen preparándolas utilizando técnicas de coacervación.

25 A través de los métodos descritos en esta memoria se crean liposomas de tamaño modesto ( $<1 \mu\text{m}$ ) que comprenden agente activo atrapado a relaciones en peso de L/A de típicamente aproximadamente 0,40 - 0,49: 1. Se han medido los volúmenes capturados de liposomas, y a partir de estos números se puede calcular cuál debería ser el atrapamiento teórico si el agente activo se comportó como un soluto ideal (es decir, no interactúa con la membrana del liposoma, sino que atrapa idealmente junto con el agua). A partir de esta comparación, se observan números de atrapamiento que son 3-5 veces más altos que lo esperado, lo que indica que se está produciendo una interacción especial que permite un atrapamiento mayor de lo esperado, y relaciones L/A inferiores a las esperadas. Las soluciones en las que se forman los liposomas tienen una concentración dada de agente activo. La concentración de agente activo dentro de los liposomas debe ser aproximadamente la misma concentración que en la solución. Sin embargo, las concentraciones internas de agente activo se calculan al menos aproximadamente 3 veces más altas. Ahora se ha descubierto que este fenómeno puede explicarse por la formación de un coacervado de agente activo que inicia la formación de bicapa lipídica alrededor del coacervado de agente activo.

35 La presente invención se refiere a un método para preparar una formulación de fármaco de base liposomal, que comprende mezclar una solución lipídica que comprende un lípido disuelto en un disolvente orgánico a un caudal de 1 L/min a 3 L/min con una solución acuosa de amikacina a un caudal de 1,5 L/min a 4,5 L/min para formar un coacervado de amikacina, en el que el lípido se mezcla con el coacervado de amikacina y el coacervado de amikacina inicia la formación de bicapa lipídica alrededor del coacervado de amikacina y en el que la solución lipídica y la solución acuosa de amikacina se mezclan a partir de dos corrientes separadas de una manera en línea, en donde la concentración de la amikacina dentro del liposoma es más alta que la concentración de amikacina externa.

En una realización adicional, las dos corrientes entran en un conector en Y o en T antes de la mezcladura en línea. En una realización adicional, se agrega una tercera corriente de agua o agua salada para diluir la mezcla de lípido y amikacina resultante. En una realización adicional, el disolvente orgánico es etanol.

45 En una realización adicional, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, en el que la relación de tasa de adición de solución lipídica a tasa de adición de solución acuosa de amikacina es 2:3.

50 En una realización adicional, la solución lipídica se añade a una tasa de 1 L/min y la solución acuosa de amikacina se añade a una tasa de 1,5 L/min. En una realización adicional, la solución lipídica se añade a una tasa de 1 L/min, la solución acuosa de amikacina se añade a una tasa de 1.5 L/min, y el agua o agua salada se añade a una tasa de 1 L/min.

En una realización adicional, la presente invención se refiere al método mencionado anteriormente, en el que el lípido es una mezcla de un fosfolípido y un esteroil. En una realización adicional, el fosfolípido es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y el esteroil es colesterol. En una realización adicional, la relación de DPPC:

colesterol es 2:1 en peso. En una realización adicional, la solución lipídica está a 10-30 mg/ml y la solución acuosa de amikacina está a 40-100 mg/ml. En una realización adicional, la solución lipídica está a 20 mg/ml y la solución acuosa de amikacina está a 75 mg/ml.

5 En otra realización, la relación de lípido a amikacina es 0,40-0,49:1 en peso. En una realización adicional, la relación de lípido a amikacina es aproximadamente 0,35-0,39:1. En una realización adicional, la relación de lípido a amikacina es menor que 0,40:1.

En una realización adicional, el lípido comprende una mezcla de un fosfolípido y un estero. En una realización adicional, el fosfolípido es DPPC y el estero es colesterol. En una realización adicional, el DPPC y el colesterol están en una relación en peso de 2:1.

10 Estas realizaciones de la presente invención, otras realizaciones, y sus rasgos y características, resultarán evidentes a partir de la descripción, los dibujos y las reivindicaciones que siguen.

### **Breve Descripción de los Dibujos**

15 La **Figura 1** representa gráficamente el proceso de infusión en línea de dos corrientes para preparar formulaciones liposómicas antiinfecciosas. Los caudales representados son ejemplos no limitantes de caudales sujetos a cambios según se requiera. Además, se representa una tercera línea de solución de NaCl, pero puede estar ausente o suministrar solo agua.

20 La **Figura 2** representa la miscibilidad del sulfato de amikacina con etanol/agua. Las líneas representan la concentración máxima de amikacina (base) miscible con solución de etanol a temperatura ambiente (TA) y 40°C. A concentraciones más altas, la amikacina forma una fase líquida separada (coacervados), que más tarde precipita en forma de cristales. Las líneas verticales muestran la concentración de etanol en la mezcla de infusión de lípidos/amikacina (300/500 partes) y después de añadir agua 200 partes.

La **Figura 3** representa un diagrama de fase ternaria del sistema de sulfato de amikacina-agua-etanol.

25 La **Figura 4** representa el efecto de la fuerza iónica y el pH sobre la coacervación inducida por etanol de BSA. Se tituló una muestra de BSA a 10 mg/mL en una cubeta óptica con un flujo de etanol desgasificado bajo agitación constante. La señal de dispersión de la luz se midió en el ángulo recto a una longitud de onda de 600 nm utilizando un fluorímetro de PTI (Photon Technology International, NJ). La temperatura se fijó a 25°C

La **Figura 5** representa el efecto de MgCl<sub>2</sub> en la coacervación de BSA inducida por etanol. EtOH<sub>crit</sub> es la concentración de etanol en el inicio del aumento en la dispersión de la luz. Se disolvieron 10 mg/mL de BSA en NaCl 10 mM a pH 7,0.

30 La **Figura 6** representa el efecto del polication polietilenimina (PEI) de bajo peso molecular (PM 800) sobre la coacervación de BSA inducida por etanol. BSA 10 mg/ml se disolvió en NaCl 10 mM a pH 7,0.

### **Descripción detallada**

35 La presente invención describe una formulación lipídica de amikacina preparada formando un coacervado de amikacina que induce la formación de bicapa lipídica alrededor de la amikacina tal como se describe en la reivindicación 1. El método da como resultado bajas relaciones de lípido a agente activo para la formulación de agente activo lipídico resultante y concentraciones internas de agente activo que son 3 a 5 veces mayores que la concentración de agente activo externo utilizada. La presente invención también describe un método para preparar estas formulaciones lipídicas utilizando técnicas de coacervación.

#### 1. Definiciones

40 Por conveniencia, antes de una descripción adicional de la presente invención, se recogen aquí determinados términos y expresiones empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas. Estas definiciones deben leerse a la vista del resto de la divulgación y deben ser entendidas como por una persona experta en la técnica. A menos que se defina de otro modo, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que entendido comúnmente por una persona de experiencia ordinaria en la técnica.

Los artículos "un" y "una" se utilizan en esta memoria para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

50 El término "biodisponible" está reconocido en la técnica y se refiere a una forma de la presente invención que permite que, o una parte de la cantidad administrada, sea absorbida, incorporada o esté fisiológicamente disponible de otro modo para un sujeto o paciente a quien es administrada.

Los términos "comprender" y "que comprende" se utilizan en el sentido abierto inclusivo, lo que significa que se pueden incluir elementos adicionales.

Los términos "encapsulado" y "encapsular" se refieren a la adsorción de agentes activos sobre la superficie de la formulación basada en lípidos, la asociación de agentes activos en la región intersticial de bicapas o entre dos monocapas, la captura de agentes activos en el espacio entre dos bicapas o la captura de agentes activos en el espacio rodeado por la bicapa o monocapa más interna.

- 5 El término "que incluye" se utiliza en esta memoria para dar a entender "que incluye pero no se limita a". "Incluir" y "que incluye, pero no se limita a" se utilizan indistintamente.

La expresión "formulación antiinfecciosa lipídica" o "Lip-antiinfeccioso" o "Lip-An" comentada en esta memoria es cualquier forma de composición antiinfecciosa en la que al menos aproximadamente 1% en peso del agente antiinfeccioso se asocia con el lípido como parte de un complejo con el lípido, o como un liposoma en el que el antibiótico puede estar en la fase acuosa o en la fase de bicapa hidrofóbica o en la región del grupo de cabeza interfacial de la bicapa liposomal. Preferiblemente, al menos aproximadamente 5%, o al menos aproximadamente 10%, o al menos aproximadamente 20%, o al menos aproximadamente 25%, puede asociarse de esta manera. La asociación puede medirse por separación a través de un filtro en el que se retienen lípidos y agentes antiinfecciosos asociados a lípidos y hay agente antiinfeccioso libre en el filtrado. Una formulación antiinfecciosa liposomal" es una formulación antiinfecciosa lipídica en la que la formulación lipídica está en forma de un liposoma.

El término "mamífero" es conocido en la técnica, y mamíferos a modo de ejemplo incluyen seres humanos, primates, bovinos, porcinos, caninos, felinos y roedores (p. ej., ratones y ratas).

Un "paciente", "sujeto" o "huésped" a ser tratado por el presente método puede referirse a un animal humano o no humano.

- 20 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" está reconocida en la técnica y se refiere a las sales por adición de ácidos inorgánicas y orgánicas de compuestos, relativamente no tóxicas, que incluyen, por ejemplo, las contenidas en las composiciones de la presente invención.

El término "infusión de disolvente" es un proceso que incluye disolver uno o más lípidos en una cantidad pequeña, preferiblemente mínima, de un disolvente compatible con el proceso para formar una suspensión o solución (preferiblemente una solución) lipídica y luego añadir la solución a un medio acuoso que contiene agentes bioactivos. Típicamente, un disolvente compatible con el proceso es uno que puede eliminarse por lavado en un proceso acuoso tal como diálisis. La composición que se cicla en frío/en caliente se forma preferiblemente por infusión de disolvente, prefiriéndose la infusión de etanol. Los alcoholes son preferidos como disolventes. La "infusión de etanol", un tipo de infusión de disolvente, es un proceso que incluye disolver uno o más lípidos en una cantidad pequeña, preferiblemente mínima, de etanol para formar una solución lipídica y luego añadir la solución a un medio acuoso que contiene agentes bioactivos. Una cantidad "pequeña" de disolvente es una cantidad compatible con la formación de liposomas o complejos lipídicos en el proceso de infusión. La expresión "infusión de disolvente" también puede incluir un proceso de infusión en línea en el que dos corrientes de componentes de formulación se mezclan en línea.

- 35 La expresión "sustancialmente libre" es reconocida en la técnica y se refiere a una cantidad trivial o menos.

El término "tensoactivo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un compuesto que disminuye la tensión superficial del agua adsorbiendo en la interfaz aire-agua. Muchos tensoactivos pueden ensamblarse en la solución a granel formando agregados que se conocen como micelas. La concentración a la que los tensoactivos comienzan a formar micelas se conoce como la "concentración crítica de micelas" o CMC. Lípidos útiles para la aplicación actual también pueden ser tensoactivos con una CMC extremadamente baja. Tensoactivos formadores de micelas útiles para la presente solicitud deben tener una CMC más alta que la CMC del lípido. A concentraciones superiores a CMC, los tensoactivos formadores de micelas pueden formar micelas mixtas compuestas de tensoactivos y moléculas de lípidos. Tras la dilución por debajo de la CMC, los tensoactivos formadores de micelas se disociarán en una solución verdadera, dejando así moléculas lipídicas expuestas al medio acuoso. Esto conduce a la precipitación espontánea de lípidos, preferiblemente en forma de bicapas.

La frase "cantidad terapéuticamente efectiva", tal como se utiliza en esta memoria, significa la cantidad de un compuesto, material o composición que comprende una formulación de fármaco lipídico de acuerdo con la presente invención que es efectiva para producir algún efecto terapéutico deseado inhibiendo infecciones pulmonares.

- 50 El término "tratar" está reconocido en la técnica y se refiere a curar así como a mejorar al menos un síntoma de cualquier afección o enfermedad. El término "tratar" también se refiere al tratamiento profiláctico que actúa para defenderse contra o prevenir una afección o enfermedad.

## 2. Coacervación

La coacervación en su forma más simple se puede considerar como un amontonamiento conjunto. En términos más técnicos, la coacervación es la separación en dos fases líquidas en sistemas coloidales. La fase más concentrada en el componente coloidal (agente activo) se denomina el coacervado, y la otra fase es la solución de equilibrio.

El término coloidal se refiere a un estado de subdivisión, lo que implica que las moléculas o partículas polimoleculares dispersas en un medio tienen al menos en una dirección una dimensión aproximadamente entre 1 nm y 1  $\mu\text{m}$ , o que en un sistema se encuentran discontinuidades a distancias de ese orden. IUPAC Compendium of Chemical Terminology 1972, 31, 605.

5 Una solución de macromoléculas es un sistema de coloides simple y el más común. Moléculas pequeñas también pueden formar coloides de asociación como agregados reversibles. Un coloide de asociación es una combinación química reversible debido a fuerzas débiles de unión química en las que hasta cientos de moléculas o iones se agregan para formar estructuras coloidales con tamaños de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 nanómetros o más.

10 La clasificación actual del fenómeno de coacervación se basa en el mecanismo que impulsa la separación de dos fases. Gander B, Blanco-Prieto M.J., Thomasin C, Wandrey Ch. y Hunkeler D., Coacervation/Phase Separation, en: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Vol. 1, Swarbrick J, Boylan J.C., Eds., Marcel Dekker, 2002, págs. 481-497). Incluyen:

15 1. Coacervación inducida por desolvatación parcial. Esto a su vez puede involucrar un sistema binario de un disolvente y un polímero, en que los factores inductores de la coacervación son la temperatura o el pH. O puede ser un sistema ternario que incluye un disolvente, un polímero y un agente coacervante (no disolvente para el polímero o electrolito (sal)). Este tipo de coacervación se denomina a menudo coacervación simple. El ejemplo clásico de coacervación simple es la  
20 coacervación de la solución de gelatina mediante la adición de alcohol (no disolvente para la gelatina). Otros no disolventes útiles para inducir la coacervación en sistemas acuosos pueden incluir propanol, isopropanol, acetona, dioxano. Cuando los electrolitos se utilizan para la desolvatación de polímeros, el fenómeno se denomina salificación. En sistemas acuosos, la capacidad de los iones de provocar la deshidratación sigue la serie Hofmeister o liotrópica  $\text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Al}^{3+}$  para cationes, y  $\text{Cl}^- < \text{SO}_4^{2-} < \text{tartrato}^{2-} < \text{fosfato}^{2-} < \text{citrato}^{3-}$ , con el fin de aumentar la capacidad de separación de sales.

25 2. Coacervación inducida por la repulsión Polímero-Polímero. En este tipo, el segundo polímero añadido a la solución del primer polímero induce la separación de fases, estando el 1<sup>er</sup> polímero en la fase coacervada suspendido en una fase del 2<sup>o</sup> polímero. Un ejemplo de repulsión Polímero-Polímero es la coacervación de PLA en disolvente de diclorometano inducido por aceite de  
30 silicona.

35 3. Coacervación inducida por reticulación polimérica no covalente ("Coacervación Compleja"). El agente de reticulación puede ser un polímero de carga opuesta al polímero coacervante, o contraión di- o tri-valente al polímero, tal como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , Tartrato<sup>2-</sup> y otros. Polímeros típicos utilizados en la coacervación compleja incluyen: polianiones Alginato, Carragenano, Carboximetilcelulosa, Sulfato de condroitina, Sulfato de celulosa, Gelan, Ácido hialurónico, Poli(ácido acrílico), Xantano; policationes Quitosano, Poli(cloruro de dialildimetilamonio), Poli(L-lisina), Poli(vinilamina). En general, la interacción polianión-polication es controlada por una serie de parámetros tales como la densidad de carga, el tipo de grupo iónico, la arquitectura de la  
40 cadena. Además, el pH, la fuerza iónica, las concentraciones y la temperatura influyen en la formación del complejo.

Obviamente, se puede utilizar una combinación de los tipos arriba enumerados para controlar la coacervación. Particularmente, adición de no disolventes en combinación con agentes de reticulación, o no disolventes y agentes desaladores.

45 En parte, en la presente invención, antes de la coalescencia, el coacervado inestable se expone a una solución lipídica de alta concentración. Se piensa que resulta un efecto de nucleación en los casos en los que el coacervado siembra la precipitación de los lípidos. Los lípidos forman una bicapa que encapsula al coacervado (agente activo).

50 La Figura 3 representa un diagrama de fase ternaria para un sistema de sulfato de amikacina - agua - etanol. El área de dos fases bajo la curva binodial es una zona en donde el sistema se separa en dos fases, una fase de coacervado y una fase de equilibrio. El área por encima de la curva binodial es una zona en donde existe un único sistema de fase líquida de sulfato de amikacina disuelto en una mezcla de agua y etanol. Cuando 3 partes de solución de sulfato de amikacina en agua a 70 mg/ml (punto 1) se mezclan con 2 partes de etanol, la mezcla resultante tiene una composición (punto 2), que se separa espontáneamente en dos fases: fase de coacervado rica en amikacina (punto C) y fase de equilibrio vertido en amikacina (punto E). La fase de coacervado comprende sólo aproximadamente el 4,5% del volumen total y se forma originalmente como pequeñas gotitas suspendidas en fase  
55 de equilibrio. Si los lípidos están presentes en la solución circundante cuando se forman los coacervados, pueden formar bicapas espontáneamente alrededor de esas gotitas. Durante la fabricación, se desea a menudo limitar la exposición del producto a una alta concentración de etanol. Por ejemplo, posteriormente se pueden agregar otras 3 partes de solución salina o tampón a la mezcla, que desplaza la composición a la zona monofásica (punto 3). Dado

que en ese punto ya se forman liposomas que encapsulan la mayoría del material de la fase de coacervado, la amikacina permanecerá encapsulada en el interior de los liposomas.

Es clave que los métodos y las formulaciones lipídicas de la presente invención no se preparen pasivamente, es decir, la encapsulación no se lleve a cabo solo en equilibrio. La formación de coacervados conduce a concentraciones de agente activo internas más elevadas en relación con las concentraciones de agente activo externo y a menores relaciones de L/A.

### 3. Agente Activo

El agente activo coacervado puede producirse de manera concebible con cualquier tipo de sustancia que sea una sustancia biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúe local o sistémicamente en un sujeto.

De acuerdo con la presente invención, el fármaco es un aminoglucósido antiinfeccioso, a saber amikacina. Los agentes antiinfecciosos son agentes que actúan contra infecciones tales como infecciones bacterianas, micobacterianas, fúngicas, virales o protozoarias.

### 4. Lípidos y Liposomas

Los lípidos utilizados en las composiciones preparadas de acuerdo con la presente invención pueden ser lípidos sintéticos, semisintéticos o que se producen de forma natural, que incluyen fosfolípidos, tocoferoles, esteroides, ácidos grasos, glicoproteínas tales como albúmina, lípidos aniónicos y lípidos catiónicos. Los lípidos pueden ser aniónicos, catiónicos o neutros. En una realización, la formulación lipídica está sustancialmente libre de lípidos aniónicos. En una realización, la formulación lipídica comprende sólo lípidos neutros. En otra realización, la formulación lipídica está libre de lípidos aniónicos. En otra realización, el lípido es un fosfolípido. Fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina de huevo (EPC), fosfatidilglicerol de huevo (EPG), fosfatidilinositol de huevo (EPI), fosfatidilserina de huevo (EPS), fosfatidiletanolamina (EPE) y ácido fosfatídico de huevo (EPA); los equivalentes de soja, fosfatidilcolina de soja (SPC); SPG, SPS, SPI, SPE y SPA; los equivalentes de huevo y soja hidrogenados (p. ej., HEPC, HSPC), otros fosfolípidos formados por enlaces éster de ácidos grasos en las posiciones 2 y 3 del glicerol que contienen cadenas de 12 a 26 átomos de carbono y diferentes grupos de cabeza en la posición 1 de glicerol que incluyen colina, glicerol, inositol, serina, etanolamina, así como los ácidos fosfatídicos correspondientes. Las cadenas de estos ácidos grasos pueden estar saturadas o insaturadas, y el fosfolípido puede estar formado por ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena y diferentes grados de insaturación. En particular, las composiciones de las formulaciones pueden incluir dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), un constituyente principal del tensoactivo pulmonar que se produce de forma natural, así como dioleoilfosfatidilcolina (DOPC). Otros ejemplos incluyen dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) y diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) y fosfolípidos mixtos tales como palmitoilestearoilfosfatidilcolina (PSPC) y palmitoilestearoilfosfatidilglicerol (PSPG), diacilglicerol, diacilglicerol, seranida, esfingosina y fosfolípidos acilados simples tales como mono-oleoil-fosfatidiletanol amina (MOPE).

Los lípidos utilizados pueden incluir sales de amonio de ácidos grasos, fosfolípidos y glicéridos, esteroides, fosfatidilgliceroles (PGs), ácidos fosfatídicos (PAs), fosfatidilcolinas (PCs), fosfatidilinositoles (PIs) y las fosfatidilserinas (PSs). Los ácidos grasos incluyen ácidos grasos de longitudes de cadena de carbonos de 12 a 26 átomos de carbono que están saturadas o insaturadas. Algunos ejemplos específicos incluyen: miristilamina, palmitilamina, laurilamina y estearilamina, dilaurol etilfosfocolina (DLEP), dimiristoil etilfosfocolina (DMEP), dipalmitoil etilfosfocolina (DPEP) y diestearoil etilfosfocolina (DSEP), cloruro de N-(2,3-di-(9(Z)-octadeceniloxi)-prop-1-il-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP). Ejemplos de esteroides incluyen colesterol y ergosterol. Ejemplos de PGs, PAs, PIs, PCs y PSs incluyen DMPG, DPPG, DSPG, DMPA, DPPA, DSPA, DMPI, DPPI, DSPI, DMPS, DPPS y DSPS, DSPC, DPPG, DMPC, DOPC, PC de huevo.

Formulaciones antiinfecciosas liposómicas compuestas de fosfatidilcolinas, tales como DPPC, ayudan a la captación por parte de las células en el pulmón tales como los macrófagos alveolares y ayudan a mantener la liberación del agente antiinfeccioso en el pulmón (Gonzales-Rothi et al., (1991)). Los lípidos cargados negativamente tales como las PGs, PAs, PSs y PIs, además de reducir la agregación de partículas, pueden desempeñar un papel en las características de liberación sostenida de la formulación de inhalación, así como en el transporte de la formulación a través del pulmón (transcitosis) para la absorción sistémica. Se cree que los compuestos de esteroles afectan a las características de liberación y fuga de la formulación.

Los liposomas son membranas de bicapa lipídica completamente cerradas que contienen un volumen acuoso atrapado. Los liposomas pueden ser vesículas unilaminares (que poseen una sola membrana bicapa) o vesículas multilaminares (estructuras tipo cebolla caracterizadas por múltiples bicapas de membrana, cada una separada de la siguiente por una capa acuosa). La bicapa está compuesta por dos monocapas lipídicas que tienen una región hidrofóbica de "cola" y una región hidrofílica de "cabeza". La estructura de la bicapa de membrana es tal que las "colas" hidrofóbicas (no polares) de las monocapas lipídicas se orientan hacia el centro de la bicapa, mientras que las "cabezas" hidrofílicas se orientan hacia la fase acuosa. Las formulaciones antiinfecciosas lipídicas son asociaciones de lípidos y el agente antiinfeccioso. Esta asociación puede ser covalente, iónica, electrostática, no

covalente o estérica. Estos complejos son no liposomales y son incapaces de atrapar solutos solubles en agua adicionales. Ejemplos de dichos complejos incluyen complejos lipídicos de anfotericina B (Janoff et al., Proc. Nat Acad. Sci., 85: 6122-6126, 1988) y cardioplipina complejada con doxorubicina.

5 Un clatrato de lípidos es una estructura tridimensional similar a una jaula que emplea uno o más lípidos en los que la estructura atrapa un agente bioactivo.

Los proliposomas son formulaciones que pueden convertirse en liposomas o complejos lipídicos al entrar en contacto con un líquido acuoso. La agitación u otra mezcladura puede ser necesaria.

### 5. Métodos de Preparación

10 El proceso para formar formulaciones de agentes activos lipídicos implica un proceso de "infusión de disolvente". Este es un proceso que incluye disolver uno o más lípidos en una cantidad pequeña, preferiblemente mínima, de un disolvente compatible con el proceso para formar una solución lipídica y luego infundir la solución con un medio acuoso que contiene el agente activo. Típicamente, un disolvente compatible con el proceso es uno que puede separarse por lavado en un proceso acuoso tal como diálisis o diafiltración. La "infusión de etanol", un tipo de infusión de disolvente, es un proceso que incluye disolver uno o más lípidos en una cantidad pequeña, preferiblemente mínima, de etanol para formar una solución lipídica y luego infundir la solución con un medio acuoso que contiene el agente activo. Una cantidad "pequeña" de disolvente es una cantidad compatible con la formación de liposomas o complejos lipídicos en el proceso de infusión. Es clave que las condiciones para el proceso de infusión conduzcan a la formación de coacervados. Las condiciones últimas para infundir una solución lipídica dada con una solución acuosa dada del agente activo se han de determinar en base a los Ejemplos que se presentan en esta memoria y al efecto de diversos parámetros que se muestran más adelante. También son útiles para un experto ordinario en la técnica las técnicas para formar coacervados tal como se describe en referencias tales como Bunderberg de Jong, H.G., Kruyt, H.R. Koazevation (Entmischung in Kolloidalen Systemen), Koll. Zeitsch. 1930, 50(10), 39-48; Gander B, Blanco-Prieto M.J., Thomasin C, Wandrey Ch. y Hunkeler D., Coacervation/Phase Separation. En: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Vol. 1, Swarbrick J, Boylan J.C., Eds., Marcel Dekker, 2002, págs. 481-497; Newton D.W.: Coacervation: Principles and Applications. En: Polymers for Controlled drug delivery. Tarcha P.J., Ed., CRC Press, Boca Raton, 1991, 67-81; Scott P.W., Williams A.C., Barry B.W., Characterization of complex coacervates of Some Tricyclic Antidepressants and evaluation of their potential for Enhancing Transdermal Flux. J. Controlled Release 1996, 41 (3), 215-227; Thomasin C, Merkle H.P., Gander B. Drug microencapsulation by PLA/PLGA Coacervation in the Light of Thermodynamics. 2. Parameters determining Microsphere Formation. J. Pharm Sci. 1998, 87 (30), 269-275; Ball V., Winterhalter M., Schwinte P., Lavallo Ph., Voegel J.-C., Schaal P. Complexation mechanism of Bovine serum Albumin and Poly(allylamine hydrochloride). J. Phys. Chem. B. 2002, 106, 2357-2364; Mohanty B., Bohidar H.B. Systematic of Alcohol-Induced Simple Coacervation in Aqueous Gelatin Solutions. Biomacromolecules 2003, 4, 1080-1086. De acuerdo con la invención la etapa se realiza mediante un proceso de infusión en línea.

35 El tamaño de los liposomas o la formulación lipídica se puede lograr mediante un cierto número de métodos tales como extrusión, tratamiento con ultrasonidos y técnicas de homogeneización que son bien conocidos y fácilmente puestos en práctica por los expertos ordinarios. La extrusión implica hacer pasar liposomas, bajo presión, una o más veces a través de filtros que tienen tamaños de poro definidos. Los filtros están hechos generalmente de policarbonato, pero los filtros pueden estar hechos de cualquier material duradero que no interactúe con los liposomas y que sea suficientemente fuerte para permitir la extrusión bajo una presión suficiente. Filtros preferidos incluyen filtros de "paso directo", porque generalmente pueden soportar la presión más alta de los procesos de extrusión preferidos de la presente invención. También se pueden utilizar los filtros de "trayectoria tortuosa". La extrusión también puede utilizar filtros asimétricos tales como los filtros Anopore™, que implica la extrusión de liposomas a través de un filtro poroso de óxido de aluminio de poro ramificado.

45 Los liposomas o las formulaciones lipídicas también se pueden reducir de tamaño mediante tratamiento con ultrasonidos, que emplea energía sónica para romper o cizallar los liposomas, que se transformarán espontáneamente en liposomas más pequeños. El tratamiento con ultrasonidos se lleva a cabo sumergiendo un tubo de vidrio que contiene la suspensión de liposomas en el epicentro sónico producido en un sonicador de tipo baño. Alternativamente, se puede utilizar un sonicador de tipo sonda en el que la energía sónica es generada por la vibración de una sonda de titanio en contacto directo con la suspensión de liposomas. Aparatos de homogeneización y molienda, tales como el homogeneizador Gifford Wood, Polytron™ o Microfluidizer, también se pueden utilizar para descomponer liposomas o formulaciones lipídicas más grandes en liposomas o formulaciones lipídicas más pequeños.

55 Las formulaciones liposomales resultantes se pueden separar en poblaciones homogéneas utilizando métodos bien conocidos en la técnica; tal como la filtración de flujo tangencial. En este procedimiento, se hace pasar una población de liposomas o formulaciones lipídicas de tamaño heterogéneo a través de filtros de flujo tangencial, dando como resultado con ello una población de liposomas con un límite de tamaño superior y/o inferior. Cuando se emplean dos filtros de diferentes tamaños, es decir, que tienen diferentes diámetros de poro, los liposomas más pequeños que el primer diámetro de poro se hacen pasar a través del filtro. Este filtrado puede entonces someterse a filtración de flujo tangencial a través de un segundo filtro, que tiene un tamaño de poro más pequeño que el primer

filtro. El producto retenido de este filtro es una población liposomal/complejada que tiene límites de tamaño superior e inferior definidos por los tamaños de poro del primer y segundo filtro, respectivamente.

5 Mayer et al. encontraron que los problemas asociados con el atrapamiento eficiente de agentes bioactivos ionizables lipofílicos tales como agentes antineoplásicos, por ejemplo, antraciclinas o alcaloides de la vinca, se pueden aliviar empleando gradientes de iones transmembrana. Además de inducir una mayor captación, dichos gradientes transmembrana también pueden actuar para aumentar la retención de agente activo en la formulación liposómica.

10 Las formulaciones de agentes activos lipídicos tienen un efecto sostenido y una menor toxicidad, lo que permite una administración menos frecuente y un índice terapéutico mejorado. En estudios preclínicos en animales y en comparación con tobramicina inhalada (no liposomal o basada en lípidos) en el nivel de dosis equivalente, se demostró que la amikacina liposomal durante el período de tiempo poco después de la administración, más de 24 horas después, tiene niveles de agente activo en el pulmón que oscilaban entre dos y varios cientos de veces los de tobramicina. Adicionalmente, la amikacina liposomal mantuvo estos niveles durante más de 24 horas. En un modelo con animales diseñado para imitar la infección por pseudomonas observada en pacientes con CF, se demostró que la amikacina liposomal elimina significativamente la infección en los pulmones de los animales cuando se compara con los aminoglucósidos libres.

20 El tensioactivo pulmonar permite la expansión y compresión de los pulmones durante la respiración. Esto se logra recubriendo el pulmón con una combinación de lípidos y proteínas. El lípido se presenta en forma de una monocapa con las cadenas hidrofóbicas dirigidas hacia afuera. El lípido representa el 80% del tensioactivo pulmonar, siendo la mayoría del lípido fosfatidilcolina, el 50% de la cual es dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) (Veldhuizen et al., 1998). Las proteínas tensioactivas (SP) que están presentes funcionan para mantener la estructura y facilitar tanto la expansión como la compresión del tensioactivo pulmonar como ocurre durante la respiración. De estos, SP-B y SP-C tienen específicamente un comportamiento lítico y pueden lisar liposomas (Hagwood et al., 1998; Johansson, 1998). Este comportamiento lítico podría facilitar la desintegración gradual de los liposomas. Los liposomas también se pueden ingerir directamente por macrófagos a través de fagocitosis (Couveur et al., 1991; Gonzales-Roth et al., 25 1991; Swenson et al., 1991). La absorción de liposomas por parte de los macrófagos alveolares es otro medio por el cual los agentes activos pueden ser administrados al sitio enfermo.

30 Los lípidos preferiblemente utilizados para formar formulaciones liposomales o lipídicas para inhalación son comunes a los lípidos endógenos que se encuentran en el tensioactivo pulmonar. Los liposomas están compuestos de bicapas que atrapan el agente activo deseado. Estos pueden configurarse como vesículas multilaminares de bicapas concéntricas con el agente activo atrapado dentro del lípido de las diferentes capas o del espacio acuoso entre las capas. La presente invención utiliza procesos únicos para crear formulaciones únicas de agente activos liposomales o lipídicos.

35 De acuerdo con la invención, las formulaciones lipídicas de amikacina de la presente invención se preparan mediante un método de infusión en línea en el que una corriente de solución lipídica se mezcla con una corriente de solución de amikacina en línea. Por ejemplo, las dos soluciones se pueden mezclar en línea dentro de un tubo de mezcladura precedido por un conector en Y o T. De esta forma, el método de infusión en línea crea las mejores condiciones para formar un coacervado de agente activo. Este método de infusión da como resultado menores relaciones de lípido a agente activo y mayores eficiencias de encapsulación.

40 Los procesos arriba descritos pueden mejorarse adicionalmente optimizando parámetros tales como el caudal, la temperatura, la concentración de agente de activación y la adición de sal después de la etapa de infusión. Los siguientes experimentos no representan necesariamente los métodos de la presente invención tal como se indica por las mayores relaciones de lípido a agente activo. Más bien, representan un conjunto de experimentos para someter a ensayo el efecto de los parámetros antes mencionados. Las múltiples variables dan una idea de la novedad que existe detrás del uso de técnicas de coacervación para formar formulaciones de agentes activos basadas en lípidos con bajas relaciones L/A.

### 5.1 Efecto de los caudales

50 Los caudales se variaron mientras se mantenía el caudal total en 800 mL/min. Para ello, se utilizaron dos bombas separadas ajustadas a diferentes velocidades de bombeo. Las soluciones mixtas se infundieron durante 10 s en un vaso de precipitados que contenía una solución de NaCl de manera que la concentración final de NaCl era de 1,5% y la concentración final de etanol no excedía del 30%. Después de mezclar, se hizo pasar una parte alícuota de 1 mL a través de una columna de filtración en gel Sephadex G-75 para separar la amikacina libre de la encapsulada. Una fracción de 1 mL con la densidad más alta (determinada por la turbidez visual) se recogió para su posterior análisis. Los resultados se presentan en la Tabla 1. El aumento de la relación de flujo de lípidos/amikacina dio como resultado una L/D casi constante hasta 300/500 mL/min. Con un aumento adicional de la tasa de lípidos, la L/D comenzó a aumentar y el tamaño de partícula también comenzó a aumentar. Al mismo tiempo, los mayores caudales de lípidos dieron una mejor recuperación de amikacina (eficacia de encapsulación) a medida que se agregaba más masa lipídica.



Tabla 1. Efecto de los caudales sobre la encapsulación de amikacina.\*

Lote	Caudales mL/min		AMK total mg/mL	AMK libre %	Lípido mg/mL	L/D	VOL Tamaño	AMK Recuperación %
	AMK	Lípido						
1	600	200	1,38	5,3	1,25	0,91	289	14,7
2	550	250	1,80	5,1	1,90	1,06	305	17,2
3	500	300	2,18	5,2	2,29	1,05	314	22,8
4	450	350	1,27	5,8	1,47	1,16	388	26,8
5	400	400	1,05	6,1	1,69	1,61	471	24,9

\* Las soluciones de lípidos y amikacina se mantuvieron a 40°C. La solución madre de amikacina fue de 50 mg/mL.

Se añadió una solución de NaCl al 10% antes de la infusión para obtener un 1,5% final. El tiempo de infusión se estableció en 10 s. Tubo de mezcladura 10 cm; mezclador en línea de 6 elementos posicionado a 0 cm.

- 5 El lote 3 con los caudales de lípidos/amikacina de 300/500 mL/min mostró la mejor L/D y tamaño de partícula, combinado con una recuperación de amikacina razonablemente alta. Por lo tanto, se decidió utilizar estos caudales para todos los experimentos adicionales.

- 10 Con el fin de reproducir los resultados en las condiciones elegidas, se preparó un lote completamente lavado (lote 6) utilizando diafiltración tal como se presenta en la Tabla 2. Se añadió solución de NaCl al 10% en el vaso de precipitados antes de la infusión para obtener la concentración final del 2% (en comparación con el 1.5% en los lotes en la Tabla 1). La relación L/D (1.71) resultante no fue tan buena como en el lote 3 en la Tabla 1 y el tamaño de partícula fue mayor. Esto puede deberse a un efecto adverso de la alta concentración de NaCl que contacta con los liposomas en las primeras fases de la formación de liposomas. Las muestras separadas (lavadas) utilizando columnas de filtración en gel tienden a tener una L/D mejor que las lavadas por diafiltración. Esto puede tener que ver con el diferente grado de experiencia en liposomas de estrés, o simplemente las muestras separadas en la columna de filtración en gel contenían una fracción de liposomas con una L/D mejor que no representa a toda la población.

- 20 Tabla 2. Resumen de los lotes completamente lavados. Los parámetros de proceso variados fueron: temperaturas, concentración de amikacina y otros (véase la Tabla 3 que figura a continuación). Todos los lotes se concentraron casi hasta un grado máximo, hasta que la presión de entrada alcanzó 10 PSI.

Lote	Temp, C L/AMK/W	Material AMK mg/mL	AMK total mg/mL	AMK libre %	Lípido mg/mL	L/D	VOL Tamaño nm	SD Tamaño %
6	40/40/30	50	36,1	2,7	61,8	1,71	392	43,4
8	50/TA/30	50	48,5	9,6	49,3	1,02	332	32,0
9	50/TA/30	50	41,6	5,1	43,2	1,04	359	34,4
10	50/TA/30	50	53,1	10,2	34,4	0,65	350	28,6
11	50/TA/30	40	20,7	4,8	46,9	2,27	407	35,9
12	50/TA/30	40	81,0	1,9	49,4	0,61	341	33,0
13	50/TA/30	30	68,6	1,7	62,5	0,91	311	22,4
14	50/TA/30	40	79,6	1,6	47,8	0,60	346	37,2
15	50/TA/30	40	71,3	2,0	42,3	0,59	353	33,4
16	30/30/30	40	61,9	6,1	51,5	0,83	369	28,4
17	30/30/30	40	73,8	2,4	57,2	0,77	362	32,6

Lote	Temp, C L/AMK/W	Material AMK mg/mL	AMK total mg/mL	AMK libre %	Lípido mg/mL	L/D	VOL Tamaño nm	SD Tamaño %
18	30/30/30	40	74,4	2,3	54,0	0,73	549	61,7

\* La 3ª columna representa las temperaturas de las soluciones de Lípidos y Amikacina justo antes de la infusión, y la temperatura durante el lavado (diafiltración). TA = temperatura ambiente. "VOL Tamaño" es el tamaño de partícula ponderado en volumen.

Tabla 3. Condiciones de procesamiento para los lotes 1-18. \*

Lote	Tubo mezcladura cm	Posición mezclador cm	NaCl añadido			Condiciones de lavado	
			Material %	Partes en volumen	Tiempo hasta infusión	NaCl %	1 <sup>er</sup> lavado
1-5	10	0	VAR	VAR	antes	1,5	(columna Seph)
6	10	0	10	200	antes	1,5	diafiltración
7	10	5	10	100	antes	1,5	(columna Seph)
8	10	5	10	150	durante	1,5	diafiltración
9	10	5	10	150	durante	1,5	diafiltración
10	10	5	10	100	5 min después	1,5	2x dilución
11	10	5	10	150	inm. después	1,5	2x dilución
12	10	5	H2O	180	20 min después	1,5	2x dilución
13	10	5	H2O	180	30 min después	1,5	2x dilución
14	10	5	H2O	180	30 min después	1,5	diafiltración
15	10	5	1,5	180	30 min después	1,5	diafiltración
16	60	NO	0,9	180	durante	0,9	diafiltración
17	60	NO	1,5	180	durante	1,5	diafiltración
18	60	0	1,5	180	durante	1,5	diafiltración

5 \* Las soluciones de Lípidos y amikacina se infundieron a caudales de 300/500 mL/min durante 30 s (ejemplos 6 -10) o 20 s (ejemplos 11-18). Se añadió una solución acuosa adicional (NaCl o agua) (como partes con relación a 500 partes de volumen de amikacina).

### 5.2 Efectos de la temperatura del proceso

10 Los ajustes se mantuvieron igual que en el lote 3, excepto que la cantidad de solución de NaCl añadida fue menor, por lo que la concentración final fue del 1,0%. La solución se añadió nuevamente antes de que se iniciara la infusión debido a que con el corto tiempo de infusión era difícil hacer la adición durante la infusión. Además, durante la infusión, el mezclador en línea se desplazó al extremo del tubo de mezcladura bajo la presión del flujo. La posición del mezclador era de 5 cm desde el extremo frontal del tubo en lugar de 0 cm para el lote 3. Esto puede ser importante, ya que la relación L/D obtenida a las mismas condiciones de temperatura de 40/40°C en el lote 20 fue de 0,55, casi la mitad de la del lote 3. Al comparar la encapsulación de amikacina a diferentes temperaturas de infusión, se puede ver que, sorprendentemente, temperaturas más bajas dieron una mejor L/D. De las temperaturas testadas, las temperaturas de lípido/amikacina de 30/30°C y 50/TA dieron relaciones L/D similares de 0,32 y 0,37. De nuevo, como en los lotes 1-5, los números de estas muestras lavadas por filtración en gel fueron bajos, tal vez menores que si los lotes se hubieran lavado mediante diafiltración.

20 Tabla 4. Efecto de la temperatura en la encapsulación de amikacina. \*

Lote	Temperatura, C		AMK total mg/mL	AMK libre %	Lípido mg/mL	L/D	VOL Tamaño nm
	Lípido	AMK					
19	30	30	4,88	2,8	1,54	0,32	278
20	40	40	3,62	1,5	1,98	0,55	335
21	50	50	3,50	1,8	2,74	0,78	309
22	50	TA	5,27	2,9	1,93	0,37	342

\* Soluciones de lípidos y amikacina se infundieron a dosis de 300/500 mL/min durante 10 s. La solución madre de amikacina fue de 50 mg/mL. Se añadió una solución de NaCl al 10% antes de la infusión para obtener una concentración final del 1,0%. Tubo de mezcladura 10 cm; mezclador en línea de 6 elementos posicionado a 5 cm.

5 En experimentos separados, se encontró que mezclar etanol al 90% y agua a 30°C y 30°C o 50°C y 22°C, respectivamente, dio como resultado una temperatura final similar de casi 36°C. Esto sugiere que la temperatura de la mezcla final en lugar de la de los componentes individuales es importante para la encapsulación de amikacina. Las temperaturas de 50°C/TA se utilizaron en los ejemplos 6-15. En los ejemplos 16 -18 temperaturas de 30°C y 30°C para las dos corrientes se utilizaron con resultados comparables, aunque se observó un poco menos de encapsulación de amikacina.

### 10 5.3 Efecto de la adición post-infusión de volumen acuoso

La atención se centró seguidamente en las etapas de la adición de solución de NaCl y el proceso de lavado. Los parámetros del proceso se variaron en diversas direcciones. Inmediatamente después de la etapa de infusión a caudales de 300/500, la concentración de etanol en la mezcla alcanza el 34%. La amikacina tiene una solubilidad limitada a esta concentración (véase la Figura 2).

15 Si se comienza con 50 mg/mL de material de amikacina, entonces, después de mezclarlo con la solución lipídica habrá más de 30 mg/mL de amikacina total, en donde al menos la mitad (15 mg/mL) es amikacina libre, suponiendo un 50% de eficacia de encapsulación. Esto es más alto que el límite de solubilidad a etanol al 34%. Una posible solución a este problema es añadir más agua al recipiente con la mezcla de lípidos/amikacina, reduciendo así la concentración tanto de etanol como de amikacina. Por ejemplo, añadir 200 partes de agua (o solución de NaCl) a  
20 800 partes de lípido/amikacina reduciría el etanol a 27% (Figura 2). Esto hace que la amikacina sea soluble a 15 mg/mL o incluso más, dependiendo de la temperatura.

Además, la adición de NaCl puede estabilizar las condiciones osmóticas. Cuando los liposomas se forman y la amikacina se encapsula a una concentración interna de 200-300 mg/mL, solo hay ~15 mg/mL o así de amikacina no encapsulada. En ausencia de solución salina, esto crearía un desequilibrio osmótico, que a su vez podría conducir a una fuga de amikacina. La adición de 150 partes de NaCl al 10% a 800 partes de lípido/amikacina dará como  
25 resultado una concentración final de NaCl de aproximadamente 1,5% (liposomas externos).

Se generó un cierto número de lotes en los que se añadieron diferentes cantidades de solución de NaCl (o agua en algunos lotes) en diferentes momentos en relación con el evento de infusión (véase la Tabla 5, compilada a partir de las Tablas 2 y 3). De la tabla se puede ver una tendencia general que conduce a las siguientes conclusiones:

30 - Se requiere un cierto intervalo de tiempo entre la infusión y la adición del volumen acuoso para obtener una L/D menor (si se utiliza un tubo de mezcladura corto). De los lotes 6-15, aquellos con un intervalo de 20 s o más tenían una L/D menor. Una posible explicación es que los liposomas no se forman por completo inmediatamente después de la mezcladura de las corrientes. Cuando se utiliza un tubo de mezcladura más largo (lotes 16-18), lo cual permite un tiempo de mezcladura más largo, no se requiere el intervalo de  
35 tiempo.

- Añadir una solución de NaCl de alta concentración para equilibrar la osmolalidad no ayuda en realidad a retener la amikacina. De hecho, la adición de agua pura en un intervalo de tiempo apropiado dio como resultado la menor concentración de L/D y amikacina total.

40 - La adición de 100 partes de NaCl al 10% (lote 9) 5 min después de la infusión dio una relación L/D competitiva, pero no dio una concentración de amikacina tan buena. Puede ser que NaCl, cuando está presente en etapas tempranas con concentraciones de etanol relativamente altas, conduzca a una mayor agregación y viscosidad.

Tabla 5. Papel del volumen acuoso y concentración de NaCl añadido a la mezcla de lípidos/amikacina para ajustar la concentración de etanol. No se muestran todas las variables; véanse las Tablas 2 y 3.

Lote	Material de AMK mg/mL	NaCl añadido			AMK total mg/mL	L/D	VOL Tamaño nm
		Material %	Partes en volumen	Tiempo hasta infusión			
6	50	10	200	antes	36,1	1,71	392
8	50	10	150	durante	48,5	1,02	332
9	50	10	150	durante	41,6	1,04	359
10	50	10	100	5 min después	53,1	0,65	350
11	40	10	150	inm. después	20,7	2,27	407
12	40	H <sub>2</sub> O	180	20 min después	81,0	0,61	341
13	30	H <sub>2</sub> O	180	30 min después	68,6	0,91	311
14	40	H <sub>2</sub> O	180	30 min después	79,6	0,60	346
15	40	1,5	180	30 min después	71,3	0,59	353
16	40	0,9	180	durante	61,9	0,83	369
17	40	1,5	180	durante	73,8	0,77	362
18	40	1,5	180	durante	74,4	0,73	549

5.4 Efecto de la solución madre antiinfecciosa

5 Anteriormente se encontró que utilizando 50 mg/mL de una solución madre de amikacina se producía el mejor atrapamiento. Reduciendo la concentración del material de amikacina a 40 mg/mL aumentó la L/D cuando se utiliza en procesos convencionales. Con el proceso de infusión en línea de dos corrientes, la concentración de etanol alcanza niveles más altos, por lo que la amikacina actual de 50 mg/mL puede no ser la concentración óptima.

10 La Tabla 6 resume el efecto del uso de diversas concentraciones de material de amikacina. 40 mg/mL proporcionó valores de L/D comparables o mejores, e incluso mejoró la recuperación de amikacina. Utilizando menos amikacina con relación a una cantidad constante de lípidos, y proporcionando una L/D similar, resultó un mayor porcentaje de encapsulación (lote 12). Una disminución adicional de la concentración del material de amikacina a 30 mg/mL dio como resultado una L/D ligeramente aumentada, aunque la recuperación fue aún impresionante (lote 13).

Tabla 6. La concentración del material de amikacina puede reducirse al tiempo que se mejora la eficiencia. La recuperación de amikacina se calcula en base a la L/D obtenida y supone una recuperación del 100% de los lípidos.

Lote	Material de AMK mg/mL	AMK total mg/mL	AMK libre %	Lípido mg/mL	L/D	VOL Tamaño nm	AMK Recuperación %
10	50	53,1	10,2	34,4	0,65	350	37,0
12	40	81,0	1,9	49,4	0,61	341	51,2
13	30	68,6	1,7	62,5	0,91	311	45,7
14	40	79,6	1,6	47,8	0,60	346	52,0

15 La reducción de la concentración del material de amikacina tiene otra implicación. Reduce la concentración de amikacina libre en una mezcla de lípidos/amikacina post-infusión, lo que permite que permanezca soluble a una mayor concentración de etanol. Suponiendo que los lípidos y la amikacina se mezclen a una relación de 300/500, el material de amikacina es de 50 mg/mL, y la eficacia de encapsulación es del 37%, entonces la amikacina libre inicial sería de ~20 mg/mL. De forma similar, 40 mg/mL de material de amikacina con un 52% de encapsulación daría

como resultado ~12 mg/mL de amikacina libre. 30 mg/mL de material de amikacina con un 46% de encapsulación daría como resultado ~10 mg/mL de amikacina libre

#### 6. Relación de Lípidos a Agentes Activos

5 Hay varias formas de aumentar el atrapamiento de agente activo (p. ej., aminoglucósidos tales como amikacina, tobramicina, gentamicina) en liposomas. Una forma es hacer liposomas muy grandes ( $> 1 \mu\text{m}$ ), en que el volumen atrapado por cantidad de lípidos es grande. Este enfoque no es práctico para la inhalación (nebulización) de liposomas porque 1) el esfuerzo de cizallamiento durante la nebulización tiende a la ruptura de los liposomas de una manera dependiente del tamaño, en que los liposomas más grandes ( $> 0,5 \mu\text{m}$ ) sufren una mayor liberación y 2) los  
10 tamaños más pequeños de gotitas necesarios para una buena deposición en el pulmón son en sí mismos menores que aproximadamente  $\sim 3 \mu\text{m}$ . Por lo tanto, para la inhalación es deseable mantener el tamaño del liposoma lo más pequeño posible para evitar una liberación excesiva. Actualmente, el diámetro medio para los liposomas descritos en esta memoria es inferior a aproximadamente  $0,4 \mu\text{m}$  (véase la Tabla 4).

Otro enfoque para disminuir la L/A es utilizar lípidos cargados negativamente. Los aminoglucósidos enumerados anteriormente están altamente cargados positivamente con 4 a 5 aminas por compuesto. Habitualmente, las sales sulfato de estos aminoglucósidos se utilizan en formulaciones terapéuticas. Junto con el carácter multi-catiónico se da una fuerte unión a los liposomas cargados negativamente. Esto da como resultado una mayor atrapamiento durante la formación de liposomas. El propósito de las formulaciones antiinfecciosas es proporcionar una liberación sostenida al entorno pulmonar. Un aclaramiento rápido de los liposomas por captación de macrófagos sería contrario a esto. Se ha documentado bien que los liposomas cargados negativamente experimentan un grado mucho más alto de captación por parte de los macrófagos que los liposomas neutros. Por lo tanto, es deseable utilizar liposomas neutros.

Un grupo de tecnologías que permiten el atrapamiento de agente activo muy alto en liposomas pequeños se basa en la carga de gradientes en donde se usa un gradiente de pH, gradiente de sulfato de amonio o gradiente de sulfato de Mg para cargar fármacos de amina en liposomas: véanse las Patentes de EE.UU. N°s: 5.578.320; 5.736.155; 5.837.279; 5.922.350 (gradiente de pH); 5.837.282; 5.785.987 (gradiente de sulfato de Mg); y 5.316.771 (gradiente de sulfato de amonio). Estas técnicas sólo funcionan para aminas permeables a la membrana (mono-aminas, en las que la forma neutra es permeable tales como doxorubicina y daunorrubicina). La carga de gradiente no funcionará para determinados agentes antiinfecciosos tales como los aminoglucósidos, ya que son impermeables (demasiado grandes y muy altamente cargados).

30 Todos los procedimientos descritos en esta memoria pueden adaptarse fácilmente para la fabricación aséptica a gran escala. El tamaño final del liposoma puede ajustarse modificando la composición lipídica, la concentración, los excipientes y los parámetros de procesamiento.

La relación de lípido a agente activo obtenida mediante los procedimientos de la presente invención es de aproximadamente 0,40 a 0,49 : 1. Además, el porcentaje de agente activo libre, presente después de que el producto se dialice durante una duración particular, disminuye.

#### 7. Dosificaciones

La dosificación de cualquier composición de la presente invención variará dependiendo de los síntomas, la edad y el peso corporal del paciente, la naturaleza y la gravedad del trastorno a tratar o prevenir, la vía de administración y la forma de la composición objeto. Cualquiera de las formulaciones objeto se puede administrar en una sola dosis o en dosis divididas. Las dosificaciones para las composiciones de la presente invención se pueden determinar fácilmente mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia o como se enseñan en esta memoria.

En determinadas realizaciones, la dosificación de los compuestos objeto estarán generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,01 ng a aproximadamente 10 g por kg de peso corporal, específicamente en el intervalo de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 0,1 g por kg, y más específicamente en el intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 50 mg por kg.

Puede ser necesario identificar una dosis o cantidad efectiva y cualquier posible efecto sobre el tiempo de administración de la formulación para cualquier composición particular de la presente invención. Esto se puede lograr mediante un experimento rutinario tal como se describe en esta memoria, utilizando uno o más grupos de animales (preferiblemente al menos 5 animales por grupo), o en ensayos en seres humanos si es apropiado. La efectividad de cualquier composición objeto y método de tratamiento o prevención puede evaluarse administrando la composición y evaluando el efecto de la administración midiendo uno o más índices aplicables, y comparando los valores de post-tratamiento de estos índices con los valores de los mismos índices antes del tratamiento.

El momento preciso de administración y la cantidad de cualquier composición objeto particular que proporcionará el tratamiento más efectivo en un paciente dado dependerá de la actividad, farmacología y biodisponibilidad de la composición objeto, condición fisiológica del paciente (incluyendo edad, sexo, tipo y estadio de la enfermedad, estado físico general, capacidad de respuesta a una dosificación y tipo de medicación dados), vía de administración y similares. Las directrices presentadas en esta memoria pueden utilizarse para optimizar el tratamiento, p. ej.,

determinar el tiempo óptimo y/o la cantidad de administración, lo que requerirá no más que una experimentación rutinaria que consiste en monitorizar al sujeto y ajustar la dosificación y/o el momento.

5 Mientras que el sujeto está siendo tratado, la salud del paciente puede monitorizarse midiendo uno o más de los índices relevantes en momentos predeterminados durante el periodo de tratamiento. El tratamiento, incluida la composición, las cantidades, los tiempos de administración y la formulación, pueden optimizarse de acuerdo con los resultados de dicha monitorización. El paciente puede ser re-evaluado periódicamente para determinar el grado de mejoría midiendo los mismos parámetros. Los ajustes a la o las cantidades de la composición objeto administrada y posiblemente hasta el momento de la administración se pueden hacer en base a estas re-evaluaciones.

10 El tratamiento puede iniciarse con dosis más pequeñas que son menores que la dosis óptima del compuesto. Después de eso, la dosificación puede aumentarse en pequeños incrementos hasta que se alcance el efecto terapéutico óptimo.

El uso de las composiciones objeto puede reducir la dosificación requerida para cualquier agente individual contenido en las composiciones (p. ej., el agente antiinfeccioso) debido a que el inicio y la duración del efecto de los diferentes agentes pueden ser complementarios.

15 La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones objeto pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales de experimentación, p. ej., para determinar la  $DL_{50}$  y la  $DE_{50}$ .

20 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar para formular un rango de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de cualquier composición objeto se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la  $DE_{50}$  con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para composiciones de la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular.

### 8. Formulación

25 Las formulaciones antiinfecciosas lipídicas, según se preparan de acuerdo con la presente invención, pueden comprender una dispersión acuosa de liposomas. La formulación puede contener excipientes lipídicos para formar los liposomas, y sales/tampones para proporcionar la osmolaridad y el pH adecuados. La formulación puede comprender un excipiente farmacéutico. El excipiente farmacéutico puede ser un material líquido, diluyente, disolvente o encapsulante, implicado en portar o transportar cualquier composición objeto o componente de la

30 misma de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo. Cada uno de los excipientes debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con la composición objeto y sus componentes y no ser perjudicial para el paciente. Excipientes adecuados incluyen trehalosa, rafinosa, manitol, sacarosa, leucina, trileucina y cloruro de calcio. Ejemplos de otros excipientes adecuados incluyen (1) azúcares tales como lactosa, y glucosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y fécula de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa

35 sódica, etil celulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles tales como propilenglicol; (11) polioles tales como glicerol, sorbitol y polietilenglicol; (12) ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tampón tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de

40 aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua apirógena; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de tampón fosfato; (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

### **Ejemplificación**

#### **Ejemplo 1**

45 Proceso de infusión en línea

Se mezclaron aproximadamente 20 mg/ml de lípido total (DPPC:colesterol = 2:1 en peso) en etanol y aproximadamente 75 mg/ml de sulfato de amikacina (aproximadamente 50 mg/ml de amikacina) en agua juntos en el recipiente reactor por el método de infusión en línea de dos corrientes. Se alimentaron dos soluciones en el

50 conector con forma de Y a una tasa de aproximadamente 1,0 L/min y aproximadamente 1,5 L/min, respectivamente. Durante la infusión de dos corrientes, se añadió agua por separado en el recipiente del reactor a un caudal similar (aproximadamente 1,0 L/min) como el caudal de la solución de lípidos. La suspensión de amikacina-lípidos infundida en el recipiente reactor se diluye instantáneamente mediante la alimentación continua de agua. Este agua adicional ayuda a sellar la membrana al diluir el etanol y también reduce la viscosidad de la suspensión, reduciendo

55 consecuentemente la presión de entrada del cartucho de diafiltración. Después de la infusión, la suspensión se concentra reduciendo el volumen a la mitad utilizando diafiltración. La suspensión concentrada se lava por diafiltración durante un suministro nuevo de solución de NaCl al 3,0%. La suspensión lavada se concentra

adicionalmente por diafiltración hasta que se alcanza la concentración de amikacina total deseada. Los resultados se dan en la Tabla 7.

**Tabla 7.**

Lote	Temp. de Lavado (°C)	Total [amikacina] mg/ml	Total [lípidos] mg/ml	Lípido/Fármaco
I	TA*	130,3	54,2	0,42
II	TA*	126,0	57,0	0,45
III	35	130,0	60,9	0,47

Temperatura ambiente (19-23° C)

5

### Ejemplo 2

#### Encapsulación de Albúmina de Suero Bovino (BSA) mediante técnica de coacervación (no de acuerdo con la invención)

BSA es una proteína que tiene un punto isoeléctrico  $pI = 4,9$ . A pH por encima de ese punto, se puede considerar como un coloide con una carga neta negativa. Se ha demostrado que forma coacervados complejos con diversos polielectrolitos tales como Poli(hidrocloruro de alilamina), que a su vez se ve afectado por la fuerza iónica del medio, el pH y la temperatura. Se encontró que la adición de no disolvente a la albúmina (etanol) también puede inducir la coacervación. Cuando BSA se disuelve en agua a pH 7,0, y la concentración de etanol añadido excede de ~45% en peso de BSA, las moléculas se agregan para formar gotitas de fase coacervada, conduciendo así un fuerte aumento en la dispersión de la luz. La adición de NaCl (aumento de la fuerza iónica) da como resultado que se necesita menos etanol para inducir la coacervación. La disminución del pH tiene un efecto similar (Figura 4). Los iones divalentes (p. ej.,  $Mg^{2+}$ ) tienen un efecto incluso más fuerte sobre la disminución de la concentración crítica de etanol requerida para inducir la coacervación de BSA (Figura 5). El efecto más drástico se encontró cuando se añadió el polication PEI de bajo peso molecular a la solución de BSA (Figura 6). Por lo tanto, 0,05 mg/mL de PEI en términos molares es una concentración ~60  $\mu M$ , que representa solo aproximadamente 1 molécula de PEI por cada 3 moléculas de BSA.

Para encapsular BSA en liposomas se utilizó una solución acuosa de BSA a 10 mg/ml en NaCl 20 mM, pH 5,5. Se preparó una solución lipídica por separado a una concentración de 10 mg/mL y una relación molar de DPPC/DPPG/Colesterol de 60:5:40 en etanol al 95%. Todas las soluciones se precalentaron a 30°C. La solución lipídica (0,4 mL) se añadió mediante una pipeta a una solución de 1 mL de BSA en un tubo de ensayo y se sometió a agitación vorticial para garantizar una mezcladura completa. 20 segundos más tarde se añadieron 0,6 mL de solución de sacarosa al 5% y se repitió la agitación vorticial. Para determinar la encapsulación de BSA, se colocaron 0,8 mL de la suspensión de liposomas resultante en un gradiente de sacarosa del 5-20% y se centrifugó durante 30 minutos a 30.000 RPM. Los liposomas cargados formaron un sedimento más pesado que el 20% de sacarosa. El sedimento se recogió y se cuantificó en cuanto a lípidos y BSA. Los lípidos se midieron por HPLC de fase inversa y se midió BSA por fluorescencia (excitación 280 nm, emisión 320 nm). Se encontró que el sedimento contenía 1,6 mg de lípidos y 1,3 mg de BSA, dando así una relación de L/D de 1,2 que es inferior a la que normalmente se observa para proteínas (por ejemplo, véase la patente de EE.UU. N° 6.843.942, en donde la encapsulación de la superóxido dismutasa humana recombinante (rh-SOD) en una formulación de DPPC-colesterol-estearilamina se preparó con una relación L / D de ~5).

#### 35 Referencias

1. Veldhuizen, R., Nag, K., Orgeig, S. y Possmayer, F. The Role of Lipids in Pulmonary Surfactant, *Biochim. Biophys. Acta* 1408:90-108 (1998).
2. Hagwood, S., Derrick, M. y Poulain, F., Structure and Properties of Surfactant Protein B, *Biochim. Biophys. Acta* 1408:150-160 (1998).
3. Johansson, J., Structure and Properties of Surfactant Protein C, *Biochim. Biophys. Acta* 1408:161-172 (1998).
4. Ikegami, M. y Jobe, A.H., Surfactant Protein Metabolism in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1408:218-225 (1998).
5. Couveur, P., Fattel, E. y Andremont, A., Liposomes and Nanoparticles in the Treatment of Intracellular Bacterial Infections, *Pharm. Res.* 8:1079-1085 (1991).

45

6. Gonzales-Rothi, R.J., Casace, J., Straub, L. y Schreier, H., Liposomes and Pulmonary Alveolar Macrophages: Functional and Morphologic Interactions, *Exp. Lung Res* 17:685-705 (1991).
7. Swenson, C.E., Pilkiewicz, F.G. y Cynamon, M.H., Liposomal Aminoglycosides and TLC-65 Aids Patient Care 290-296 (diciembre de 1991).
- 5 8. Costerton, J.W., Stewart, P.S., y Greenberg, E.P., Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections, *Science* 284:1318-1322 (1999).
9. Cash, H.A., Woods, D.E., McCullough, W.G., Johanson, J.R. y Bass, J.A., A Rat Model of Chronic Respiratory Infection with *Pseudomonas aeruginosa*, *American Review of Respiratory Disease* 119:453-459 (1979).
- 10 10. Cantin, A.M. y Woods, D.E. Aerosolized Prolastin Suppresses Bacterial Proliferation in a Model of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160:1130-1135 (1999).
11. Price, K.E., DeFuria, M.D., Pursiano, T.A. Amikacin, an aminoglycoside with marked activity against antibiotic-resistant clinical isolates. *J Infect Dis* 134:S249261 (1976).
- 15 12. Damaso, D., Moreno-Lopez, M., Martínez-Beltran, J., Garcia-Iglesias, M.C. Susceptibility of current clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and enteric gram-negative bacilli to Amikacin and other aminoglycoside antibiotics. *J Infect Dis* 134:S394-90 (1976).
13. Pile, J.C., Malone, J.D., Eitzen, E.M., Friedlander, A.M., Anthrax as a potential biological warfare agent. *Arch. Intern. Med.* 158:429-434 (1998).
- 20 14. Gleiser, C.A., Berdjis, C.C., Hartman, H.A. y Glouchenour, W.S., Pathology of experimental respiratory anthrax in *Macaca mulatta*. *Brit. J. Exp. Path.*, 44:416-426 (1968).



**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar una formulación de fármaco de base liposomal, que comprende mezclar una solución lipídica que comprende un lípido disuelto en un disolvente orgánico a un caudal de 1 L/min a 3 L/min con una solución acuosa de amikacina a un caudal de 1,5 L/min a 4,5 L/min para formar un coacervado de amikacina,
- 5 en el que el lípido se mezcla con el coacervado de amikacina y el coacervado de amikacina inicia la formación de bicapa lipídica alrededor del coacervado de amikacina y
- en el que la solución lipídica y la solución acuosa de amikacina se mezclan a partir de dos corrientes separadas de una manera en línea, en donde la concentración de la amikacina dentro del liposoma es más alta que la concentración de amikacina externa.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que se induce al lípido para formar la bicapa lipídica cambiando el pH de la solución acuosa de amikacina.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que las dos corrientes penetran en un conector en Y o T antes de la mezclado en línea.
- 15 4. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que se añade una tercera corriente de agua o agua salada para diluir la mezcla de lípidos y amikacina resultante.
5. El método de la reivindicación 3 o 4, en el que la relación de caudal de solución lipídica al caudal de solución acuosa de amikacina es 2:3.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la solución lipídica tiene un caudal de 1 L/min y la solución acuosa de amikacina tiene un caudal de 1,5 L/min.
- 20 7. El método de la reivindicación 6, en el que el agua o el agua salada se añade a un caudal de 1 L/min.
8. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el disolvente orgánico es etanol.
9. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la solución lipídica comprende una mezcla de un fosfolípido y un esteroles.
- 25 10. El método de la reivindicación 9, en el que el fosfolípido es dipalmitoil/fosfatidilcolina (DPPC) y el esteroles es colesterol.
11. El método de la reivindicación 10, en el que la relación DPPC:colesterol es 2:1 en peso.
12. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la concentración del lípido en la solución lipídica es 10-30 mg/ml y la concentración de la amikacina en la solución acuosa de amikacina es 40-100 mg/ml.
- 30 13. El método de la reivindicación 12, en el que la concentración del lípido en la solución lipídica es 20 mg/ml y la concentración de la amikacina en la solución acuosa de amikacina es 75 mg/ml.
14. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la amikacina es sulfato de amikacina.

Figura 1

Lípidos 20 ng/ml en EtOH 90%,  
Tubo L/S 25, DI 0,19" (4,8 mm)  
Caudal ~ 300 ml/min

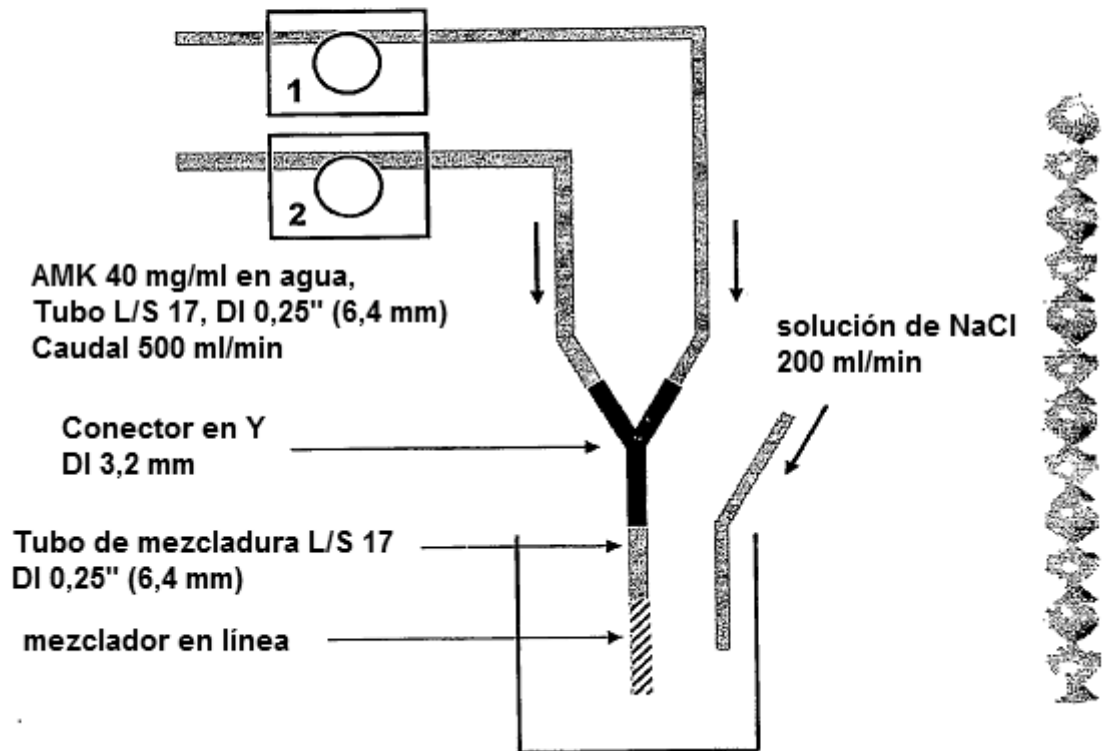


Figura 2

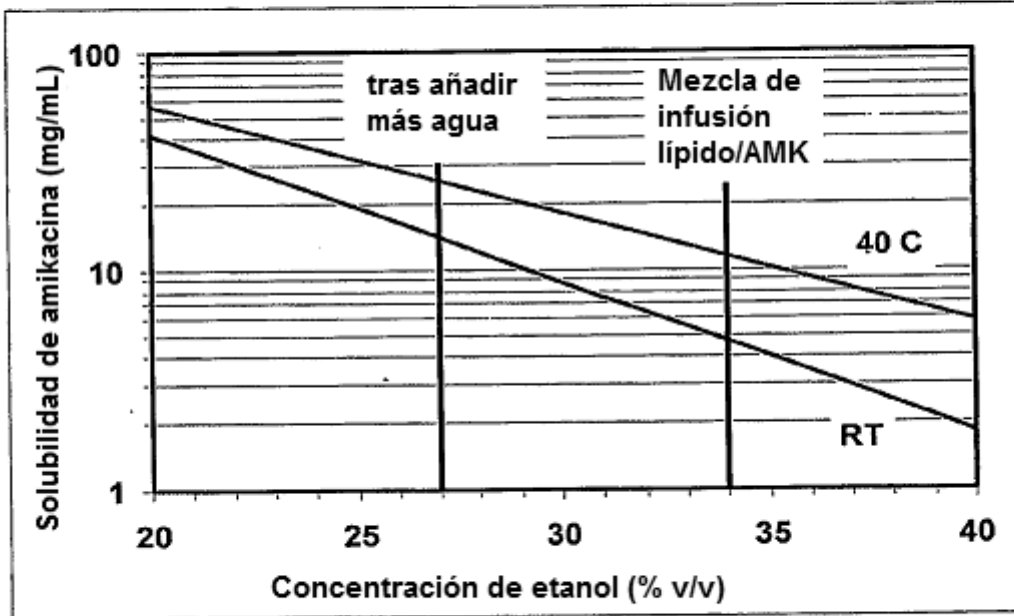


Figura 3

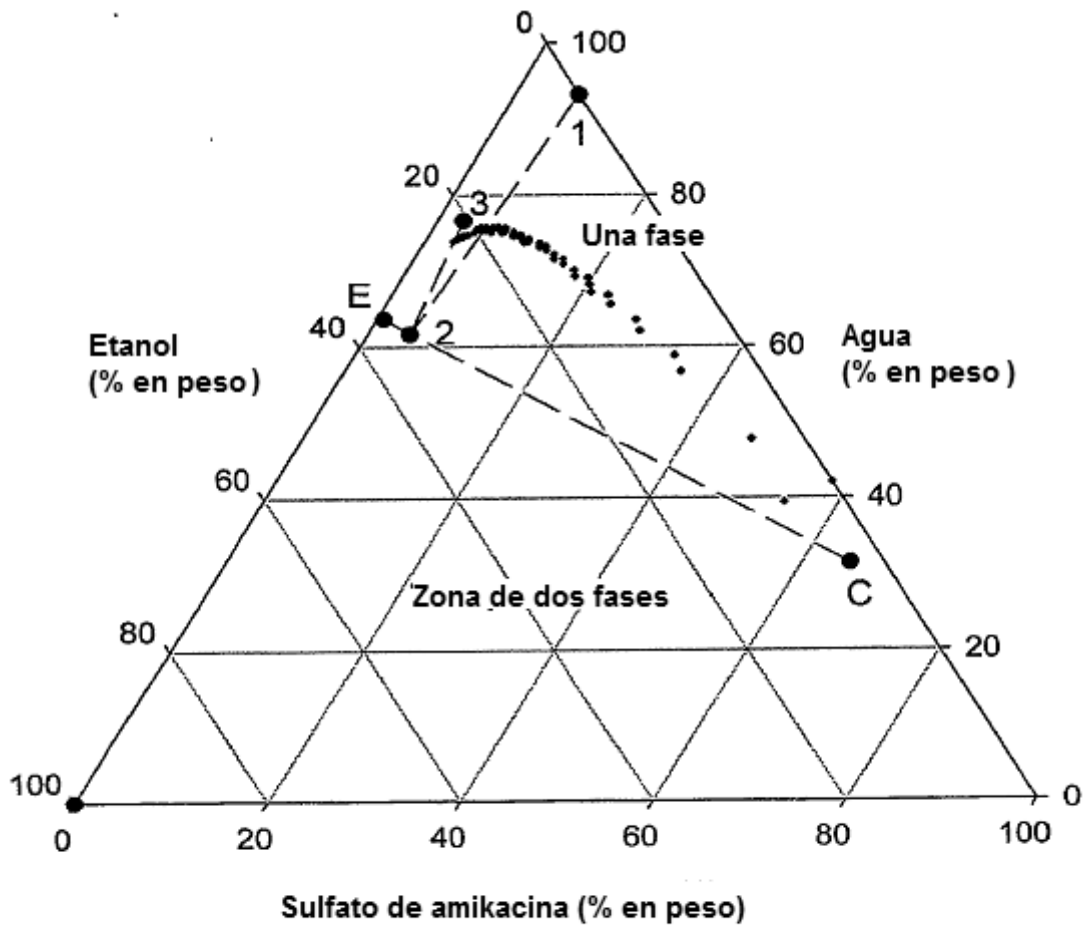


Figura 4

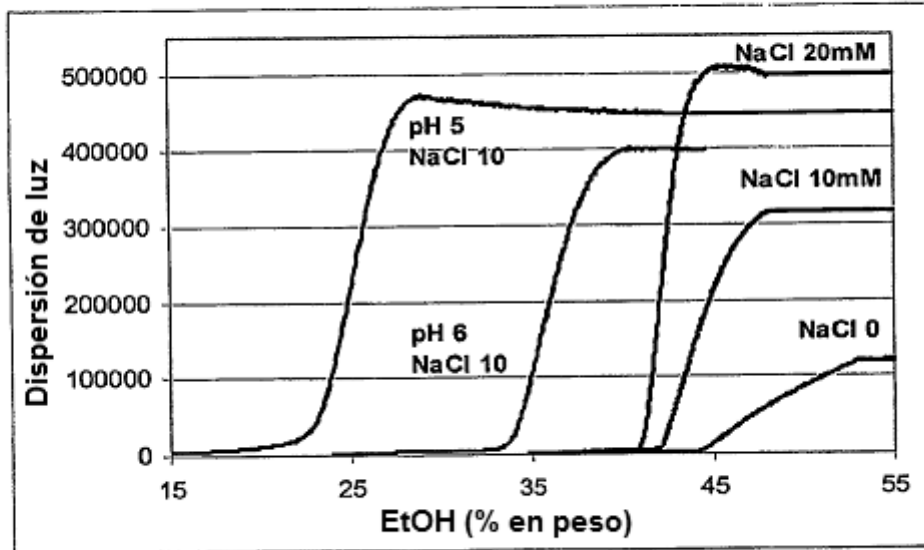


Figura 5

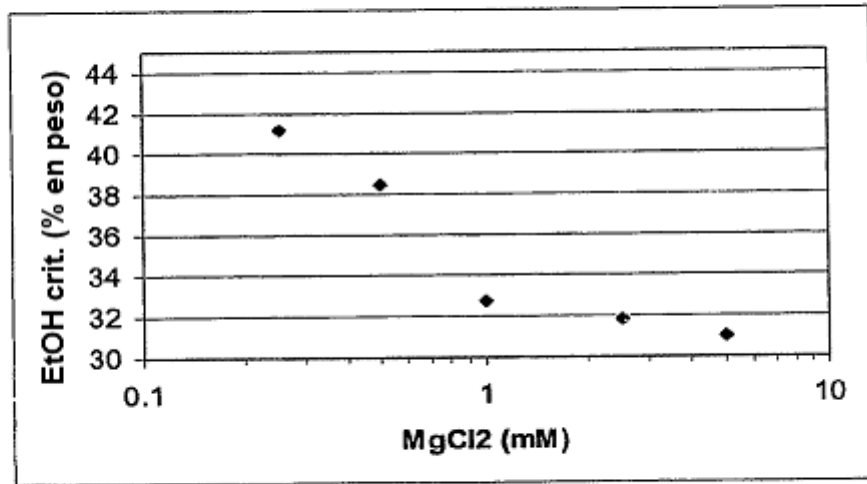


Figura 6

