

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 581**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013** **E 16188779 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018** **EP 3135274**

54 Título: **Formulación y fabricación de liposomas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2018

73 Titular/es:
BIOREST LTD. (100.0%)
Kiryat Atidim, Bldg. 8
Tel Aviv, 6158101, IL

72 Inventor/es:
RICHTER, YORAM;
ZELIG, YEHUDA;
ELMALAK, OMAR y
EYAL, DROR

74 Agente/Representante:
ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 685 581 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).

FORMULACIÓN Y FABRICACIÓN DE LIPOSOMAS**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una formulación de liposomas novedosa y a un procedimiento de fabricación para la formulación de liposomas

10 Antecedentes de la invención

Se conoce bien en la técnica que los liposomas funcionan como portadores para administrar agentes terapéuticos a células seleccionadas como diana para tratar una variedad de estados médicos. En una aplicación, pueden formularse liposomas para encapsular un agente farmacéutico que puede fagocitarse selectivamente por macrófagos. Una vez fagocitado, el liposoma libera el agente intracelularmente, inhibiendo las funciones inflamatorias de los macrófagos, entre otros efectos.

La técnica describe varios métodos para preparar tales liposomas (véase por ejemplo, Mönkkönen, J. *et al.*, 1994, J. Drug Target, 2:299-308; Mönkkönen, J. *et al.*, 1993, Calcif. Tissue Int., 53:139-145; Lasic DD., Liposomes Technology Inc., Elsevier, 1993, 63-105 (capítulo 3); Winterhalter M, Lasic DD, Chem Phys Lipids, 1993; 54(1-3):35-43). En un método de este tipo, se forman liposomas para dar apilamientos de bicapas cristalinas líquidas que se hidratan para dar láminas lipídicas hidratadas, que se desprenden durante la agitación y se cierran sobre sí mismas para formar vesículas multilamelares (MLV) grandes, conocida como técnica de hidratación de película lipídica. Una vez que se forman estas partículas, el tamaño de la partícula es dependiente del método usado en las siguientes etapas del procedimiento, por ejemplo, energía sónica (sonicación) o energía mecánica (extrusión). La sonicación normalmente produce vesículas unilamelares pequeñas (SUV) y requiere sonificadores de punta de sonda y/o baño. Alternativamente, la extrusión de líquidos que fuerza una suspensión de lípidos a través de una serie de filtros de policarbonato (normalmente membranas de 0,8, 0,4, 0,2 y 0,1 μm) a alta presión (hasta 500 psi), produce partículas que tienen un diámetro próximo al tamaño de poro del filtro usado. Estos métodos están limitados a producciones de lotes pequeños, usados principalmente para fines de investigación. Además, las técnicas de extrusión a alta presión se asocian con altos costes y tiempo de funcionamiento. Por tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de un método de producción de liposomas útil para la fabricación a escala comercial que sea reproducible y que aborde cuestiones incluyendo calidad, control, estabilidad, escalabilidad y esterilización de la producción de liposomas.

Además, las formulaciones liposómicas conocidas en la técnica no son sustancialmente uniformes en tamaño y forma, lo que es una característica crítica de una composición farmacéutica para proporcionar un producto estéril y evitar efectos secundarios potencialmente tóxicos de liposomas grandes aberrantes. Actualmente, resulta difícil fabricar una formulación de liposomas que tenga un tamaño uniforme. El procedimiento de extrusión de vesículas multilamelares a través de una serie de filtros incluyendo, por ejemplo, filtros de policarbonato de 100 nm, no produce de manera sistemática una formulación que tenga una población de liposomas sustancialmente uniforme que tengan un tamaño de 100 nm. De hecho, dependiendo de las características físicas de los liposomas, tales como la compresibilidad y/o estabilidad, el diámetro medio de vesícula para las vesículas extruidas puede variar considerablemente dependiendo del tipo y del tamaño de los filtros usados. Por tanto, existe la necesidad de un método de fabricación que pueda producir liposomas sustancialmente uniformes en tamaño y forma.

Además, muchas características físicas de la formulación de liposomas afectan a la respuesta celular al liposoma y afectan a la eficacia del liposoma como composición farmacéutica. Las características físicas de la formulación de liposomas están influidas en muchos aspectos por el procedimiento de fabricación. Sin embargo, la técnica no aborda cómo pueden controlarse las propiedades liposómicas en el procedimiento de formulación para manipular la eficacia de fabricación y la estabilidad del liposoma. Por tanto, existe la necesidad de un procedimiento de fabricación a gran escala que sea rentable, que todavía pueda controlar las características de la formulación de liposomas para producir liposomas que sean sustancialmente uniformes y adecuados para el uso clínico.

Sumario de la invención

La presente invención describe liposomas novedosos que encapsulan agentes terapéuticos. La invención también se refiere a formulaciones liposómicas que tienen un alto grado de uniformidad de tamaño lo que da como resultado minimizar los efectos secundarios y aumentar la confianza en los procedimientos de esterilización. La invención también describe un procedimiento de fabricación eficaz y rentable, para la producción de liposomas en condiciones de extrusión a baja presión. Los liposomas formulados mediante este procedimiento tienen características deseables y propiedades terapéuticas eficaces.

La formulación de liposomas se caracteriza por liposomas que tienen composición y características físicas deseables. El liposoma comprende componentes lipídicos que encapsulan un agente terapéutico. Según un aspecto de la presente invención, los componentes lipídicos comprenden diastearoilfosfatidilcolina (DSPC), diastearoilfosfatidilglicerol (DSPG) y colesterol, preferiblemente en una razón molar de 3:1:2 (DSPC: DSPG: col).

El liposoma está compuesto por un componente lipídico y el agente terapéutico, que tienen una razón de la masa del agente terapéutico con respecto a la del componente lipídico, denominada la razón fármaco:lipido, aproximadamente de 1:5 a 1:8 en peso, preferiblemente de 1:6 a 1:7. Esta razón fármaco:lipido potencia la estabilidad y la eficacia, y también afecta a la liberación del fármaco y a la integridad del liposoma. Estas y otras características estructurales confieren beneficios inesperados a la presente formulación.

Los liposomas de la presente invención están en el intervalo de tamaño de 30-500 nm, preferiblemente, 70-120 nm, 100-300 nm, 100-180 nm y 70-150 nm, dependiendo del tipo de agente terapéutico y/o el portador usado. En una realización preferida, los liposomas pueden tener un tamaño de 80 ± 5 nm.

Otras características físicas de la composición del liposoma también contribuyen significativamente a su estabilidad y eficacia. Por ejemplo, la conductividad del liposoma, que puede afectar a la captación selectiva en células fagocíticas. En una realización, la conductividad es de entre 13,5-17,5 ms/cm. De manera similar, la osmolalidad externa e interna de la formulación afecta a la estabilidad y la eficacia. Preferiblemente, la osmolalidad externa se corresponde con la del cuerpo humano mientras que la osmolalidad interna es suficientemente baja como para potenciar la estabilidad de la formulación. En una realización de la invención, la osmolalidad interna es de entre 340-440 mOsm/kg. Otro parámetro favorable es el pH del liposoma y/o la formulación de liposomas. Por ejemplo, un pH interno de aproximadamente 6,9 para la formulación liposómica tiene un efecto beneficioso sobre la estabilidad a largo plazo así como sobre la tasa de fuga y la capacidad de encapsulación de fármacos.

Los liposomas de la invención son relativamente rígidos en comparación con los de en la técnica, ya que se caracterizan por tener membranas liposómicas que son menos compresibles. Los liposomas de la invención tienen una compresibilidad menor de 0,7 ml/g. Debido a su gran rigidez, los liposomas de la presente invención tienen estabilidad y vida útil de almacenamiento mejoradas.

La formulación de liposomas también tiene características novedosas y útiles. La formulación de liposomas de la presente invención se compone de liposomas que son sustancialmente uniformes en distribución de tamaño y forma, a la vez que son relativamente rígidos. La formulación tiene poca variación de tamaño de un liposoma a otro. La uniformidad de los liposomas, medida mediante el índice de polidispersidad ("PDI"), es menor de 0,075, preferiblemente está en el intervalo de aproximadamente 0,02-0,05, lo que significa una composición que tiene alta uniformidad. Por consiguiente, la formulación de liposomas de la presente invención reduce ventajosamente la incidencia de acontecimientos adversos asociados con los liposomas grandes y permite que se realice la filtración estéril de manera eficaz.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para fabricar una formulación liposómica. El método de fabricación incluye las etapas de (1) mezclar un agente terapéutico con lípidos preseleccionados para formar vesículas, (2) extruir las vesículas en una única fase a través de un filtro de tamaño único, y (3) someter a ultrafiltración. Tras la ultrafiltración, el producto puede normalizarse opcionalmente a la concentración final deseada. Puesto que la extrusión de la etapa 2 se realiza en una extrusión de una única fase a baja presión, el presente método ahorra costes y tiempo de funcionamiento y aumenta el rendimiento con respecto a las extrusiones a alta presión que utilizan múltiples fases. Estas etapas de fabricación pueden adaptarse para la producción a gran escala.

En una realización del procedimiento de fabricación, la formulación se prepara (1) mezclando un agente terapéutico con lípidos que comprenden DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2 para formar vesículas de manera que la razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a lípidos está en el intervalo de aproximadamente 1:5 a 1:8, (2) extruyendo las vesículas en una única fase a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 100 nm, y (3) sometiendo a ultrafiltración.

Aun otro aspecto de esta invención es una formulación de liposomas obtenida según las etapas de fabricación anteriores. La formulación comprende una pluralidad de liposomas, compuestos por una cantidad de componente lipídico que encapsula un agente terapéutico. Por ejemplo, comprendiendo dicho componente lipídico DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2, y la razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a componente lipídico puede estar en el intervalo de aproximadamente 1:5 a 1:8. La formulación se fabrica mediante las siguientes etapas: (1) mezclar un agente terapéutico con lípidos preseleccionados para formar vesículas, (2) extruir las vesículas en una única fase a través de un filtro de tamaño único, y (3) someter a ultrafiltración. Tras la ultrafiltración, el producto puede normalizarse opcionalmente a la concentración final deseada. De manera preferible, la formulación obtenida según este método tiene un PDI menor de 0,075, más preferiblemente en el intervalo de entre 0,02 y 0,05. Este procedimiento produce una formulación de liposomas que tiene características novedosas y útiles, incluyendo, por ejemplo, la razón de 3:1:2 del componente lipídico, razón fármaco:lipido, PDI, rigidez, pH, osmolalidad y conductividad.

Además, se dan a conocer los siguientes puntos:

1. Un liposoma que tiene un componente lipídico y que encapsula un agente terapéutico, que tiene una razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a lípidos de aproximadamente 1:5 a 1:8, en el que el

ES 2 685 581 T3

componente lipídico comprende DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2, y dicho liposoma tiene una compresibilidad menor de 0,70 ml/g.

- 5 2. El liposoma según el punto 1, en el que el liposoma está cargado negativamente.
3. El liposoma según el punto 1, en el que el liposoma tiene osmolalidad interna al liposoma en el intervalo de 340-440 osmol/kg.
- 10 4. El liposoma según el punto 1, en el que el liposoma tiene conductividad interna al liposoma en el intervalo de 13,5-17,5 ms/cm.
5. El liposoma según el punto 1, en el que el agente terapéutico es un bisfosfonato.
- 15 6. El liposoma según el punto 5, que tiene un intervalo de concentración de bisfosfonato de 0,5 a 5 mg/ml dentro del liposoma.
7. El liposoma según el punto 1, en el que el liposoma tiene un pH liposómico interno de aproximadamente 6,9.
- 20 8. Una formulación que comprende una pluralidad de liposomas, teniendo dichos liposomas un componente lipídico y un agente terapéutico, en la que el componente lipídico comprende DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2, y teniendo la formulación un PDI menor de 0,07.
- 25 9. La formulación según el punto 8, en la que los liposomas están cargados negativamente.
10. La formulación según el punto 8, en la que los liposomas tienen osmolalidad interna al liposoma en el intervalo de 340-440 osmol/kg.
- 30 11. La formulación según el punto 8, en la que los liposomas tienen conductividad interna al liposoma en el intervalo de 13,5-17,5 ms/cm.
12. La formulación según el punto 8, en la que los liposomas tienen un tamaño promedio de aproximadamente 80 ± 5 nm.
- 35 13. La formulación según el punto 8, en la que el agente terapéutico es un bisfosfonato.
14. La formulación según el punto 13, que tiene un intervalo de concentración de bisfosfonato de 0,5 a 5 mg/ml dentro del liposoma.
- 40 15. La formulación según el punto 8, en donde al menos el 96% del agente terapéutico dentro de dicha formulación está encapsulado.
16. La formulación según el punto 8, que tiene una razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a dicho componente lipídico de aproximadamente 1:5 a 1:8.
- 45 17. La formulación según el punto 8, que tiene un pH liposómico interno de aproximadamente 6,9.
18. La formulación según el punto 8, en la que los liposomas tienen una compresibilidad no mayor de 0,70 ml/g.
- 50 19. La formulación según el punto 8, en la que el PDI es de entre 0,02 y 0,05.
20. Un método de fabricación de una formulación terapéutica que tiene una pluralidad de liposomas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:
 - 55 (a) mezclar una disolución que contiene un agente terapéutico con una disolución que contiene lípidos que comprende DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2 para formar vesículas de manera que la razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a lípidos está en el intervalo de aproximadamente 1:5 a 1:8,
 - 60 (b) extruir las vesículas en una única fase a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 100 nm, y
 - (c) someter las vesículas a ultrafiltración.
- 65 21. El método según el punto 20, que comprende además la etapa de: (d) diluir la formulación con solución salina tamponada con fosfato para formar una concentración final de agente terapéutico de la formulación

terapéutica.

22. El método según el punto 20, en el que la formulación terapéutica tiene un pH de aproximadamente 6,9.
- 5 23. El método según el punto 20, en el que dicho disolvente lipídico comprende etanol, t-butanol y agua.
24. El método según el punto 23, en el que la razón en volumen de etanol, t-butanol y agua es de 77/77/6.
- 10 25. El método según el punto 20, en donde la extrusión de la etapa (b) se lleva a cabo entre 55° - 75°C.
26. El método según el punto 20, en donde la extrusión de la etapa (b) se realiza a una presión de entre 60-90 psi.
- 15 27. El método según el punto 20, en el que la extrusión de la etapa (b) se repite 10-18 veces antes de la ultrafiltración.
28. Una formulación que comprende una pluralidad de liposomas que se componen de una cantidad de componente lipídico y agente terapéutico, comprendiendo dicho componente lipídico DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2, y la razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a lípidos está en el intervalo de aproximadamente 1:5 a 1:8, fabricándose dicha formulación mediante las siguientes etapas:
- 20 (a) mezclar una disolución que contiene un agente terapéutico con una disolución que contiene lípidos que comprende DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2 para formar vesículas de manera que la razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a lípidos está en el intervalo de aproximadamente 1:5 a 1:8,
- 25 (b) extraer las vesículas en una única fase a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 100 nm, y
- 30 (c) someter las vesículas a ultrafiltración.
29. La formulación según el punto 28, formada además con la etapa de: (d) diluir la formulación con solución salina tamponada con fosfato para formar una concentración final de dicha formulación.
- 35 30. La formulación según el punto 28, en la que la formulación tiene un pH de aproximadamente 6,9.
31. La formulación según el punto 28, en la que dicho disolvente lipídico comprende etanol, t-butanol y agua.
- 40 32. La formulación según el punto 31, en la que la razón en volumen de etanol, t-butanol y agua es de 77/77/6.
33. La formulación según el punto 28, en donde la extrusión de la etapa (b) se lleva a cabo entre 55° - 75°C.
- 45 34. La formulación según el punto 28, en donde la extrusión de la etapa (b) se realiza a una presión de entre 60-90 psi.
35. La formulación según el punto 28, en donde la extrusión de la etapa (b) se repite 10-18 veces antes de la ultrafiltración.
- 50 36. La formulación según el punto 28, en donde la formulación tiene un PDI menor de 0,07.

Breve descripción de las figuras

- 55 La figura 1 es un diagrama de flujo del procedimiento de fabricación de la formulación liposómica de la presente invención.
- La figura 2 representa un diagrama de flujo que resume el procedimiento de fabricación de 1 litro de alendronato liposómico para infusión i.v. para una concentración de dosificación de 5 mg/ml, y sus parámetros de control del procedimiento según un aspecto de la invención.
- 60 La figura 3 es una imagen de TEM del alendronato liposómico según un aspecto de la invención.
- La figura 4 es un gráfico que compara la compresibilidad específica de diversas formulaciones de liposomas.
- 65 La figura 5A es un gráfico de la distribución de tamaño de la formulación de liposomas de la invención.

La figura 5B es un gráfico de la distribución de tamaño de una formulación de liposomas en la técnica.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a una formulación de liposomas novedosa y a un método de obtención de la misma para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades. La formulación comprende una pluralidad de liposomas que encapsulan un agente terapéutico, o un "agente encapsulado." Las características físicas de cada liposoma facilitan la estabilidad y la eficacia de la formulación liposómica. La formulación se caracteriza por liposomas que son sustancialmente uniformes en tamaño y forma. Además, la invención describe un procedimiento de fabricación eficaz y rentable para la formulación de liposomas, a la vez que cumple las necesidades de la producción a gran escala. Además, la invención se refiere a una formulación que tiene propiedades novedosas y útiles producida mediante dicho procedimiento de fabricación.

A. Componentes del liposoma

15 La presente invención se refiere a formas novedosas y útiles de un liposoma. Pueden usarse diferentes componentes de liposoma para formar el liposoma de la invención. Preferiblemente, el componente lipídico son lípidos biocompatibles no tóxicos, tales como, por ejemplo, lípidos preparados a partir de fosfatidil-colina, fosfoglicerol y/o colesterol. En una realización de la presente invención, el componente lipídico comprende diastearoilfosfatidilcolina (DSPC), diastearoilfosfatidilglicerol (DSPG) y colesterol, preferiblemente en una razón molar de aproximadamente 3:1:2 (DSPC: DSPG: col).

25 El componente lipídico encapsula un agente terapéutico, en el que ambos componentes tienen una masa preseleccionada. Tal como se usa en el presente documento, la "razón de fármaco con respecto a lípido" (o razón fármaco: lípido) se refiere a las cantidades relativas del fármaco con respecto al componente lipídico, en masa, que comprenden el liposoma y/o la formulación. En una realización de la invención, el liposoma tiene una razón fármaco: lípido de entre aproximadamente 1:5 y 1:8, preferiblemente, de entre 1:6 y 1:7 en peso.

B. Propiedades físicas de los liposomas

30 Diversas características y parámetros físicos de los liposomas pueden afectar a la uniformidad, la estabilidad y la eficacia de la formulación. Estas características físicas incluyen (1) osmolalidad (interna y externa al liposoma), (2) conductividad (interna y externa al liposoma), (3) razón de fármaco con respecto a lípido, (4) el pH (interno y externo al liposoma) y (5) el tipo de lípidos y fármacos usados en la composición.

35 La osmolalidad es la medida de la concentración de solutos de la formulación liposómica. Tal como se usa en el presente documento, el término "osmolalidad" se refiere a la medida de concentración de solutos definida por el número de moléculas soluto en osmoles (osmol) de soluto por kilogramo de disolvente (mOsm/kg). La osmolalidad interna es la concentración de solutos dentro del liposoma, siendo la osmolalidad externa la concentración de solutos fuera del liposoma. En una realización de la invención, el liposoma tiene una osmolalidad liposómica interna baja. La osmolalidad interna puede ajustarse variando la cantidad de fármaco que está encapsulado dentro del liposoma. La técnica describe liposomas que contienen la mayor cantidad de fármaco posible, lo que da como resultado liposomas con alta osmolalidad (alta razón de encapsulación). Sin embargo, la presente invención da a conocer liposomas que tienen una osmolalidad inferior (o baja razón de encapsulación) en comparación con los de la técnica. La osmolalidad inferior, es decir, de entre aproximadamente 340-440 mOsm/kg, tal como se da a conocer en el presente documento mejora la estabilidad de los liposomas y la uniformidad de los liposomas dentro de la formulación. Un modo de lograr una baja osmolalidad interna es disminuir la cantidad de agente terapéutico encapsulado en la formulación de liposomas. Otro modo de reducir la osmolalidad interna, que no requiere variar la razón fármaco: lípido, utiliza un agente no cargado, tal como determinados polisacáridos o azúcares conocidos en la técnica.

45 La osmolalidad externa es preferiblemente isotónica con respecto a la del cuerpo, especialmente para formulaciones inyectables, para que sean isotónicas con respecto a la del cuerpo. Como tal, la osmolalidad externa es de manera preferible relativamente constante. La osmolalidad interna y externa de la invención da como resultado un producto que tiene alta estabilidad, baja tasa de fuga de fármaco y capacidad de encapsulación de fármacos apropiada del liposoma.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "conductividad" se refiere a la capacidad del liposoma para conducir la electricidad basándose en el contenido iónico de la disolución. Conductividad se refiere al contenido iónico del liposoma y afecta a la estabilidad, la tasa de fuga de fármaco y la capacidad de encapsulación de fármacos de la formulación de liposomas. La conductividad del liposoma está en el intervalo de aproximadamente 13,5-17,5 ms/cm. En una realización de la invención, el agente farmacológico encapsulado está cargado. Se observa que un fármaco cargado tiene una correlación de uno a uno entre la conductividad y la osmolalidad del liposoma. Por tanto, la alteración de la cantidad de un agente cargado que va a encapsularse afecta proporcionalmente a ambas propiedades. En una realización alternativa, puede usarse un agente farmacológico neutro (no cargado). Cuando se usa un agente neutro tal como un polisacárido, por ejemplo, para ajustar la

conductividad, la osmolalidad depende de la concentración del fármaco y por tanto puede controlarse independientemente de la concentración del agente.

Otro aspecto novedoso de los liposomas de la presente invención es la rigidez relativa de la composición, es decir, la estabilidad del liposoma en diferentes condiciones corporales internas y del entorno, y su propensión a romperse. La rigidez del liposoma es una medida de la resistencia de la membrana del liposoma y de su capacidad a resistir el esfuerzo cortante y la presión, lo que puede mejorar la vida útil de almacenamiento de los liposomas. La rigidez de los liposomas está relacionada inversamente con su compresibilidad. Los liposomas que tienen baja compresibilidad tienen mayor rigidez. Un método a modo de ejemplo de determinación de la rigidez de los liposomas es a través de densitometría y velocimetría por ultrasonidos. Se conocen en la técnica métodos de determinación de la rigidez de los liposomas y se detallan en, por ejemplo, Cavalcanti, Leide P., *et al.*, "Compressibility study of quaternary phospholipid blend monolayers", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85(2011) 153-160; y Hianik, Tibor, *et al.*, "Specific volume and compressibility of bilayer lipid membranes with incorporated Na, K-ATPase", *General Physiology and Biophysics* 30(2011) 145-153, cuyos contenidos completos se incorporan en el presente documento mediante referencia.

El liposoma tiene un pH tanto para el disolvente externo al liposoma (el pH externo) como para la parte encapsulada interna del liposoma (el pH interno). El pH afecta a la estabilidad, la tasa de fuga de fármaco del liposoma y la capacidad de encapsulación de fármacos de la formulación de liposomas. Una realización de la formulación tiene un pH interno en el intervalo de aproximadamente 6,8-7,0. El pH interno de 6,8-7,0 es beneficioso para la estabilidad de la formulación. El pH del disolvente para el agente terapéutico puede mantenerse, entre otros medios, valorando de manera continua la disolución para que permanezca en el intervalo de pH de 6,8-7,0 o manteniéndolo a un pH particular tal como, por ejemplo, aproximadamente pH 6,9 cuando el agente terapéutico se disuelve usando un tampón conocido. El pH interno del liposoma puede ser diferente del pH externo del liposoma. Puede lograrse un pH diferente variando el pH de las disoluciones que constituyen los entornos interno y externo del liposoma.

C. La formulación

La formulación liposómica de la presente invención comprende una pluralidad de liposomas que tienen las características descritas anteriormente y que son sustancialmente uniformes en tamaño y forma, es decir, que tienen poca variación de tamaño de un liposoma a otro liposoma. La uniformidad de la formulación se mide mediante su índice de polidispersidad (PDI). El PDI se mide en una escala no lineal de 0 a 1, donde un valor de 0 es una preparación perfectamente uniforme, mientras que una composición que tiene un PDI de 1 tiene alta diversidad (no uniformidad). La formulación de la presente invención tiene un PDI menor de 0,075, preferiblemente en el intervalo de entre 0,02-0,05. Los valores de PDI pueden calcularse tal como se indica en el manual de usuario del dispositivo Zetasizer serie nano, 2003, Malvern Instruments, págs. 5,5-5,6 y Kazuba M., *Nano Series and HPPS Training Manual*, capítulo 1, 2003, Malvern Instruments, págs. 9, cuyos contenidos se incorporan como referencia. De hecho, el PDI de la presente formulación es próximo al de patrones de dimensionamiento donde el PDI es menor de 0,02. Las formulaciones conocidas previamente en la técnica tienen una uniformidad sustancialmente diferente que la de la presente invención, con un PDI normalmente de aproximadamente 0,3. Como el PDI está a una escala no lineal, el PDI de la presente invención es sustancialmente distinto del de las formulaciones en la técnica. De hecho, el bajo PDI de la presente invención evita ventajosamente los efectos tóxicos asociados con los liposomas grandes, y produce una formulación más adecuada para la esterilización con filtro.

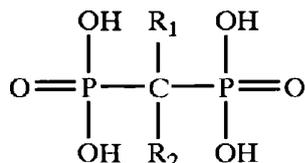
La formulación de la presente invención contiene liposomas de rigidez y uniformidad aumentadas, mejorando su estabilidad y vida útil de almacenamiento. Además, se contempla que las formulaciones de la presente invención son eficaces. Banai, Shmuel, *et al.*, "Targeted antiinflammatory systemic therapy for restenosis: The Biorest Liposomeal Alendronate with Stent sTudy (BLAST) - a double blind, randomized clinical trial", *Am Heart J.* (2013) 165(2): 234-40.

Liposomas de la presente formulación están dimensionados específicamente para su captación por macrófagos y monocitos. Los liposomas pueden estar en el intervalo de tamaño de 30-500 nm. Sin embargo, dependiendo del tipo de agente y/o el portador usado, los intervalos incluyen, pero no se limitan a, 70-120 nm, 100-500 nm, 100-300 nm, 100-180 nm y 80-120 nm. Sin embargo, estos intervalos son ejemplos y se reconocerán en la técnica otros tamaños particulares adecuados para su captación a través de fagocitosis sin apartarse del espíritu o el alcance de la invención. En una realización preferida, el tamaño del liposoma dentro de la formulación es de aproximadamente 80 ± 5 nm.

Puede encapsularse una variedad de agentes terapéuticos mediante los liposomas de la invención. Una vez que el liposoma se fagocita, el agente terapéutico es una sustancia que puede disminuir o inhibir la actividad de y/o eliminar la cantidad de células fagocíticas en un paciente. El agente terapéutico puede ser cualquier entidad química, incluyendo moléculas grandes o pequeñas, una mezcla de compuestos químicos, compuestos orgánicos o inorgánicos, macromoléculas biológicas tales como proteínas, hidratos de carbono, péptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos. Los agentes terapéuticos pueden ser productos naturales derivados de organismos conocidos o compuestos sintéticos.

Un tipo de agente terapéutico que es útil en esta invención son los bisfosfonatos. Los bisfosfonatos (denominados anteriormente difosfonatos) son compuestos caracterizados por dos uniones C-P. Si las dos uniones se ubican en el mismo átomo de carbono (P-C-P) se denominan bisfosfonatos germinales. Los bisfosfonatos son análogos del pirofosfato inorgánico endógeno que está implicado en la regulación de la formación y reabsorción óseas. Los bisfosfonatos pueden formar a veces cadenas poliméricas. Al ser altamente hidrófilos y estar cargados negativamente, los bisfosfonatos en su forma libre son casi completamente incapaces de atravesar las membranas celulares.

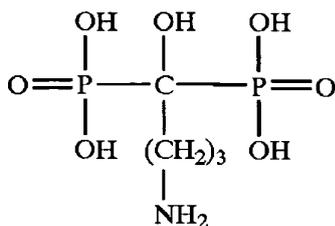
El término bisfosfonato tal como se usa en el presente documento, indica bisfosfonatos tanto germinales como no germinales. Un agente preferido, un bisfosfonato, tiene la siguiente fórmula (I):



(I)

en la que R₁ es H, OH o un átomo de halógeno; y R₂ es halógeno; alquilo C₁-C₁₀ o alqueno C₂-C₁₀ lineal o ramificado opcionalmente sustituido por heteroarilo o heterocicil-alquilamino C₁-C₁₀ o cicloalquilamino C₃-C₈ donde el amino puede ser primario, secundario o terciario; -NHY donde Y es hidrógeno, heteroarilo, arilo o cicloalquilo C₃-C₈; o R₂ es -SZ donde Z es fenilo o piridinilo sustituido con cloro.

Un ejemplo de un agente de bisfosfonato es alendronato, que tiene la siguiente fórmula (II):



(II)

Muchos bisfosfonatos tienen actividades similares a las del alendronato y son útiles como agentes terapéuticos para la invención. Tales bisfosfonatos pueden seleccionarse partiendo de la base de su capacidad para imitar la actividad biológica del alendronato. Esta incluye, por ejemplo: actividad *in vitro* en la inhibición de la actividad de células fagocíticas, por ejemplo, macrófagos y fibroblastos una vez dentro de tales células; inhibición de la secreción de IL-1 y/o IL-6 y/o TNF- α a partir de macrófagos; y actividad *in vivo*, por ejemplo, la capacidad de las formulaciones sometidas a prueba para reducir o inhabilitar monocitos de la sangre en un modelo animal o en seres humanos o para tratar el infarto de miocardio y reducir la zona de infarto.

Los bisfosfonatos aplicables en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, clodronato, tiludronato, ácido 3-(N,N-dimetilamino)-1-hidroxiopropano-1,1-difosfónico, por ejemplo dimetil-APD; ácido 1-hidroxi-etiliden-1,1-bisfosfónico, por ejemplo etidronato; ácido 1-hidroxi-3(metilpentilamino)-propiliden-bisfosfónico, (ácido ibandrónico), por ejemplo ibandronato; ácido 6-amino-1-hidroxihexano-1,1-difosfónico, por ejemplo amino-hexil-BP; ácido 3-(N-metil-N-pentilamino)-1-hidroxiopropano-1,1-difosfónico, por ejemplo metil-pentil-APD; ácido 1-hidroxi-2-(imidazol-1-il)etano-1,1-difosfónico, por ejemplo ácido zoledrónico; ácido 1-hidroxi-2-(3-piridil)etano-1,1-difosfónico (ácido resedrónico), por ejemplo risedronato; ácido 3-[N-(2-feniltoetil)-N-metilamino]-1-hidroxiopropano-1,1-bisfosfónico; ácido 1-hidroxi-3-(pirrolidin-1-il)propano-1,1-bisfosfónico, ácido 1-(N-fenilaminotiocarbonil)metano-1,1-difosfónico, por ejemplo FR 78844 (FujiSawa); éster tetraetilico del ácido 5-benzoil-3,4-dihidro-2H-pirazol-3,3-difosfónico, por ejemplo U81581 (Upjohn); y ácido 1-hidroxi-2-(imidazo[1,2-a]piridin-3-il)etano-1,1-difosfónico, por ejemplo, YM 529.

En determinadas realizaciones, tales como, por ejemplo, alendronato sódico encapsulado en DSPC, DSPG y colesterol, puede usarse una razón fármaco:lipido de 1:5,7 en masa (igual a aproximadamente una razón molar de 1:3 para alendronato sódico). Cuando se encapsula clodronato disódico, otro agente terapéutico, se encapsula en el mismo componente lipídico, puede usarse una razón en masa de aproximadamente 1:5,4 (que equivale a una razón molar de 1:3). En la presente invención pueden encapsularse otros agentes terapéuticos que inhiben o reducen las células fagocíticas eliminando, retrasando la proliferación y/o regulando por disminución la actividad de las células fagocíticas. Los agentes terapéuticos específicos incluyen cualquier agente que sea citotóxico o citoestático, incluyendo pero sin limitarse a, por ejemplo, galio, oro, sílice, 5-fluorouracilo, cisplatino, agentes alquilantes, mitramicina y paclitaxol. En cualquiera de los agentes terapéuticos anteriores, la razón fármaco:lipido del liposoma

es de entre aproximadamente 1:5 y 1:8, preferiblemente de entre 1:6 y 1:7 en peso.

En una realización, la formulación contiene el agente terapéutico encapsulado que puede entrar en una célula a través de fagocitosis y seleccionar como diana selectivamente a macrófagos y monocitos sin afectar a otras células no fagocíticas. Puesto que los macrófagos y los monocitos, en su estado normal, se reclutan hasta una zona dañada celularmente y promueven la inflamación más allá de la producida por la enfermedad o el estado solo, la inhibición y/o reducción de monocitos/macrófagos puede atenuar la zona dañada subyacente. Una vez dentro de las células fagocíticas, el agente se libera e inhibe, inactiva, deshabilita, elimina y/o reduce los monocitos y/o macrófagos para el tratamiento de diversos estados que implican una respuesta inmunitaria fagocítica, tal como, por ejemplo, lesión por reperfusión isquémica o lesión inflamatoria, tal como, por ejemplo, infarto de miocardio, reducción en la zona final de infarto y mejora de la reparación y el desenlace cardiacos tras infarto de miocardio agudo. Los liposomas de la formulación tienen características específicas, que incluyen tamaño, carga, pH, conductividad y osmolalidad que permiten la captación principalmente a través de fagocitosis.

Tras captarse por los monocitos/macrófagos, el agente tiene una actividad inhibitoria sostenida sobre los monocitos/macrófagos. Esta actividad sostenida es suficiente para modular la acción inflamatoria de los monocitos/macrófagos. Por tanto, no se requiere la liberación prolongada del agente con el fin de mantener la inhibición. Por consiguiente, el método de tratamiento de determinadas enfermedades inhibiendo monocitos/macrófagos, tal como, por ejemplo, mediante el uso de un agente encapsulado, es preferiblemente una terapia sistémica, porque la formulación selecciona como objetivo los monocitos y macrófagos circulantes. Dependiendo del tipo de agente terapéutico encapsulado, las células fagocíticas pueden responder de diferente manera. Por ejemplo, liposomas con alendronato encapsulado producen apoptosis, mientras que liposomas con clodronato encapsulado producen necrosis. Las células no fagocíticas son relativamente incapaces de captar la formulación debido a las propiedades fisicoquímicas particulares de la formulación liposómica.

Además, los liposomas de la presente invención no sólo retienen el agente terapéutico durante un tiempo suficiente de modo que el agente no se libere a los fluidos corporales, sino que también descargan eficazmente el agente dentro de la célula diana. Los liposomas de la presente invención administran una cantidad eficaz del agente a las células seleccionadas como diana. El término "cantidad eficaz" indica una cantidad de la formulación que es eficaz para lograr el resultado terapéutico deseado, por ejemplo, tratamiento de endometriosis, restenosis, lesión por reperfusión isquémica (IRI), infarto de miocardio u otros estados relacionados. Por ejemplo, la disminución en el número y/o la actividad de los macrófagos y monocitos activados reduce la zona de infarto y/o mejora la remodelación cuando la lesión se refiere a daño miocárdico. La cantidad eficaz también puede depender de varios factores incluyendo, pero sin limitarse a: peso y sexo del individuo tratado; el modo de administración de la formulación (concretamente si se administra de manera sistémica o directamente al sitio); el régimen terapéutico (por ejemplo, si la formulación se administra una vez al día, varias veces al día, una vez cada pocos días, o en una única dosis); indicadores clínicos de inflamación; factores clínicos que influyen en la velocidad de desarrollo del estado subyacente que va a tratarse, tabaquismo, hipercolesterolemia, estados proinflamatorios, enfermedades renales; y de la forma de dosificación de la composición. El suministro y la administración satisfactorios de la formulación liposómica dependen de su estabilidad y eficacia. El número de moléculas de agente terapéutico encapsuladas en cada liposoma (carga útil), el tamaño de vesícula y el nivel de material no encapsulado libre son los parámetros importantes que determinan el índice terapéutico del producto.

D. Dosificación y administración

Las formulaciones liposómicas pueden administrarse mediante cualquier vía que transporte eficazmente los liposomas al sitio de acción apropiado o deseable. Los modos de administración preferidos incluyen intravenoso (i.v.) e intraarterial (i.a.) (particularmente adecuado para administración mediante vía). Otros modos adecuados de administración incluyen intramuscular (i.m.), subcutánea (s.c.) e intraperitoneal (i.p.). Una administración de este tipo puede ser infusiones o inyecciones en bolo. Otro modo de administración puede ser mediante administración perivascular. La formulación puede administrarse directamente o tras dilución. También pueden usarse combinaciones de cualquiera de las vías de administración anteriores según la invención. Puede utilizarse cualquier vía de administración siempre que las partículas estén en contacto con células fagocíticas (por ejemplo, monocitos circulantes o macrófagos peritoneales).

Las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención pueden formularse usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares conocidos en la técnica, que facilitan el procesamiento de los principios activos para dar preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente.

La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos de la formulación suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración eficaz mínima, "MEC"). La MEC variará para cada preparación, pero puede determinarse a partir de datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para lograr la MEC dependerán de características individuales y de la vía de administración. Pueden usarse ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

Dependiendo de la gravedad y de la capacidad de respuesta del estado que va a tratarse, la dosificación puede ser con una única o con una pluralidad de administraciones, durando el curso de tratamiento desde varias horas hasta varias semanas o hasta que se realiza el tratamiento. La frecuencia de administración puede variar dependiendo del estado y de la gravedad. En una realización, la formulación puede administrarse periódicamente. La dosificación puede formularse en cualquier cantidad o volumen según se requiera para el tratamiento deseado. Por ejemplo, puede administrarse una dosis de o bien 1 μg o bien 10 μg a pacientes que se someten a un procedimiento intravascular, por ejemplo, implantación de endoprótesis, con el fin de prevenir la incidencia y la gravedad de pérdida posterior de endoprótesis. Como ejemplo adicional, la dosificación puede ser de al menos 100 μg . A este respecto, la formulación puede administrarse como una dosis única, múltiples dosis y/o de manera continua, por ejemplo, mediante infusión/infusiones continua(s) a lo largo de un periodo de tiempo. Por ejemplo, las dosificaciones pueden administrarse según lo descrito en Banai, Am Heart J. (2013), citado anteriormente.

E. Procedimiento de fabricación de liposomas

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención del liposoma y la formulación liposómica para la fabricación comercial del producto. Este método de fabricación permite la manipulación de las características físicas descritas anteriormente, así como el control de determinados parámetros del procedimiento, incluyendo la razón de agua con respecto a disolvente, la composición del disolvente y las razones de disolvente, la temperatura de preparación de las vesículas, la velocidad de corte de la preparación de vesículas, la temperatura de extrusión, la presión de extrusión y el tamaño de la membrana de extrusión y el tipo de membrana.

La preparación de la formulación de liposomas incluye las etapas de (1) mezclar un agente terapéutico y lípidos preseleccionados para formar vesículas, (2) extruir las vesículas en una única fase a través de un filtro de tamaño único, y (3) someter a ultrafiltración. Las extrusiones mediante filtro de una única fase tal como se usa esta expresión significa que la etapa de extrusión usa una etapa de filtración de un único tamaño de poro. Puede incluir múltiples pases a través del filtro de tamaño único pero evita la necesidad de pases múltiples y/o secuenciales a través de filtros de diferente tamaño tal como se conoce en la técnica anterior, por ejemplo, pases a través de membranas de 1,0, 0,8, 0,6, 0,4 y 0,2 μm secuencialmente. Tras la ultrafiltración, el producto puede normalizarse a la concentración final deseada. Puesto que la extrusión de la etapa (2) se realiza como una extrusión de una única fase a baja presión, el presente método ahorra costes y tiempo de funcionamiento y aumenta el rendimiento a lo largo de extrusiones de alta presión utilizando múltiples fases. La figura 1 ilustra las etapas del procedimiento de fabricación.

La primera etapa comprende mezclar un agente terapéutico y componentes lipídicos preseleccionados en una disolución para formar vesículas. En muchos casos, el agente terapéutico y el componente lipídico se solubilizarán en una disolución de agente terapéutico y disolución de componente lipídico antes de mezclar los dos. En esta realización, la disolución de agente terapéutico tendrá determinadas características físicas, incluyendo un pH, osmolalidad y conductividad. La disolución de agente terapéutico comprende el entorno interno de la formulación de liposomas. Como tal, el pH, la conductividad, la osmolalidad de la disolución de agente terapéutico influyen en el pH interno, la conductividad, la osmolalidad de la formulación liposómica. La osmolalidad liposómica interna está preferiblemente en el intervalo de entre 340-440 mOsm/kg mientras que la osmolalidad liposómica externa es de entre 270-340 mOsm/kg. Se pretende que el pH de la disolución mantenga la disolución de agente terapéutico en el intervalo de pH deseado. Por tanto, si se usa un agente terapéutico ácido, por ejemplo, un bisfosfonato, puede usarse una disolución de pH básico para mantener el pH de la disolución entre 6,8 y 7,0. Por ejemplo, puede prepararse una disolución de agente terapéutico a partir de alendronato sódico disuelto en una disolución de NaOH, siendo el pH resultante de la disolución de alendronato de aproximadamente 6,8 y la conductividad de aproximadamente 18,0 ms/cm. La disolución puede calentarse opcionalmente durante el procedimiento. En una realización alternativa, puede usarse clodronato sódico o alendronato monohidratado. La disolución puede calentarse hasta una temperatura que facilite la solubilización del bisfosfonato en el disolvente básico, que oscila entre 55° y 75°C, tal como, por ejemplo, 70°C. Dependiendo de la cantidad de agente terapéutico y de otros excipientes disueltos, la disolución puede tener una osmolalidad (que se convierte en la osmolalidad interna) en el intervalo de 340-400 mOsm/kg. También dependiendo de la cantidad de agentes terapéuticos y excipientes, la disolución puede tener una conductividad (que se convierte en la conductividad interna) en el intervalo de 14,0-21,0 ms/cm. El pH, la osmolalidad, la conductividad internos son factores en la estabilidad y la eficacia de la formulación liposómica. En una realización, la concentración de la disolución de agente terapéutico puede estar en el intervalo de 20-120 g/l durante la etapa (1) del procedimiento de fabricación. La disolución de agente terapéutico puede prepararse aparte de y/o antes del procedimiento de fabricación comentado en el presente documento.

Los componentes lipídicos pueden estar en forma de una disolución que contiene la cantidad de partida deseada del componente lipídico en un volumen de uno o más disolventes lipídicos. Puede usarse cualquier componente lipídico y disolvente lipídico adecuados. Por ejemplo, los componentes lipídicos pueden comprender DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de 3:1:2, respectivamente, antes de la formación del liposoma. El liposoma resultante formado según esta combinación de lípidos también puede tener una razón molar de 3:1:2 de DSPC, DSPG y colesterol. Además, el disolvente lipídico puede comprender, por ejemplo, t-butanol, etanol y agua en una razón de 77/77/6 v/v/v, respectivamente. Otros disolventes lipídicos que pueden usarse para formular los liposomas de la invención incluyen cloroformo o metanol. Los componentes lipídicos se disuelven en el disolvente lipídico. El

disolvente lipídico puede calentarse hasta una temperatura que facilita la solubilización de los componentes lipídicos, que oscila entre 55° y 75°C, tal como, por ejemplo 70°C para generar la disolución lipídica. La concentración de la disolución lipídica disuelta puede estar en el intervalo de 50-350 g/l. La disolución lipídica puede prepararse a parte de y/o antes del procedimiento de fabricación comentado en el presente documento.

5 El mezclado de la disolución de agente terapéutico y la disolución lipídica forma vesículas multilamelares (MLV). La razón fármaco:lípido puede controlarse variando la cantidad de disolución lipídica o disolución de agente terapéutico. Puede usarse opcionalmente calentamiento suave de las dos disoluciones para ayudar en el mezclado de las disoluciones entre sí. Este procedimiento da como resultado la encapsulación eficaz del agente terapéutico en vesículas multilamelares. En un ejemplo, la disolución lipídica puede añadirse a una disolución de agente terapéutico en 5,3 partes de lípido con respecto a 1 parte de agente terapéutico. Esta razón de lípido con respecto a fármaco (en peso) aumenta la estabilidad de la formulación de liposomas sin poner en peligro significativo la administración. De hecho, este procedimiento permite variar la razón fármaco:lípido en el intervalo de 1:4 a 1:8 en peso, preferiblemente en el intervalo de 1:5 a 1:6. Además, puede ajustarse la concentración de disolvente antes de la etapa de extrusión sin poner en peligro la integridad del liposoma.

La siguiente etapa en el método de fabricación de la formulación comprende extruir las vesículas en una única fase a través de un filtro de tamaño único. La extrusión de las vesículas reduce el tamaño de las vesículas multilamelares descritas anteriormente. El método usa una extrusión de una única fase y baja presión, lo que produce liposomas que son altamente uniformes en tamaño y forma. El procedimiento de extrusión puede implicar el uso de un microfluidizador u otro homogeneizador convencional. Los homogeneizadores se basan en la energía de corte para fragmentar liposomas grandes dando otros más pequeños. Los homogeneizadores adecuados para su uso en el presente documento incluyen microfluidizadores producidos por una variedad de fabricantes, por ejemplo, Microfluidics en Boston, MA. La distribución de tamaño de partícula puede monitorizarse mediante discriminación de tamaño de partícula por haz de láser convencional. La extrusión de liposomas a través de una membrana de policarbonato o una membrana de cerámica asimétrica es un método eficaz para reducir los tamaños de liposoma hasta una distribución de tamaño relativamente bien definida. La temperatura de extrusión está preferiblemente por encima de la temperatura de fase transitoria del liposoma para permitir la reducción de tamaño. Por ejemplo, en el caso de DSPG, DSPC y colesterol, pueden ser deseables aproximadamente 55°C. Pueden usarse otros lípidos y su temperatura de fase transitoria es una medida de la temperatura deseada para la etapa de extrusión. Pueden requerirse múltiples pases para lograr el tamaño de vesícula y la homogeneidad deseados. Pueden analizarse muestras en tiempo real para evaluar el tamaño de vesícula así como el recuento bacteriano durante esta etapa.

La etapa de extrusión se realiza en un procedimiento de baja presión de una fase de la técnica de extrusión. En el procedimiento de extrusión, se procesan las MLV en una fase extruyendo directamente a través de una membrana mientras se aplica baja presión (en lugar de crear pequeños liposomas unilamelares mediante extrusiones de múltiples fases donde se hacen pasar liposomas más grandes a través de membranas sucesivamente más pequeñas mediante prensas extrusoras a alta presión (tal como se ponía en práctica en los métodos de la técnica anterior). En una realización, el procedimiento de extrusión de una única fase se lleva a cabo directamente con una membrana de cerámica o policarbonato de 0,1 µm de tamaño de poro mientras se aplica baja presión de 60-90 psi para obtener liposomas de 100 nm de tamaño. Además, el procedimiento usa una baja presión de 60-90 psi, en contraposición con una presión más alta (de hasta 500 psi) de las extrusiones a alta presión.

Eliminando las membranas múltiples y extruyendo a baja presión, el procedimiento de la invención tiene varias ventajas. En primer lugar, el procedimiento de extrusión de una fase tiene la ventaja de realizar el procedimiento de extrusión en menos tiempo que los procedimientos de extrusión de múltiples fases. Además, la eliminación de la necesidad de extrusiones a alta presión ahorra ventajosamente el alto coste asociado con el equipo de extrusión a alta presión. Las prensas extrusoras a baja presión son significativamente menos costosas. Un ejemplo de una prensa extrusora adecuada para la presente invención es la prensa extrusora LIPEX™, disponible de Northern Lipids, Inc. Además, los materiales usados para las prensas extrusoras a baja presión, por ejemplo, aire comprimido, generalmente cuestan menos que los de para las prensas extrusoras a alta presión, por ejemplo, nitrógeno. Además, la reducción de las extrusiones de múltiples fases a una extrusión de fase única se corresponde con una reducción similar en desechos y rendimientos superiores.

La última etapa del presente método comprende la ultrafiltración de las vesículas extruidas para dar una disolución tamponada. Aunque el procedimiento de extrusión produce liposomas que son uniformes en tamaño y forma, la ultrafiltración implica aplicar presión a la formulación a través de una membrana con el fin de separar los liposomas encapsulados de los lípidos, disolventes y agentes terapéuticos no encapsulados. Esta etapa se lleva a cabo preferiblemente por debajo de la temperatura de fase transitoria de los lípidos usados en la formulación, por ejemplo por debajo de 45°C en la mayoría de los casos. Pueden usarse diferentes tipos de membranas de filtración durante el procedimiento de ultrafiltración. Una realización de la etapa de ultrafiltración usa una membrana de fibras huecas, donde se empuja la formulación a través de las almas huecas abiertas de la fibra y se filtran las micromoléculas (es decir, disolvente, bisfosfonatos no encapsulados, lípidos) a través de la membrana exterior de la fibra mientras que los liposomas relativamente grandes permanecen dentro de la fibra. La ultrafiltración da como resultado una formulación que tiene más de o igual al 96% de agente terapéutico encapsulado.

La etapa de ultrafiltración puede incluir además una etapa de dialización en la que se dializa la formulación frente a un volumen de disolución tamponada. Un ejemplo de una disolución tamponada es una solución salina tamponada con fosfato (PBS), pero puede usarse cualquier tampón que contenga un equilibrio de iones positivos y negativos mantenidos a una osmolalidad fisiológica. Se conocen en la técnica otros aditivos de tampón y pueden incluir, por ejemplo, sacarosa, glicina, succinato de sodio y/o albúmina. La disolución tamponada refleja preferiblemente el entorno externo de la formulación final, de modo que pueden monitorizarse cuidadosamente el pH y la conductividad de esta disolución. Preferiblemente, la disolución tamponada es isotónica y no tóxica para las células. La disolución tamponada puede filtrarse para reducir adicionalmente los contaminantes y puede prepararse antes del procedimiento de fabricación. El punto final de la diálisis está marcado al alcanzarse el pH y la conductividad de la formulación deseados.

Al final de la etapa de ultrafiltración, la formulación puede filtrarse opcionalmente para obtener la esterilización, es decir, para mantener un control de la carga biológica. En una realización del procedimiento, se conecta un filtro de esterilización a un recipiente a presión que contiene la formulación de liposomas. El filtro de esterilización se conecta adicionalmente a un tanque de recepción estéril. La aplicación de presión a la formulación liposómica fuerza a la formulación a través del filtro de esterilización. Además, puede tomarse otra muestra para determinar el contenido bacteriano durante esta etapa. El tamaño de poro del filtro de esterilización puede estar en el intervalo de 0,2 a 0,45 μm . Puesto que los liposomas de la formulación son sustancialmente uniformes y están ausentes los liposomas grandes, la filtración para obtener esterilización puede realizarse de manera relativamente libre de complicaciones.

Tras la fabricación, puede normalizarse la formulación. La normalización final produce un lote de formulación de liposomas que tiene una concentración convencional. La normalización analiza el rendimiento, el tamaño, la composición lipídica y el contenido en fármaco libre y la concentración del producto. El análisis de la concentración puede realizarse mediante un método conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, HPLC, ensayo de fosfato a través de espectrofotómetro. Tras confirmar la concentración del producto sometido a ultrafiltración, se usa un volumen de la disolución tamponada para diluir la formulación hasta una concentración convencional. La normalización final también implica filtración estéril del producto liposómico. Por ejemplo, puede diluirse una formulación de bisfosfonato encapsulada tras la ultrafiltración con la cantidad apropiada de la disolución tamponada para llegar a una concentración final. De manera similar, el producto sometido a ultrafiltración puede separarse en múltiples lotes que van a usarse en diferentes concentraciones finales mediante el uso de cantidades diferentes de diluyente de disolución tamponada en los diferentes lotes. Puede tomarse una muestra para determinar la concentración lograda del agente terapéutico.

Este procedimiento de fabricación tiene la ventaja de que pueden controlarse, monitorizarse y reproducirse las características fisiológicas y químicas del liposoma. Por ejemplo, el pH interno del liposoma puede controlarse mediante la composición de la disolución en la que se disuelve el agente terapéutico. La osmolalidad interna también puede manipularse de manera similar variando la cantidad de agente terapéutico o, por ejemplo, dependiendo de si es un agente cargado o no cargado. La razón fármaco:lipido puede controlarse mediante la selección de los componentes lipídicos que comprende el liposoma o la cantidad de lípidos añadidos al principio activo disuelto. El aumento de la cantidad de componente lipídico disminuye la razón fármaco:lipido, y viceversa. Una razón fármaco:lipido baja también reduce la osmolalidad interna de la formulación de liposomas. El pH externo y la osmolalidad externa de la composición están influidos en parte por la composición de la disolución tamponada que contiene el producto final. La conductividad puede controlarse por la naturaleza del agente terapéutico y otros excipientes encapsulados dentro del liposoma. Otros factores, incluyendo pero sin limitarse a la viscosidad, calidad del excipiente, esterilidad, compatibilidad con solución salina, kits y jeringas de infusión (para preparaciones inyectables), y compatibilidad con equipo de procesamiento, también pueden controlarse independientemente mediante el procedimiento de la invención.

Según la descripción anterior, en una realización preferida del procedimiento de fabricación, la formulación se prepara (1) mezclando una disolución que contiene un agente terapéutico con una disolución que contiene lípidos que comprende DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2 para formar vesículas de manera que la razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a lípidos está en el intervalo de aproximadamente 1:5 a 1:8, (2) extruyendo las vesículas en una única fase a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 100 nm, y (3) sometiendo a ultrafiltración.

Otro aspecto de esta invención es una formulación de liposomas obtenida según las etapas de fabricación anteriores en la que la formulación comprende DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2, y la razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a lípidos está en el intervalo de aproximadamente 1:5 a 1:8 y se fabrica mediante las siguientes etapas: (1) mezclar una disolución que contiene un agente terapéutico con una disolución que contiene componentes lipídicos para formar vesículas, (2) extruir las vesículas en una única fase a través de un filtro de tamaño único, y (3) someter a ultrafiltración. Tras la ultrafiltración, el producto puede normalizarse a la concentración final deseada. La formulación obtenida según este método tiene un PDI menor de 0,075, preferiblemente en el intervalo de entre 0,02 y 0,05. Este procedimiento produce una formulación de liposomas que tiene características novedosas y útiles tal como se describió anteriormente, incluyendo, por ejemplo, la razón de 3:1:2 del componente lipídico, una razón fármaco:lipido de entre 1:5 a 1:8. Además, pueden controlarse independientemente las características liposómicas individuales, incluyendo, pH, osmolalidad, conductividad y

rigidez, tal como se explicó resumidamente antes.

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren y ejemplifiquen los diversos aspectos de llevar a cabo la presente invención y no se pretende que limiten la invención en modo alguno. La invención se describe en el presente documento, a modo de ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para fines de descripción ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención únicamente, y se presentan para proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y más fácilmente entendida de los principios y aspectos conceptuales de la invención. La descripción debe considerarse con los dibujos que hacen evidente para los expertos en la técnica como pueden realizarse en la práctica las diversas formas de la invención.

Ejemplo 1 – Preparación de lotes de formulación de liposomas

Según el procedimiento descrito anteriormente, se preparó un lote de ejemplo. Claramente puede variarse el tamaño del lote, según se desee para la producción comercial. En este ejemplo, se produjo un lote de un litro de alendronato liposómico encapsulado en liposomas que contenían colesterol, DSPC y DSPG, y disperso en solución salina tamponada con fosfato. El alendronato liposómico puede proporcionarse en dos concentraciones, por conveniencia clínica: 5 mg/ml y 0,5 mg/ml, como una dispersión liposómica blanquecina estéril. Estas concentraciones pueden formularse adicionalmente para obtener una cantidad deseada de agente terapéutico en cualquier volumen específico. Los componentes lipídicos se componían de colesterol, DSPC y DSPG. La dispersión también contenía una solución salina tamponada con fosfato para el control del pH, la idoneidad de la infusión y para el mantenimiento de la isotonicidad. Al menos se encapsuló el 96% del fármaco en el producto final en los liposomas. Para su administración, se diluyó el contenido del vial (o parte del mismo, según sea necesario) con solución salina y luego se administró como una infusión.

En la tabla 1 a continuación se presenta una fórmula de lote que incluye la cantidad y la calidad de los componentes usados en el procedimiento de fabricación y sus cantidades en un lote de un litro.

Tabla 1 - Alendronato liposómico para infusión i.v., fórmula de lote para 1 litro

Componente	Cantidad	Calidad
Alendronato Sodio trihidratado	68-80,7 g	100,5%
NaOH	6,8-8,0 g	Extra pura
Colesterol	10 ± 0,2 g	≥99%
DSPC	30 ± 0,4 g	≥99%
DSPG	10 ± 0,2 g	≥99%
Etanol	77 ± 1,1 ml	Absoluta, extra pura
t-butanol	77 ± 1,1 ml	Para análisis
Agua para inyección	850 ± 13 ml	USP
	6±0,1 ml	
PBS, pH 7	~6000 ml	
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	13,86 g ± 1,5%	Extra pura
NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	6,54 g ± 1,5%	Extra pura
NaCl	50,82 g ± 1,5%	Extra pura
Agua para inyección	60000 ml	USP

En la tabla 2 a continuación se resumen los contenidos y la composición cuantitativa de alendronato liposómico para infusión i.v. producido en el lote de 1 litro de la tabla 1. Se observa que en este lote, la razón molar de DSPC:DSPG:colesterol fue de 3:1:2. Además, se calculó que la razón fármaco:lípido era de aproximadamente 1:5,761,5 p.p.

Tabla 2 - Composición de alendronato liposómico para infusión i.v.

Componente		Composición	
		0,5 mg/ml	5 mg/ml
Principio activo	Alendronato sódico trihidratado	0,5 ± 0,05 mg/ml = 0,0015 mmol/ml	5,0 ± 0,2 mg/ml = 0,015 mmol/ml
Lípidos liposómicos	Colesterol	0,6 ± 0,1 mg/ml = 0,0015 mmol/ml	5,2 ± 0,8 mg/ml = 0,013 mmol/ml
	DSPC (1,2-Distearoil-sn-glicero-3- fosfocolina)	1,7 ± 0,3 mg/ml = 0,0022 mmol/ml	15,65 ± 2,35 mg/ml = 0,020 mmol/ml
	DSPG	0,6 ± 0,1 mg/ml =	5,2 ± 0,8 mg/ml =

	(1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosforac-glicerol)	0,0007 mmol/ml	0,006 mmol/ml
Disolución tampón (pH 7)	NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	1,09 mg/ml	1,09 mg/ml
	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	2,31 mg/ml	2,31 mg/ml
	NaCl	8,47 mg/ml	8,47 mg/ml
	Agua para inyección (WFI)	~ 1 ml	~ 1 ml

En la tabla 3 a continuación se presenta una formulación de alendronato liposómico para infusión i.v. producida realmente mediante el procedimiento de fabricación novedoso descrito en el presente documento.

5

Tabla 3 - Especificaciones para la forma de dosificación de 5 mg/ml

Pruebas	Especificación
Aspecto	Dispersión blanquecina
Identificación	Conforme
Ensayo de alendronato (HPLC)	5,0 ± 0,2 mg/ml
Encapsulación de alendronato	≥ 96%
Ensayo de DSPC (HPLC)	13,3-18,0 mg/ml
Ensayo de DSPG (HPLC)	4,4-6,0 mg/ml
Ensayo de colesterol (HPLC)	4,4-6,0 mg/ml
Razón fármaco:lípido (p:p) incluyendo colesterol	1: 5,3 ± 1,0
Tamaño de vesícula	Diámetro medio de partícula 80 ± 5 nM
pH	6,7 - 7,3
Etanol	<0,5%
t-Butanol	<0,5%
Osmolalidad	270-340 mOsm/kg
Esterilidad	Estéril
Pirógenos	Pasa

La figura 2 representa un diagrama de flujo que resume el procedimiento de fabricación de 1 litro de alendronato liposómico para infusión i.v. para una concentración de dosificación de 5 mg/ml, y sus parámetros de control del procedimiento. El procedimiento de fabricación para la concentración de dosificación de 0,5 mg/ml es igual que para la concentración de dosificación de 5 mg/ml. Sólo la etapa de normalización final difiere en la formación de una concentración de formulación final diferente para su administración. El experto en la técnica entiende que pueden fabricarse otras dosificaciones de conformidad con este procedimiento sin experimentación indebida.

15 La disolución de agente terapéutico (disolución de alendronato) y la disolución lipídica se prepararon tal como sigue:

Disolución de alendronato. Se pesó NaOH (6,8-8,0 g) y se disolvió en 850 ml de agua para inyección (WFI), con una temperatura a 70 ± 3°C, 600 ± 150 RPM. Se verificó la disolución completa mediante inspección visual. Se disolvió alendronato sódico (de 68 a 80,75 g) en la disolución de NaOH, con una temperatura a 70 ± 3°C, agitando a 600 ± 150 RPM. Se verificó la disolución completa mediante inspección visual (es decir, disolución transparente), se verificaron la conductividad y las mediciones de pH (pH = 6,8 ± 0,3. Conductividad=18,0 ± 1 ms/cm).

25 Disolución lipídica. Se pesaron lípidos que comprendían 30 g de DSPC (37,9 mmoles), 10 g de DSPG (12,5 mmoles) y 10 g de colesterol (25,8 mmoles) (DSPC/DSPG/colesterol; 3/1/2 mol/mol/mol) y se disolvieron en un vaso de precipitados de 250 ml con un agitador magnético calentado en 160 ml de t-butanol/EtOH/H₂O (77/77/6, v/v/v) a una temperatura de 70 ± 3°C, formando una disolución lipídica con una concentración de 312 mg/ml. Se formó una disolución amarilla transparente una vez que la temperatura estuvo dentro de los límites.

30 Formulación de MLV. Se añadió la disolución lipídica a la disolución de alendronato (1 parte de fármaco; 5,3 partes de lípido) mientras se mezclaba a 600 ± 150 RPM y a una temperatura de mantenimiento de 70 ± 3°C. Tras al menos 5 minutos, se añadieron 100 ml de WFI (10% del volumen total) para reducir la concentración del disolvente antes de la extrusión. Se mezcló la formulación durante 10 minutos adicionales.

35 Extrusión. Se sometió la formulación a extrusión mediante una prensa extrusora de acero inoxidable calentada de 1,2 l con una membrana de cerámica de 0,14 µm o con dos membranas de policarbonato (por ejemplo, un prefiltro de 0,2 y una membrana de 0,1 µm) para reducir el tamaño de las vesículas y mejorar la homogeneidad de las vesículas a una presión = 90 ± 15 psi y una temperatura = 68 ± 5°C. El procedimiento requirió 12-18 pases para lograr vesículas de 80-100 nm. Se tomaron como muestras pases de extrusión en tiempo real para verificar el tamaño de las vesículas antes de la ultrafiltración. Se analizó el tamaño de la formulación de liposomas usando un analizador Nano ZS de Malvern (límites de aceptación: 95 ± 20 nm). También se analizó una muestra de extrusión para el recuento de bacterias aerobias (control de la carga biológica). El límite de aceptación fue <100 UFC/ml.

40

Ultrafiltración y diafiltración. En primer lugar, se dejó enfriar la formulación hasta <45°C antes de someterla a ultrafiltración. Se realizó la ultrafiltración en un sistema QuixStand de Amersham con una membrana de fibras huecas de 500 K. Se concentró la formulación usando una presión de entrada que no superaba los 25 psi. Tras alcanzar un volumen mínimo, se dializó la formulación con 10 volúmenes iniciales (~7 l) de una solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se preparó la disolución de PBS disolviendo NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 13 mM y NaH₂PO₄ 7 mM en 10 l de WFI. La PBS tenía un pH de aproximadamente 6,9 y una conductividad de aproximadamente 16,9 ms/cm. Se filtró la PBS a través de un filtro de 0,2 µm. Se marcó el fin de la diafiltración midiendo el pH y la conductividad de la formulación dializada. Se drenó la formulación del sistema de ultrafiltración no superando el 120% del volumen inicial (~1,2 litros). Se tomó una muestra para el análisis general y para el recuento de bacterias aerobias (control de la carga biológica). El límite de aceptación fue <1,000 UFC/ml.

Al final de la diálisis, se filtró la formulación a través de un filtro de 0,2 µm para mantener el control de la carga biológica. Se conectó un recipiente a presión que contenía la formulación a un filtro estéril de 0,2 µm (Sartobran P de Sartorius). El filtro estaba montado previamente en un tanque de recepción estéril. Se realizó la filtración aplicando una presión de 5-30 psi sobre el recipiente a presión. Se tomó una muestra para el análisis general y para el recuento de bacterias aerobias (control de la carga biológica). El límite de aceptación fue <100 UFC/ml.

Normalización final. Se analizó la formulación para determinar el tamaño, la composición de lípido/agente terapéutico en el liposoma, el contenido en fármaco y agente terapéutico libre mediante HPLC. El rendimiento esperado en este ejemplo fue una formulación de un litro que contenía aproximadamente 6 mg/ml de alendronato encapsulado y 35 mg/ml de lípidos. Basándose en los resultados de la concentración de alendronato, se calculó la dilución requerida para lograr aproximadamente un litro de concentración de formulación final de 5 mg/ml o 0,5 mg/ml. Para producir la formulación de 5 mg/ml, se diluyeron aproximadamente 900 ml de alendronato liposómico tras la ultrafiltración con aproximadamente 100 ml de PBS, preparada tal como se describió anteriormente. Adicionalmente, para producir la formulación de 0,5 mg/ml, se diluyeron aproximadamente 100 ml de alendronato liposómico tras la ultrafiltración con aproximadamente 900 ml de PBS para una concentración de 0,5 mg/ml. Se tomó una muestra para determinar la concentración de alendronato lograda.

Tras la producción de la concentración de formulación convencional, se conectó una botella que contenía la formulación a dos filtros estériles secuenciales de 0,2 µm (Sartobran P de Sartorius) ubicados en una sala de clase 100 o una campana biológica estéril. Se montó previamente el filtro en una bolsa o botella de recepción desechable esterilizada previamente. Se realizó la filtración mediante una bomba peristáltica o nitrógeno a presión. La presión no superó los 10 psi. Cuando finalizó la filtración se sometió el filtro a prueba para determinar la integridad.

El alendronato en liposomas para infusión i.v. producido en el ejemplo anterior tenía varias propiedades deseables, por ejemplo (i) estabilidad de tres años de al menos el alendronato y los lípidos a 5° (intervalo de 2-8°C); (ii) diámetro promedio de vesícula de 80 ± 5 sin materia particulada; (iii) una concentración de alendronato sódico de hasta 5 mg/ml (intervalo de 0,1 - 5,0 mg/ml); (iv) encapsulación de alendronato mayor del o igual al 96%; (v) composición lipídica de distearoilfosfatidilcolina / distearoilfosfatidilglicerol / colesterol (DSPC/DSPG/CHOL) de 3/1/2 mol/mol/mol; (vi) osmolalidad fisiológica de 270-340 mOsm/kg, (vii) viscosidad similar a la del agua, es decir, viscosidad dinámica de aproximadamente 1,0 mPa s a 20°C; (viii) pH 6,8 (intervalo de 6,8-7,0); (ix) aceptabilidad mundial de calidad para excipiente según la farmacopea de los EE.UU. o EP; (x) cumple las directrices de la USP para la esterilidad y los pirógenos tal como se publica en la USP 24-NF 19; (xi) compatibilidad (uso) con solución salina, kits y jeringas de infusión; y (xii) compatibilidad (procedimiento) con filtros, vidrio y acero inoxidable de tubos.

La figura 3 es una imagen de TEM del alendronato liposómico fabricado en el ejemplo anterior. Se observó buena homogeneidad y uniformidad de la población de liposomas, y los liposomas mostrados tienen un tamaño de entre 40 y 120 nm.

Ejemplo 2 – Pruebas de rigidez de los liposomas

Se analizaron cuatro muestras de liposomas unilamelares grandes (diámetro de aproximadamente 100 nm) para determinar la rigidez. Los liposomas vacíos disueltos en PBS obtenidos según la presente invención se marcaron como LPO. Las formulaciones de liposomas que contenían 5,0 mg/ml de alendronato obtenidas según la presente invención se marcaron como LSA. Se obtuvieron otras dos muestras de liposomas, marcadas como KS y HU, disueltas en HEPES, según el método de la técnica anterior descrito en Epstein-Barash, Hila, *et al.*, "Physicochemical parameters affecting liposomal bisphosphonates bioactivity for restenosis therapy: Internalization, cell inhibition, activation of cytokines and complement, and mechanism of cell death", J. Controlled Release 146 (2010) 182-195

Se analizó cada muestra para determinar la compresibilidad volumétrica específica de los liposomas. Usando velocimetría por ultrasonidos, se evaluaron las propiedades elásticas de los liposomas basándose en la siguiente relación:

$$\beta_s = \frac{1}{\rho \cdot u^2} \quad (1)$$

donde β_s , ρ y u son la compresibilidad adiabática, la densidad y la velocidad del sonido de la suspensión, respectivamente. Hianik T., Haburcak M., Lohner K., Prenner E., Paltauf F., Hermetter A. (1998): Compressibility and density of lipid bilayers composed of poliunsaturated phospholipids and cholesterol, *Coll. Surf. A* 139, 189-197; Hianik T., Rybár P., Krivánek R. Petříková M., Milena Roudna M. Hans-Jürgen Apell, HJ. (2011): Specific volume and compressibility of bilayer lipid membranes with incorporated Na, K-ATPase. *Gen. Physiol. Biophys.* 30, 145-153. Por tanto, midiendo los cambios de la velocidad del sonido y la densidad, también pueden determinarse los cambios de compresibilidad.

La velocidad del ultrasonido se midió usando un velocímetro diferencial de trayectoria fija que consistía en dos resonadores de cavidad acústica casi idénticos (Sarvazyan A.P. (1991): Ultrasonic velocimetry of biological compounds, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20, 321-342; Sarvazyan A.P., Chalikian T.V. (1991): Theoretical analysis of an ultrasonic interferometer for precise measurements at high pressures, *Ultrasonics* 29, 119-124) operado a frecuencias de alrededor de 7,2 MHz. Se midieron las frecuencias de resonancia de las células usando un analizador de redes controlado por ordenador (USAT, EE.UU.). El volumen de muestra fue de 0,7 ml. Las células del resonador estaban equipadas con agitadores magnéticos para garantizar muestras dispersas de manera homogénea durante las mediciones. Un resonador contenía la disolución de liposoma en una concentración de 10 mg/ml con respecto a fosfolípidos, mientras que el otro se llenó con la misma disolución tampón (PBS o HEPES) sin vesículas como referencia. Cuando comenzaron una serie de mediciones, se compararon en primer lugar las frecuencias de resonancia de ambos resonadores midiendo ambas células con líquido de referencia idéntico. Como la densidad de energía de la señal sónica era pequeña por todas partes (la amplitud de presión en la onda ultrasónica fue menor de 103 Pa), se evitó cualquier efecto de la onda de sonido sobre las propiedades estructurales de las vesículas. En general, la velocimetría ultrasónica permite la determinación de la velocidad del sonido $[u]$ o más bien sus incrementos dependientes de la concentración (Sarvazyan A.P. (1982): Development of methods of precise measurements in small volumes of liquids, *Ultrasonics* 20, 151-154) tal como se define por la ecuación:

$$[u] = \frac{u - u_0}{u_0 c} \quad (2)$$

donde c es la concentración de soluto en mg/ml, y el subíndice "0" se refiere al disolvente (tampón). El valor de $[u]$ puede determinarse directamente a partir de los cambios de las frecuencias de resonancia f y f_0 de ambos resonadores (f es la frecuencia de resonancia de la muestra, y f_0 es la del tampón de referencia):

$$[u] = \frac{u - u_0}{u_0 c} = \frac{f - f_0}{u_0 c} (1 + \gamma) \quad (3)$$

(el coeficiente cumple la condición $\gamma \ll 1$ y puede despreciarse en los cálculos).

Un sistema densitométrico de alta precisión (DMA 60 con dos cámaras de muestra DMA 602 M, Anton Paar KG, Graz, Austria) que funcionaba según el principio del tubo vibrante (Kratky O., Leopold H., Stabinger H. (1973): Se usó la determinación del volumen específico parcial de proteínas mediante la técnica del oscilador mecánico, En: *Methods in Enzymology* (Ed. E. Grell), vol. 27, págs. 98-110, Academic Press, Londres) para determinar la densidad (ρ) de la disolución de vesículas. Se calcularon los volúmenes parciales específicos aparentes (ϕV) a partir de los datos de densidad usando la ecuación:

$$\phi V = \left[1 - \frac{\rho - \rho_0}{c} \right] \cdot \frac{1}{\rho_0} = \frac{1}{\rho_0} - [\rho] \quad (4)$$

donde el subíndice 0 se refiere de nuevo al disolvente de referencia y $[\rho] = (\rho - \rho_0)/(\rho_0 c)$ indica el incremento con la concentración de la densidad. Se controló la temperatura de las células a dentro de $\pm 0,02^\circ\text{C}$ con un ultratermostato Lauda RK 8 CS (Lauda, Alemania).

La determinación del volumen específico además del incremento de la concentración con la velocidad del sonido permitió la estimación de la compresibilidad aparente específica reducida, $\phi\kappa/\beta_0$, de las vesículas, basándose en la siguiente ecuación:

$$\frac{\varphi_k}{\beta_0} = -2|u| - \frac{1}{\rho_0} + 2\varphi_v \quad (5)$$

donde β_0 es el coeficiente de la compresibilidad y ρ_0 es la densidad de tampón (Sarvazyan 1991). El valor de φ_k/β_0 indica la compresibilidad volumétrica de los liposomas en relación con el tampón. El valor más alto de φ_k/β_0 significa una compresibilidad mayor (es decir, menos rigidez) de liposomas.

Con el fin de determinar la compresibilidad volumétrica específica de los liposomas, se midieron el incremento con la concentración de la velocidad del ultrasonido, $[u]$ y la densidad, ρ . Entonces, se determinaron el volumen específico, φ_V y la compresibilidad aparente específica, φ_k/β_0 por medio de ecuaciones (4,5).

La figura 4 demuestra que los liposomas de la presente invención son sustancialmente rígidos en comparación con otras formulaciones de liposomas y liposomas vacíos. Tal como se muestra en la figura 4, la compresibilidad específica (a la inversa de la rigidez) de los liposomas LSA es significativamente inferior que la de los liposomas vacíos obtenidos mediante las formulaciones convencionales de la técnica anterior. La compresibilidad de los liposomas LSA es de alrededor de 0,70, mientras que la de los liposomas vacíos es de alrededor de 0,90. La compresibilidad específica de los liposomas KS y HU es significativamente diferente en 0,75. Este ejemplo demuestra que las propiedades mecánicas son sensibles a la formulación y la presencia del fármaco dentro de los liposomas.

Ejemplo 3 – Análisis de la estabilidad de los liposomas

En las tablas 4 y 5 se ejemplifica la estabilidad de la formulación de liposomas obtenida según el ejemplo 1. La tabla 4 demuestra que los liposomas de la presente invención son estables cuando se almacenan a 4 grados C al menos durante 36 meses, y la formulación cumple todas las especificaciones necesarias.

Tabla 4 - Estabilidad a 4°C

	Espec.	Base	1 mes	7 meses	12 meses	24 meses	36 meses
Aspecto	dispersión blanquecina	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme	conforme
Alendronato (mg/ml)	0,5±0,05	0,49	0,53	0,54	0,51	0,52	0,52
Porcentaje de encapsulación (%)	>96	98%	98%	96	>98%	>99%	>99%
DSPC (mg/ml)	1,4-2,0	1,9	1,8	2	1,6	1,8	1,8
DSPG (mg/ml)	0,5-0,7	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6
Col. (mg/ml)	0,5-0,7	0,55	0,59	0,56	0,58	0,6	0,61
razón fármaco:lípido	1:5,7±1,0	1;6,2	1;5,6	1;5,9	1;5,3	1;5,8	1;5,8
tamaño de vesícula (nm)	diámetro de 100 ± 30	92 nm	92 nm	92 nm	92 nm	91 nm	91 nm
pH	6,7-7,3	6,9	6,9	6,9	7	7	6,9
osmolalidad (mOsm/kg)	270-340	309	nd	317	316	312	312

La tabla 5 demuestra que los liposomas de la presente invención son estables cuando se almacenan a 25 grados C al menos durante 7 meses, y la formulación cumple todas las especificaciones necesarias.

Tabla 5 - Estabilidad a 25°C

	Espec.	Base	1 mes	2 meses	7 meses
Aspecto	dispersión blanquecina	conforme	conforme	conforme	conforme
Alendronato (mg/ml)	0,5 ± 0,05	0,49	0,52	0,51	0,51
Porcentaje de encapsulación (%)	>96	98%	98	>99	98
DSPC (mg/ml)	1,4-2,0	1,9	1,9	1,9	1,9
DSPG (mg/ml)	0,5-0,7	0,6	0,6	0,6	0,6
Col. (mg/ml)	0,5-0,7	0,55	0,59	0,58	0,57
razón fármaco:lípido	1:5,7 ± 1,0				01:06,0
tamaño de vesícula (nm)	diámetro de 100 ± 30	92 nm	92	92	93
pH	6,7-7,3	6,9	7	6,9	6,9

osmolalidad (mOsm/kg)	270-340	309	nd	nd	315
-----------------------	---------	-----	----	----	-----

Ejemplo 4 – Análisis de la uniformidad de los liposomas

Se sometió a ensayo la uniformidad de la formulación de liposomas usando el sistema de dimensionamiento de partículas Nano zs de Malvern. Este procedimiento determina la uniformidad del tamaño de vesícula de la formulación liposómica mediante dispersión de luz dinámica (DLS) y caracteriza la distribución de tamaño de partículas suspendidas en medios líquidos. Esta técnica es sensible a una distribución de tamaño de partícula en el intervalo de 10-1000 nm, y es útil para un intervalo de partículas incluyendo emulsiones de liposomas, nanopartículas y polímeros sintéticos. La técnica puede usarse para proporcionar un diámetro promedio de una preparación de liposomas homogénea, así como una indicación de la heterogeneidad de la formulación. Tras normalizar el sistema de tamaño de partícula Nano-zs de Malvern de conformidad con las instrucciones de funcionamiento, se diluyeron en primer lugar muestras de liposomas de 0,5 mg/ml a 1/3 en PBS. Se confirmó el $\lambda_{\text{máx}}$ de UV a 600 nm de la disolución diluida usando un espectrofotómetro 2100pro UV/VIS de Ultraspec. Se diluyó de nuevo la muestra de liposomas hasta que se logró un valor de densidad óptica (D.O.) de $10 \pm 0,02$. De nuevo, se confirmó que el $\lambda_{\text{máx}}$ de UV a 600 nm de la disolución de segunda dilución tenía un valor de D.O. de $0,10 \pm 0,02$. Entonces, se colocaron 1,0-1,5 ml de la muestra diluida en un tubo de cultivo, y se analizaron para determinar el tamaño de vesícula mediante el sistema de análisis de tamaño de partícula Nano-zs de Malvern. El análisis se llevó a cabo a temperatura ambiente ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) a un ángulo fijo de 173° , longitud de onda de láser de 633 nm. Se acumularon los datos para lograr 150-500 Kcps (kilocuentas por segundo).

La tabla 6 ilustra las mediciones de una formulación obtenida según esta invención. El tamaño promedio de liposoma es de 80,41 nm, con un PDI de 0,04.

Tabla 6

N.º de medición	Tamaño (nm)	PDI
1	80,28	0,042
2	80,49	0,024
3	80,29	0,052
4	80,82	0,022
5	80,69	0,041
6	79,68	0,042
7	80,57	0,043
8	80,56	0,030
9	80,33	0,028
Promedio	80,41	0,04
Desviación estándar	0,330	0,010
%DER	0,41	28,50

Se analizaron los liposomas HU, los liposomas de la técnica anterior descritos en el ejemplo 2 anterior, para determinar la uniformidad de conformidad con el procedimiento descrito anteriormente. El tamaño promedio Z de los liposomas HU fue de 176,5 nm.

Las figuras 5A y 5B ilustran de la distribución de tamaño de los liposomas obtenidos según esta invención y de los liposomas HU, respectivamente. La figura 5A muestra que la formulación de liposomas de la invención tiene un diámetro medio de aproximadamente 88 nm, y el tamaño de diámetro oscila estrechamente entre 69 y 107 nm. En cambio, la figura 5B muestra que la formulación de liposomas HU tiene un diámetro medio de alrededor de 201 nm, teniendo los liposomas diámetros de desde tan solo 80 nm hasta más de 500 nm. El PDI de la formulación en la figura 5A fue de 0,025. El PDI de la formulación HU de la figura 5B fue de 0,118.

REIVINDICACIONES

1. Liposoma para su uso en la prevención de la reestenosis, teniendo dicho liposoma un componente lipídico y encapsulando un agente terapéutico, que tiene una razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a lípidos de aproximadamente 1:5 a 1:8, en el que el componente lipídico comprende DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2, y dicho liposoma tiene una compresibilidad menor de 0,70 ml/g.
2. Formulación para su uso en la prevención de la reestenosis, comprendiendo dicha formulación una pluralidad de liposomas, teniendo dichos liposomas un componente lipídico y un agente terapéutico, en la que el componente lipídico comprende DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2, y teniendo la formulación un PDI menor de 0,07.
3. Liposoma según la reivindicación 1 o formulación según la reivindicación 2, en donde el liposoma está cargado negativamente.
4. Liposoma según la reivindicación 1 o formulación según la reivindicación 2, en donde el liposoma tiene osmolalidad interna al liposoma en el intervalo de 340-440 mOsm/kg.
5. Liposoma según la reivindicación 1 o formulación según la reivindicación 2, en donde los liposomas tienen conductividad interna al liposoma en el intervalo de 13,5-17,5 ms/cm.
6. Liposoma según la reivindicación 1 o formulación según la reivindicación 2, en donde el agente terapéutico es un bisfosfonato, que tiene preferiblemente un intervalo de concentración de bisfosfonato de 0,5 a 5 mg/ml dentro del liposoma.
7. Liposoma según la reivindicación 1 o formulación según la reivindicación 2, en donde el liposoma tiene un pH liposómico interno de aproximadamente 6,9.
8. Formulación según la reivindicación 2, en la que los liposomas tienen un tamaño promedio de aproximadamente 80 ± 5 nm.
9. Formulación según la reivindicación 2, en la que al menos el 96% del agente terapéutico dentro de dicha formulación está encapsulado.
10. Formulación según la reivindicación 2, que tiene una razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a dicho componente lipídico de aproximadamente 1:5 a 1:8.
11. Formulación según la reivindicación 2, en la que los liposomas tienen una compresibilidad no mayor de 0,70 ml/g.
12. Formulación según la reivindicación 2, en la que el PDI es de entre 0,02 y 0,05.
13. Formulación para su uso en la prevención de la reestenosis, comprendiendo dicha formulación una pluralidad de liposomas que se componen de una cantidad de componente lipídico y agente terapéutico, comprendiendo dicho componente lipídico DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2, y la razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a lípidos está en el intervalo de aproximadamente 1:5 a 1:8, fabricándose dicha formulación mediante las siguientes etapas:
 - (a) mezclar una disolución que contiene un agente terapéutico con una disolución que contiene lípidos que comprende DSPC, DSPG y colesterol en una razón molar de aproximadamente 3:1:2 para formar vesículas de manera que la razón en masa de dicho agente terapéutico con respecto a lípidos está en el intervalo de aproximadamente 1:5 a 1:8,
 - (b) extraer las vesículas, lo que consiste esencialmente en extraer repetidamente a través de un único filtro múltiples veces, teniendo dicho filtro un tamaño de poro de aproximadamente 100 nm, y
 - (c) someter las vesículas a ultrafiltración.
14. Formulación según la reivindicación 13, formada además con la etapa de: (d) diluir la formulación con solución salina tamponada con fosfato para formar una concentración final de dicha formulación.
15. Formulación según la reivindicación 13, en la que la extrusión de la etapa (b) se lleva a cabo entre 55° - 75°C.
16. Formulación según la reivindicación 13, en la que la extrusión de la etapa (b) se realiza a una presión de

entre 60-90 psi.

5

17. Formulación según la reivindicación 13, en la que la extrusión de la etapa (b) se repite 10-18 veces antes de la ultrafiltración.
18. Formulación según la reivindicación 13, en la que la formulación tiene un pH de aproximadamente 6,9.
19. Formulación según la reivindicación 13, en la que la formulación tiene un PDI menor de 0,07.

FIG. 1

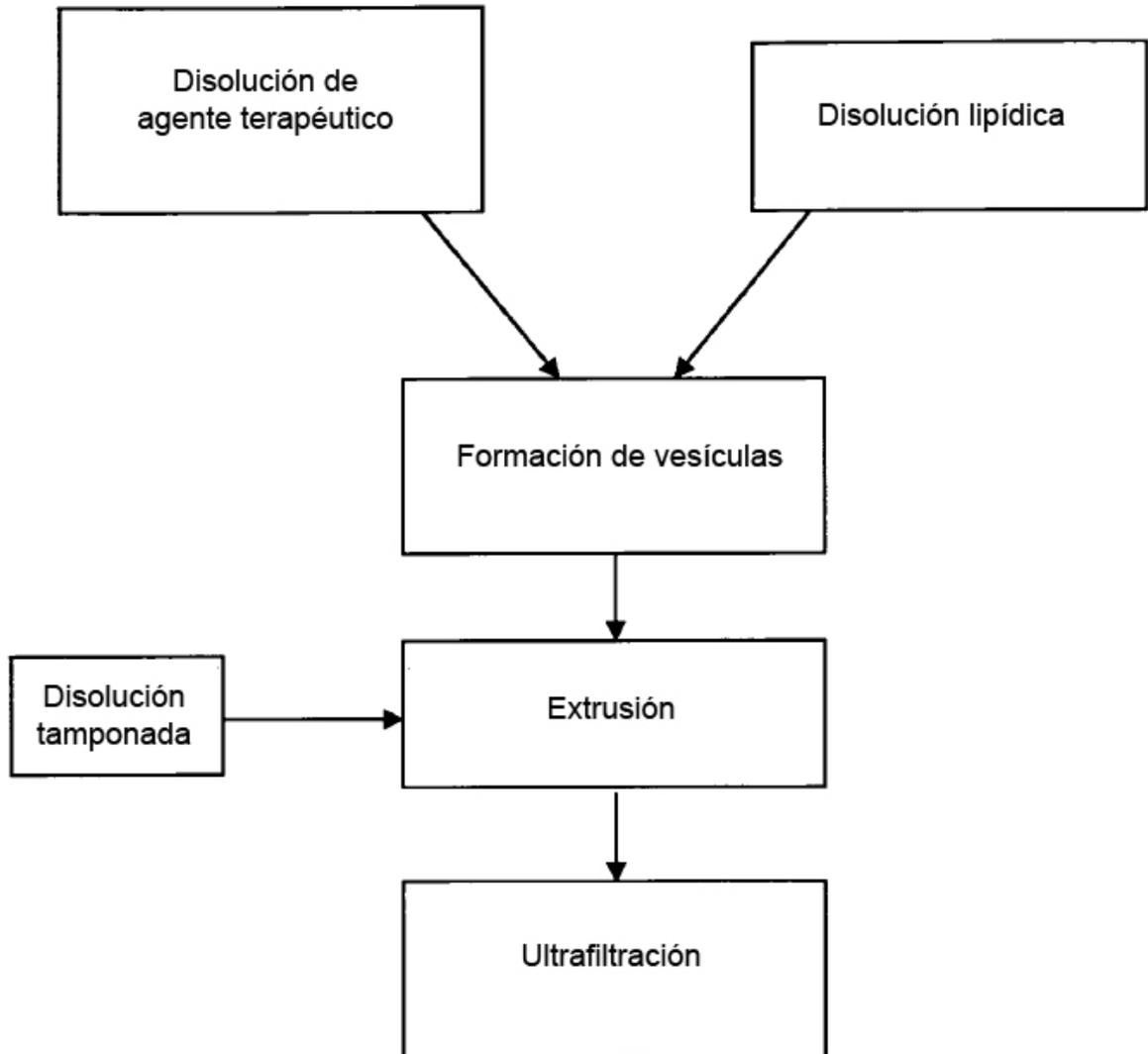


FIG. 2

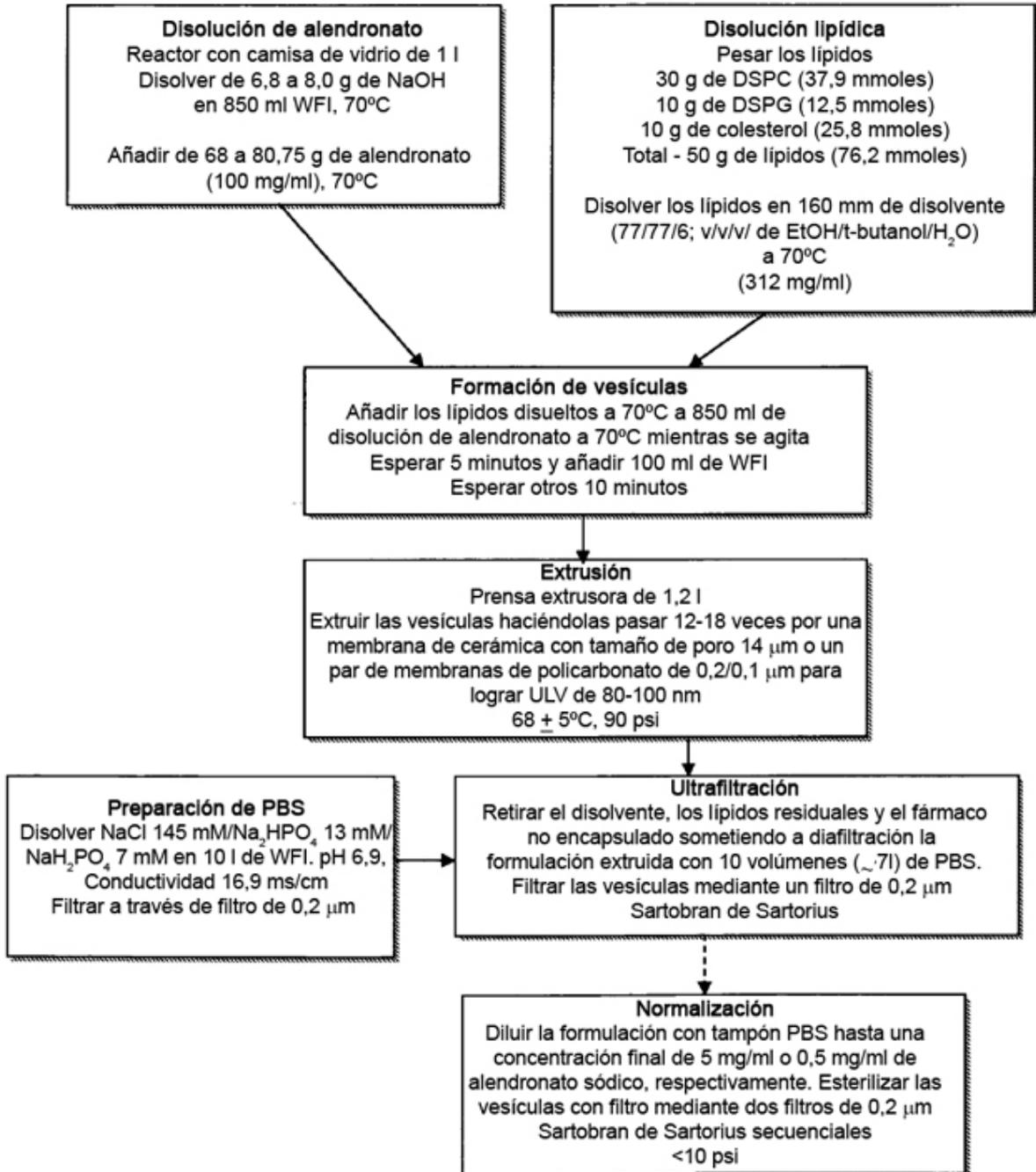


FIG. 3

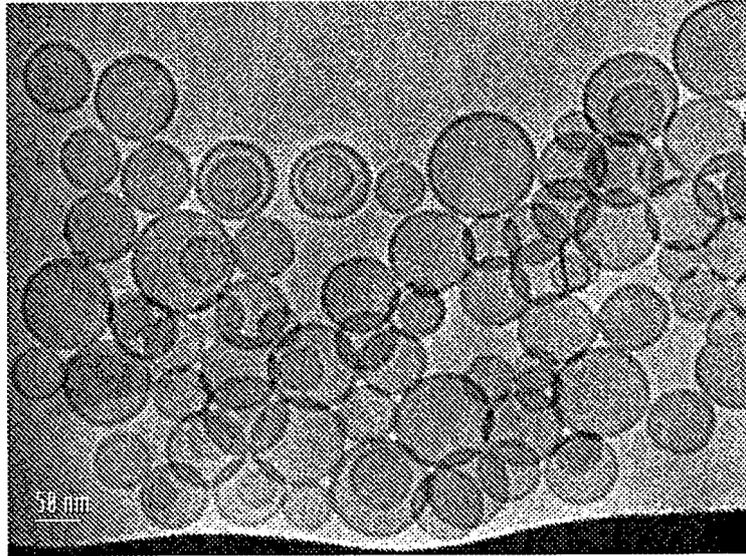


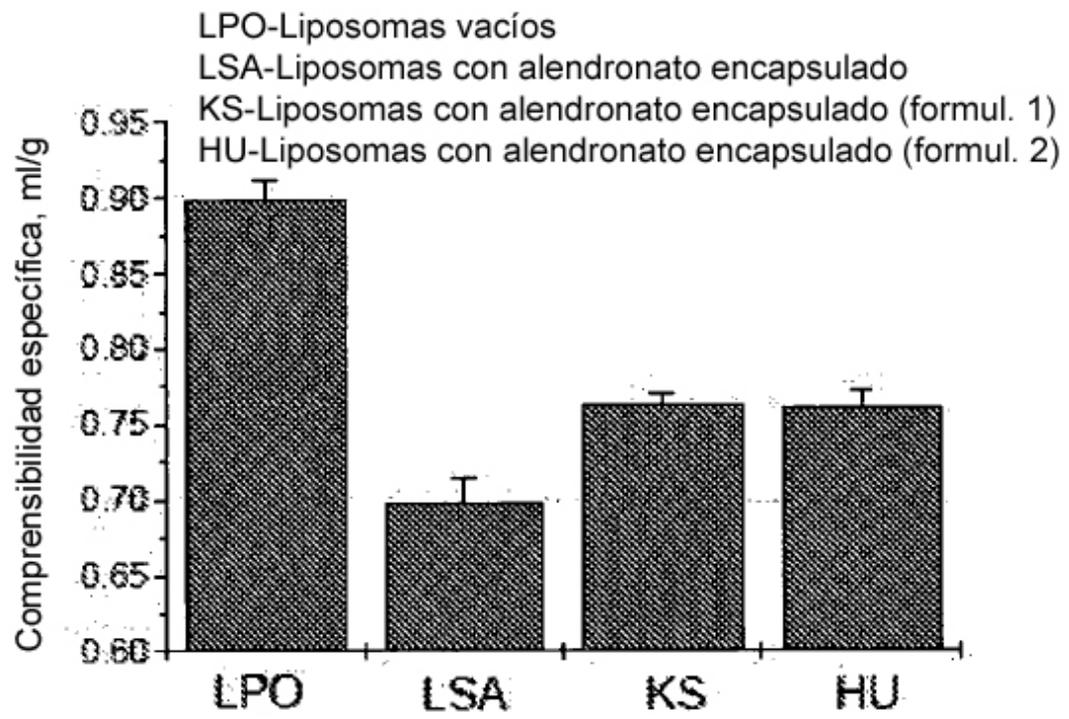
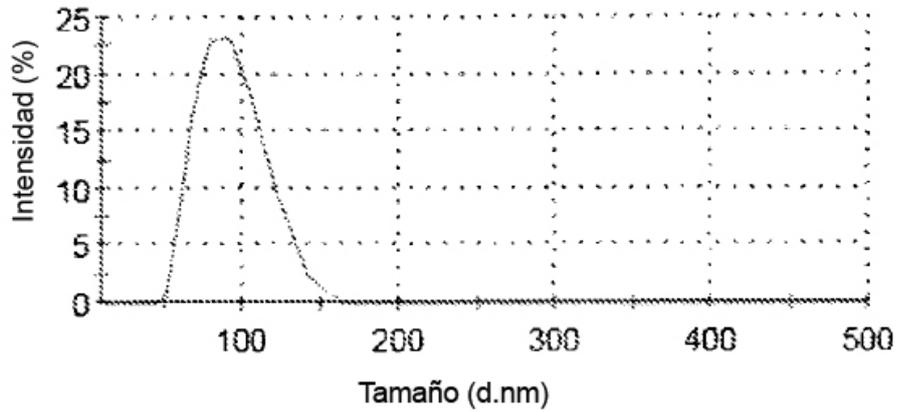
FIG. 4

FIG. 5A

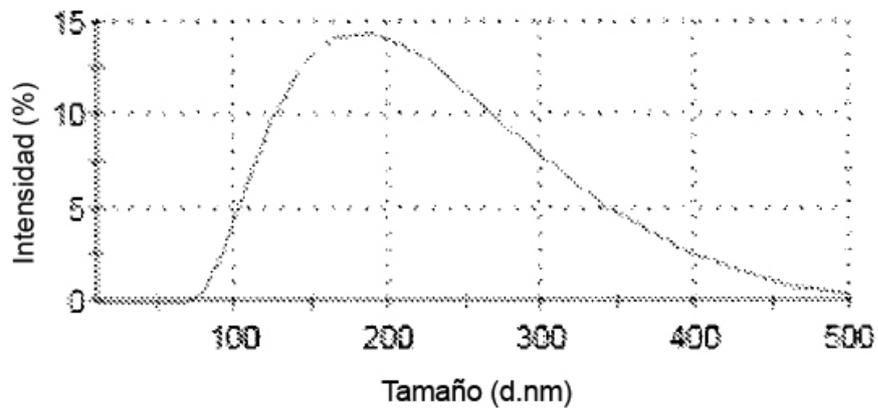
Distribución de tamaño por intensidad



Diam (nm)	% de intensidad	Anchura (nm)
Pico 1: 98.87	100.0	19.89

FIG. 5B

Distribución de tamaño por intensidad



Diam (nm)	% de intensidad	Anchura (nm)
Pico 1: 201.7	100.0	77.92