

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 549**

51 Int. Cl.:

B01J 13/04 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

B01F 3/08 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015 PCT/JP2015/085455**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16098875**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015 E 15870074 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 3235561**

54 Título: **Método para producir liposoma y aparato para producir liposoma**

30 Prioridad:

19.12.2014 JP 2014257282

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

18.03.2019

73 Titular/es:

**FUJIFILM CORPORATION (100.0%)
26-30, Nishiazabu 2-chome, Minato-ku
Tokyo 106-8620 , JP**

72 Inventor/es:

**SUGIYAMA SUSUMU;
YAMADA NAOKI;
SUGIYAMA SHIGEHISA y
OKUBO YOHEI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 704 549 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para producir liposoma y aparato para producir liposoma

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir un liposoma y a un aparato para producir un liposoma. Específicamente, la presente invención se refiere a un método para producir un liposoma que puede utilizarse adecuadamente para aplicaciones farmacéuticas, y a un aparato para producir dicho liposoma.

10

Técnica relacionada

Un liposoma (en adelante, se hace referencia a él también como vesícula de lípido) es una vesícula cerrada formada por una membrana lipídica de dos capas con el uso de lípidos y tiene una solución acuosa (fase acuosa exterior) en la que se dispersan los liposomas y una fase acuosa (fase acuosa interior) dentro del espacio de la vesícula cerrada. Los liposomas han sido objeto de estudio para diversas aplicaciones, como sensores inmunes, glóbulos rojos artificiales y vehículos de sistemas de administración de fármacos aprovechando características como la capacidad de barrera, la capacidad de retención de compuestos, la biocompatibilidad y el grado de libertad de ajuste del tamaño de partícula, una fácil biodegradabilidad y propiedades de modificación de la superficie. En cuanto a la aplicación de un vehículo, los liposomas pueden encapsular compuestos hidrosolubles, materiales lipófilos de bajo peso molecular y alto peso molecular, así como una amplia gama de materiales. En particular, en el caso de utilizar el liposoma como un vehículo para un sistema de administración de fármaco, el tamaño de partícula del liposoma es preferentemente reducido desde el punto de vista de la permeabilidad en membranas biológicas.

15

20

25

Los liposomas se pueden preparar agitando y emulsionando una fase acuosa y una fase oleosa en un aparato de agitación. Dado que puede formarse espuma durante la emulsificación en un aparato de agitación, es preferente tener un medio antiespumante.

30

35

40

45

50

Con respecto a los medios antiespumantes, por ejemplo, el Documento de patente 1 divulga un tanque de desespumado que incluye un cuerpo de tanque para contener un líquido para su tratamiento en un estado en el que una superficie de líquido es verticalmente variable y una pluralidad de boquillas de desespumado para difundir y expulsar un líquido antiespumante por encima del líquido que se va a tratar, en el que se desespuman las burbujas contenidas en el líquido que se va a tratar pulverizando el líquido antiespumante de la pluralidad de boquillas de desespumado hacia la superficie líquida del líquido que se va a tratar. Se describe asimismo que este tanque de desespumado se utiliza conectado a una columna de concentración flotante 6, que es un ejemplo de un aparato de sólidos flotantes. El Documento de patente 2 divulga un aparato de concentración de presión reducida de circulación de líquido que consiste en un tanque de depósito de precalentamiento para un líquido espumable, una máquina de desespumado y un condensador, que está configurado para evitar la formación de espuma de tal manera que se coloca un cuerpo giratorio en la máquina de desespumado, se introduce el líquido espumable precalentado en el tanque de depósito de precalentamiento en el cuerpo giratorio de la máquina de desespumado y se dispersan finamente las gotas de líquido en partículas finas y se liberan desde el cuerpo giratorio. El Documento de patente 3 divulga un aparato de centrífuga de tipo de sedimentación centrífuga para separar un sólido de una mezcla que contiene un líquido y un sólido que tiene un peso específico menor que el del líquido, que se caracteriza por proporcionar un rotor que tiene un disco dentro. Se afirma asimismo que se proporciona un tanque de desespumado. El Documento de patente 4 divulga un aparato de desespumado con un agente oleoso formado conectando un tanque de agente de aceite y un dispositivo de aplicación de agente de aceite a una tubería de suministro del agente de aceite y una tubería de retorno de agente de aceite, caracterizado por que se proporciona un dispositivo de succión que tiene un puerto de succión para aspirar las burbujas en el tanque de agente de aceite de tal manera que la distancia entre la superficie del líquido de agente de aceite en el tanque de agente de aceite y el puerto de succión es de 50 a 110 mm. El Documento de patente 5 divulga un aparato de desespumado que tiene la función de aspiración de las burbujas de una superficie líquida y rotura de las burbujas a través de la fuerza centrífuga de un cuerpo giratorio y a continuación el retorno del líquido hinchado a la superficie líquida.

55

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: JP2008-302264A

60

Documento de patente 2: JP2006-297360A

Documento de patente 3: JP1995-328620A (JP-H07-328620A)

Documento de patente 4: JP2000-027024A

65

Documento de patente 5: JP2003-113596A

Sumario de la invención

Objetivo que debe resolver la invención

5 Se ha intentado reducir la pérdida de energía de emulsificación como consecuencia de la formación de espuma proporcionando un tanque de desespumado. Dado que las gotas y dispersiones de aceite emulsionado son generalmente estables y no experimentan re-coalescencia en un corto período de tiempo, se configura una combinación conocida de un tanque de emulsificación y un tanque de desespumado para que tenga una estructura en la que el tamaño del tanque de emulsificación esté fijo en un mínimo y se amplíe el tanque externo desde el punto de vista de su idoneidad para ampliarlo a escala. Es decir, la capacidad del tanque de desespumado pasa a ser mayor que la capacidad del tanque de emulsificación. Sin embargo, en el método para producir un liposoma que incluye una etapa de agitar una mezcla que contiene una fase oleosa y una fase acuosa, existe el problema de que no es posible conseguir esta reducción al mínimo deseada incluso aunque se prolongue el tiempo de emulsificación ya que puede tener lugar la re-coalescencia debido a la retención en el tanque de emulsificación.

15 Por otra parte, no se ha considerado particularmente el caudal en circulación entre un tanque de emulsificación y un tanque de desespumado ya que las gotas y dispersiones de aceite emulsionado, como se ha descrito son estables en emulsiones en general. Sin embargo, en la emulsificación de liposomas, si el caudal en circulación es reducido, tiene lugar la re-coalescencia en correspondencia con la cantidad de tiempo de residencia en la ruta de circulación y, por lo tanto, no ha sido posible lograr una miniaturización más allá de un cierto nivel.

20 Tal como se ha descrito, en la preparación de liposomas a través de un método de emulsificación, hasta que no se elimina el disolvente tras la emulsificación, la dispersión miniaturizada pasa a ser un sistema en equilibrio inestable en el que aumenta el tamaño de partícula debido a la re-coalescencia. Por lo tanto, cuando aumenta la escala de producción, simplemente, prolongando el tiempo de emulsificación, se limita la miniaturización a un cierto tamaño de partícula y no se puede miniaturizar más. Para lograr una miniaturización predeterminada, es necesario aumentar la energía por volumen unitario del líquido suministrado con un aparato de emulsificación. Sin embargo, si, simplemente, se aumenta el tamaño del aparato de emulsificación para aumentar la producción, se produce un gran arrastre de aire y, por lo tanto, se desperdicia la mayor parte de la energía de cizallamiento debido al cizallamiento de aire con el resultado de formación de espuma y, en consecuencia, no es posible conseguir el tamaño de partícula predeterminado.

25 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir un liposoma miniaturizado en una producción a gran escala, y un aparato para producir un liposoma para su uso en el método mencionado.

Medios para conseguir el objetivo

35 Como resultado de un exhaustivo estudio para resolver los problemas mencionados, los autores de la presente invención han observado que, en un método para producir un liposoma, que incluye una etapa de agitar una mezcla que contiene una fase de aceite y una fase acuosa en un primer tanque de un aparato que tiene el primer tanque y una ruta de circulación, es posible producir liposomas miniaturizados en una producción a gran escala, ajustando la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del tanque y la ruta de circulación para que sea 0,4 o menos y/o ajustar el tiempo necesario para que la mezcla retorne al primer tanque después de ser descargado para que esté en el plazo de 2,0 minutos. La presente invención se ha completado sobre la base de dichos hallazgos. Es decir, según la presente invención, se proporcionará lo siguiente.

40 (1) Un método para producir un liposoma, que comprende una etapa de agitar una mezcla que contiene una fase oleosa en la que se disuelve al menos un lípido en un disolvente orgánico y una fase acuosa en un primer tanque de un aparato que tiene el primer tanque y una ruta de circulación, en el que la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del tanque y la ruta de circulación es de 0,4 o menos y/o el tiempo requerido para que la mezcla retorne al primer tanque después de ser descargado está en el plazo de 2,0 minutos.

45 (2) El método para producir un liposoma de acuerdo con (1), en el que el aparato tiene un segundo tanque en el centro de la ruta de circulación.

50 (3) El método para producir un liposoma de acuerdo con (2), en el que el interior del segundo tanque tiene vapor saturado.

55 (4) El método para producir un liposoma de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), en el que se llena con la mezcla el primer tanque.

60 (5) El método para producir un liposoma de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4), en el que se somete a una carga de presión la mezcla en el primer tanque.

65 (6) El método para producir un liposoma de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (5), en el que se hace circular la mezcla en el primer tanque y por la ruta de circulación empleando una bomba de diafragma o una bomba rotatoria.

(7) El método para producir un liposoma de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (6), en el que se agita la mezcla en el primer tanque utilizando un aparato de emulsificación de tipo generador de flujo de chorro intermitente.

(8) El método para producir un liposoma de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (7), en el que el lípido incluye un

lípidos modificados con polietileno glicol.

(9) El método para producir un liposoma de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (8), en el que el tamaño de partícula promedio de los liposomas que se producen es de 60 nm o menos.

5 (10) El método para producir un liposoma según uno cualquiera de (1) a (9), en el que la capacidad del primer tanque es de 10 l, o más, y de 100 l, o menos.

(11) El método para producir un liposoma según cualquiera de (1) a (10), en el que la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del tanque y la ruta de circulación es de 0,4 o menos y el tiempo requerido para que la mezcla retorne al primer tanque después de ser descargado está en el plazo de 2,0 minutos.

10 (12) Un aparato para producir un liposoma, que comprende un primer tanque y una ruta de circulación, en el que la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del tanque y la ruta de circulación es de 0,4 o menos.

(13) El aparato para producir un liposoma de acuerdo con (12), que comprende además un segundo tanque en el centro de la ruta de circulación.

15 (14) El aparato para producir un liposoma de acuerdo con (12) o (13), que comprende además una bomba en el centro de la ruta de circulación.

(15) El aparato para producir un liposoma de acuerdo con uno cualquiera de (12) a (14), en el que la bomba es una bomba de diafragma o una bomba rotatoria.

20 (16) El aparato para producir un liposoma de acuerdo con uno cualquiera de (12) a (15), en el que se instala un aparato de emulsificación de tipo generador de flujo de chorro intermitente en el primer tanque.

Efecto de la invención

25 De acuerdo con la presente invención, es posible producir un liposoma miniaturizado en una producción a gran escala.

Breve descripción de los dibujos

30 La Fig. 1 presenta un ejemplo de configuración de un aparato para producir un liposoma de acuerdo con la presente invención.

Descripción de las realizaciones de la invención

35 El término "etapa", tal como se utiliza en el presente documento incluye no solo una etapa independiente, sino también una etapa que no se puede separar claramente de otra etapa, en la medida en que se pueda conseguir un efecto esperado de la etapa.

40 Los intervalos numéricos que se presentan en la presente memoria descriptiva separados por "a" significan intervalos que incluyen los valores numéricos indicados antes y después de "a" como los valores mínimo y máximo, respectivamente.

45 Al referirse en el presente documento a un contenido de un componente en una composición, en el caso de que existan varias sustancias que correspondan a un componente de la composición, el contenido significa la cantidad total de las distintas sustancias existentes dentro de la composición, a menos que se especifique lo contrario.

La presente invención se describirá en detalle.

50 El método para producir un liposoma de acuerdo con la presente invención es un método para producir un liposoma, que incluye una etapa de agitación de una mezcla que contiene una fase oleosa en la que se disuelve al menos un lípido en un disolvente orgánico y una fase acuosa en un primer tanque de un aparato que tiene el primer tanque y una ruta de circulación, en el que la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del tanque y la ruta de circulación es de 0,4 o menos y/o el tiempo requerido para que la mezcla retorne al primer tanque después de ser descargado está en el plazo de 2,0 minutos.

55 En la presente invención, es posible utilizar eficientemente la energía del aparato de emulsificación para la miniaturización de los liposomas proporcionando una ruta de circulación que incluye preferentemente un segundo tanque (tanque de desespumado) fuera del primer tanque (tanque de emulsificación) para eliminar así la pérdida de energía por la cizalladura del aire. Además, es posible conseguir la miniaturización deseada ya que se puede eliminar la re-coalescencia de los liposomas debido a la residencia ajustando la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del primer tanque y la ruta de circulación para que sea 0,4 o menos y/o se puede eliminar la re-coalescencia de los liposomas ajustando el tiempo requerido para que la mezcla retorne al primer tanque después de descargarse para que esté en el plazo de 2,0 minutos. Desde el punto de vista de la especificidad de los liposomas que existen en un sistema en equilibrio de dispersión y re-coalescencia, la posibilidad de producir liposomas finos produciendo los liposomas en las condiciones mencionadas, particularmente en el caso de una producción a gran escala es un efecto ventajoso completamente inesperado.

(Liposoma)

El liposoma es una vesícula de lípido formada por moléculas de lípidos que contienen dos capas de lípidos. Concretamente, el liposoma se refiere a una vesícula que contiene un lípido cerrado que tiene un espacio separado del entorno externo por una doble capa de lípido formada sobre la base de la polaridad de los grupos hidrófobos y grupos hidrófilos de las moléculas lipídicas. El liposoma es una vesícula cerrada formada por una membrana lipídica de dos capas que usa lípidos y tiene una fase acuosa (fase interior de agua) dentro del espacio de la vesícula cerrada. La fase acuosa interna contiene agua y similares. El liposoma puede ser laminar simple (laminar de una sola capa, monocapa laminar, unilaminar o de membrana de dos capas simple) o laminar multicapa (multilaminar, que es una estructura similar a una cebolla que tiene múltiples membranas de dos capas en las que las capas individuales están compartimentadas por capas de tipo acuoso). En la presente invención, el liposoma laminar de una sola capa es preferente desde el punto de vista de la seguridad y la estabilidad de aplicaciones farmacéuticas.

El liposoma es preferentemente un liposoma capaz de encapsular un fármaco y no está particularmente limitado por lo que respecta a la forma. La "encapsulación" significa adoptar una forma en la que un fármaco está contenido en una fase acuosa interna y una membrana con respecto al liposoma. Por ejemplo, el liposoma puede ser una forma en la que un fármaco se encapsula dentro de un espacio cerrado formado por una membrana, una forma en la que se incluye un fármaco en la propia membrana o una combinación de las mismas.

El tamaño (tamaño de partícula promedio) del liposoma no está particularmente limitado y es preferentemente de 100 nm o menos, más preferentemente de 30 a 70 nm, aún más preferentemente de 40 a 60 nm y particularmente preferentemente de 40 a 55 nm. El liposoma se presenta preferentemente en forma esférica o una forma cercana a ella. En la presente invención, el "tamaño de partícula promedio" significa un valor promedio en volumen de los diámetros de los liposomas según se mide a través un método de dispersión dinámica de la luz.

El componente (componente de membrana) que constituye la doble capa lipídica de un liposoma se selecciona entre lípidos. Como lípido, puede utilizarse cualquiera siempre y cuando se disuelva en un disolvente mixto de un disolvente orgánico hidrosoluble y un disolvente orgánico a base de éster. Entre los ejemplos específicos de lípidos se incluyen fosfolípidos, lípidos distintos de los fosfolípidos, colesterol y derivados de los mismos. Estos componentes pueden estar compuestos de un solo componente o de varios.

Entre los ejemplos del fosfolípido se incluyen fosfolípidos naturales o sintéticos, como fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidil glicerol, ácido fosfatídico, fosfatidil etanolamina, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, esfingomielina y cardiolipina o productos hidrogenados de los mismos (por ejemplo, fosfatidil colina de soja hidrogenada (HSPC)). Entre ellos es preferente un fosfolípido hidrogenado, como fosfatidilcolina de soja hidrogenada o esfingomielina y más preferentemente, fosfatidilcolina de soja hidrogenada. En la presente invención, el "fosfolípido" también abarca un derivado de fosfolípido en el que el fosfolípido está modificado.

Los lípidos distintos de los fosfolípidos pueden ser lípidos que no contienen ácido fosfórico y entre los ejemplos de los mismos se incluyen, pero no están particularmente limitados, glicerolípidos que no contienen una fracción de ácido fosfórico dentro de la molécula y esfingolípidos que no contienen una fracción de ácido fosfórico dentro de la molécula. En la presente invención, la expresión "lípidos distintos de los fosfolípidos" también abarca derivados de lípidos distintos de los fosfolípidos en los que se han realizado modificaciones a los lípidos distintos de los fosfolípidos.

En el caso en que los lípidos distintos de los fosfolípidos contengan un grupo funcional básico, por ejemplo, en el caso en que los lípidos distintos de los fosfolípidos sean un material en el que un compuesto que tiene un grupo funcional básico está unido a un lípido, se hace referencia a dicho lípido como lípido cationizado. El lípido cationizado pasa a poder modificar, por ejemplo, la membrana del liposoma y, por lo tanto, puede mejorar la adhesividad a las células que son los sitios diana.

Entre los ejemplos de colesterol de incluyen colesterol que contiene ciclopentahidrofenantreno como cadena principal básica cuyos átomos de carbono están parcial o completamente hidrogenados, y sus derivados. Los ejemplos específicos de colesterol incluyen, pero no están particularmente limitados a, colesterol. Cuando el tamaño de partícula promedio disminuye a 100 nm o menos, la curvatura de la membrana lipídica se vuelve más alta. Dado que la deformación de la membrana dispuesta dentro del liposoma también aumenta, un fármaco hidrosoluble pasa a ser más susceptible a la filtración. Sin embargo, como medio para eliminar las propiedades de filtración, resulta eficaz agregar colesterol o similares para llenar la deformación de la membrana causada por el lípido (efecto estabilizador de la membrana).

Es de esperar que la adición de colesterol en las composiciones de liposomas disminuya la fluidez de la membrana del liposoma llenando los huecos de membrana de los liposomas, o similares. En general, ha sido deseable que el contenido de colesterol en los liposomas sea generalmente una cantidad de hasta aproximadamente 50 % en moles del total de moles de componentes lipídicos (total de lípidos).

En la presente invención, el total de moles de los componentes lipídicos en la composición del liposoma (contenido total de lípidos en la composición del liposoma), el contenido de colesterol es preferentemente del 10 al 35 % en moles, más preferentemente del 15 al 25 % en moles y aún más preferentemente del 17 % a 21 % en moles.

5 Además de los componentes mencionados, pueden añadirse al liposoma un polímero hidrófilo o similar para mejorar la capacidad de retención en la sangre, un ácido graso, diacetilfosfato o similar como estabilizador de la estructura de la membrana, o α -tocoferol o similar como antioxidante. En la presente invención, preferentemente, no se utilizan aditivos como un adyuvante de dispersión no aprobado para uso como inyección intravenosa en aplicaciones farmacéuticas, por ejemplo, un agente tensioactivo o similar.

10 El liposoma contiene preferentemente productos de fosfolípidos modificados con polímeros hidrófilos, lípidos distintos de los fosfolípidos o colesterolos como fosfolípidos, lípidos distintos de los fosfolípidos, colesterolos y derivados de los mismos.

15 Entre los ejemplos del polímero hidrófilo se incluyen, pero no están particularmente limitados a ellos, polietilenglicoles, poligliceroles, polipropilenglicoles, poli(alcoholes vinílicos), un copolímero alterno de anhídrido maleico-estireno, polivinilpirrolidona y ácido poliamino sintético. Los polímeros hidrófilos mencionados se pueden utilizar solos o combinando dos o más de ellos.

20 Entre ellos, desde el punto de vista de la capacidad de retención en la sangre de una formulación, son preferentes polietilenglicoles, poligliceroles y polipropilenglicoles y más preferentemente polietilenglicol (PEG), poliglicerol (PG) y polipropilenglicol (PPG). El polietilenglicol (PEG) es el más comúnmente utilizado y es preferente debido a que tiene el efecto de mejorar la retención de la sangre.

25 El peso molecular de PEG no está particularmente limitado. El peso molecular de PEG es de 500 a 10.000 dalton, preferentemente de 1.000 a 7.000 dalton y más preferentemente de 2.000 a 5.000 dalton.

30 En el liposoma, preferentemente se utiliza un lípido modificado por PEG (lípido modificado con PEG), junto con el lípido principal contenido en el liposoma. Entre los ejemplos específicos del lípido modificado con PEG se incluyen 1,2-diestearoil-3-fosfatidil etanolamina-PEG (DSPE-PEG, fabricado por Nippon Oil & Fats Co., Ltd.; específicamente 1,2-diestearoil-3-fosfatidil etanolamina-PEG2000, 1,2-diestearoil-3-fosfatidil etanolamina-PEG5000 es preferente) y distearoil glicerol-PEG2000 (fabricado por Nippon Oil & Fats Co., Ltd.). Estos lípidos modificados con PEG se pueden añadir en una cantidad de 0,3 a 50 % en masa, preferentemente de 0,5 a 30 % en masa, y más preferentemente de 1 a 20 % en masa con respecto al contenido total de lípidos.

35 En el liposoma, es preferente una combinación lipídica de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (un lípido principal contenido en el liposoma) y 1,2-diestearoil-3-fosfatidil etanolamina-PEG (un lípido utilizado en combinación con el lípido principal).

40 Preferentemente, el liposoma no contiene un polímero aniónico (polianión). En la presente invención, dado que es posible controlar la capacidad de liberación por medio de una presión osmótica de una fase acuosa interna, hay ventajas en que la versatilidad general es excelente y los fármacos que se pueden utilizar en liposomas no están limitados.

45 (Método para producir liposomas)

50 El método para producir un liposoma de acuerdo con la presente invención es un método para producir un liposoma, que incluye una etapa de agitación de una mezcla que contiene una fase oleosa en la que se disuelve al menos un lípido en un disolvente orgánico y una fase acuosa en un primer tanque de un aparato que tiene el primer tanque y una ruta de circulación, en el que la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del tanque y la ruta de circulación es de 0,4 o menos y/o el tiempo requerido para que la mezcla retorne a el primer tanque después de ser descargado está en el plazo de 2,0 minutos.

55 Es particularmente preferente el caso en el que se satisfacen tanto la condición de que la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del tanque y la ruta de circulación es 0,4 o menos, como la condición de que el tiempo requerido para que la mezcla retorne a el primer tanque después de ser descargado esté en el plazo de 2,0 minutos.

60 El método para producir un liposoma puede incluir otras etapas como una etapa de evaporación para evaporar el disolvente orgánico empleado en la etapa de emulsificación, si es necesario.

65 La etapa de emulsificación en la que se emulsionan los lípidos mezclados disueltos en un disolvente orgánico para formar un liposoma, sin una etapa de secado y solidificación, no está limitada siempre y cuando sea una etapa de emulsificación, pero es preferentemente una etapa de aplicación de una alta fuerza de cizalla y realización de microparticulación en una etapa de emulsificación que incluye un disolvente orgánico. Si es necesario, se puede llevar a cabo la evaporación (desolvatación) del disolvente orgánico utilizado en la etapa de emulsión para formar un

liposoma.

(Fase oleosa)

5 Como disolvente orgánico que sirve como fase oleosa, se emplea un disolvente mixto de un disolvente orgánico hidrosoluble y un disolvente orgánico a base de éster. En la presente invención, preferentemente, no se utiliza sustancialmente un disolvente orgánico, como cloroformo, cloruro de metileno, hexano o ciclohexano como el disolvente orgánico, siendo más preferente no utilizar en absoluto estos disolventes orgánicos.

10 El disolvente orgánico hidrosoluble no está particularmente limitado y es preferentemente un disolvente orgánico que tiene la propiedad de ser espontáneamente miscible con agua. Entre los ejemplos específicos del disolvente orgánico hidrosoluble se incluyen alcoholes como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol y t-butanol; glicoles como glicerol, etilen glicol y propilen glicol; y polialquilen glicoles como polietilen glicol. Entre estos, son preferentes alcoholes. El alcohol es preferentemente al menos uno seleccionado entre etanol, metanol, 2-propanol o t-butanol, más preferentemente, al menos uno seleccionado entre etanol, 2-propanol o t-butanol y más preferentemente aún etanol.

15 El disolvente orgánico a base de éster no está particularmente limitado y es preferentemente un éster obtenido a partir de la reacción de ácidos orgánicos y alcoholes. Específicamente, el disolvente orgánico a base de éster es preferentemente al menos uno seleccionado entre acetato de etilo, acetato de metilo, acetato de isopropilo, acetato de t-butilo o propionato de metilo, más preferentemente, acetato de etilo, acetato de isopropilo o propionato de metilo y aún más preferentemente etilo acetato.

20 La relación de mezcla de disolvente orgánico hidrosoluble: disolvente orgánico a base de éster no está particularmente limitada y puede ser de aproximadamente 90:10 a 20:80 y preferentemente de aproximadamente 70:30 a 25:75 en relación de masa. El disolvente mixto de un disolvente orgánico hidrosoluble y un disolvente orgánico a base de éster puede contener además un disolvente acuoso descrito más adelante, como agua o tampón. El disolvente acuoso se puede agregar, por ejemplo, en un intervalo de 1 a 30 % en masa. El pH del disolvente mixto no está particularmente limitado y está en el intervalo de aproximadamente 4 a 10 y más preferentemente de 6 a 9. Los disolventes orgánicos a base de éster pueden contener sustancias fisiológicamente activas o similares, como varios fármacos solubles en estos disolventes.

25 La concentración del lípido no está particularmente limitada y puede ajustarse apropiadamente, pero puede ser de 40 g/l a 250 g/l, preferentemente de 100 g/l a 200 g/l por lo que respecta a una solución en la que un líquido mixto de disolvente orgánico hidrosoluble y un disolvente orgánico a base de éster sirven como disolvente.

(Fase acuosa)

30 Como fase acuosa (solución acuosa) en la que se dispersan los componentes de la membrana cuando se producen liposomas, se utiliza preferentemente agua (agua destilada, agua para inyección o similar), solución salina fisiológica, varios tampones, una solución acuosa de azúcares o una mezcla de los mismos (disolvente acuoso). El tampón no se limita a soluciones tampón orgánicas e inorgánicas y se utiliza preferentemente un tampón que tiene una acción de tampón en la proximidad de un pH cercano al de un fluido corporal y entre los ejemplos de los mismos se incluyen tampón fosfato, tampón Tris, tampón citrato, tampón acetato y tampón de Good. El pH de la fase acuosa no está particularmente limitado y puede ser de 5,0 a 9,0 y preferentemente de 7,0 a 8,0. Por ejemplo, se usa preferentemente un tampón fosfato (por ejemplo, pH = 7,4). La solución acuosa contenida finalmente en la fase acuosa interna del liposoma puede ser una solución acuosa para dispersar los componentes de la membrana cuando se produce el liposoma, o puede ser agua, solución salina fisiológica, varios tampones, una solución acuosa de azúcares o una mezcla de los mismos que se añade recientemente. El agua utilizada como fase acuosa (solución acuosa) está preferentemente libre de impurezas (polvo, productos químicos o similares).

(Etapa de emulsificación)

35 En la etapa de emulsificación, se mezclan una fase oleosa en la que se ha disuelto al menos un lípido en un disolvente orgánico y una fase acuosa para preparar una solución acuosa que contiene lípidos, que se emulsiona después por agitación. Se mezclan una fase oleosa en la que se han disuelto los lípidos en un disolvente orgánico y una fase acuosa, se agita y se emulsiona para preparar así una emulsión en la que una fase oleosa y una fase acuosa se emulsionan en un tipo aceite/agua. Después de mezclar, se forma un liposoma eliminando una porción o todo el disolvente orgánico derivado de la fase oleosa aplicando una etapa de evaporación que se describe más adelante. Alternativamente, se evapora una porción o todo el disolvente orgánico en la fase oleosa durante el curso de la emulsificación por agitación para formar un liposoma.

40 Como método de agitación, se utilizan ondas ultrasónicas o esfuerzo de cizalla mecánico para la miniaturización de las partículas. Más adelante en el presente documento, se describe un aparato de emulsificación preferente. Por otra parte, pueden llevarse a cabo un proceso de extrusión que permite el paso por un filtro que tiene un determinado tamaño de poro o un proceso de microfluidización para uniformar los tamaños de partículas. El uso de una

extrusora o similar puede dar lugar a la deformación de liposomas multivesiculares formados de forma secundaria en liposomas univesiculares. En la presente invención, preferentemente desde el punto de vista de la simplificación del proceso de producción, se utiliza un liposoma de un estado que no tenga carga de fármaco en la siguiente etapa sin procesamiento por extrusión.

5 En la presente invención, la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del primer tanque y la ruta de circulación es de 0,4 o menos y/o el tiempo requerido para que la mezcla retorne al primer tanque después de ser descargado del mismo está en el plazo de los 2,0 minutos. La relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del primer tanque y la ruta de circulación es preferentemente de 0,3 o menos, más
10 preferentemente de 0,20 o menos, y un ejemplo de la misma es de 0,19. El límite inferior de la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del primer tanque y la ruta de circulación no está particularmente limitado, pero generalmente es de 0,10 o más.

15 El tiempo requerido para que la mezcla retorne al primer tanque después de descargarse es preferentemente dentro de 1,0 minuto, más preferentemente en el plazo de 0,8 minutos y aún más preferentemente en el plazo de 0,6 minutos. El límite inferior del tiempo anterior no está particularmente limitado, pero generalmente es de 0,1 minutos o más desde el punto de vista de los efectos antiespumantes.

20 La emulsificación se lleva a cabo agitando en un primer tanque de un aparato que tiene el primer tanque y una ruta de circulación. La capacidad del primer tanque no está particularmente limitada, pero desde el punto de vista de una producción a gran escala favorable, es preferentemente de 10 l, o más, y de 100 l, o menos, y más preferentemente de 20 l, o más, y de 100 l, o menos.

25 Preferentemente, el primer tanque se llena con una mezcla. Al llenar completamente el tanque de emulsificación, se elimina la interfaz gas-líquido y se puede eliminar además la pérdida de energía debido a la formación de espuma. Si queda una pequeña cantidad de aire en la mirilla de la parte superior del primer tanque, o similar, el efecto no se ve afectado y la parte del líquido emulsionante puede llenarse sustancialmente con la mezcla.

30 Preferentemente, la mezcla en el primer tanque puede someterse a una carga de presión. Esto hace posible reducir aún más la pérdida de energía debido a la formación de espuma. La carga de presión se puede realizar, por ejemplo proporcionando una válvula que estrecha la ruta de flujo en el centro de la ruta de circulación derivada del primer tanque.

35 En la presente invención, puede proporcionarse preferentemente un segundo tanque para desespumado en el centro de la ruta de circulación. Al proporcionar el segundo tanque, el despumado se puede realizar de manera eficiente. En el caso de que la ruta de circulación tenga el segundo tanque, la capacidad antes mencionada de la ruta de circulación se refiere a la capacidad de toda la ruta de circulación, incluido el segundo tanque. Además, preferentemente el segundo tanque tiene vapor saturado desde el punto de vista de la eliminación de los materiales gruesos que se generan de del pelado debido al secado. Dependiendo de las necesidades, como la estabilización
40 del flujo de circulación, el segundo tanque también puede estar sujeto a una carga de presión. La carga de presión se puede conseguir, por ejemplo, introduciendo aire comprimido o nitrógeno comprimido en el segundo tanque.

45 Cuando se lleva a cabo la emulsificación, preferentemente, se hace circular una mezcla en el primer tanque y la ruta de circulación utilizando una bomba que puede ser una bomba de tipo turbo (una bomba centrífuga, una bomba de flujo diagonal o una bomba de flujo axial), una bomba de pistón de desplazamiento positivo (una bomba de pistón, una bomba de émbolo o una bomba de diafragma), una bomba rotatoria de desplazamiento positivo (una bomba rotatoria, una bomba de engranajes, una bomba de paletas o una bomba de tornillo), una bomba de tubo o similar. Entre ellas, se puede utilizar preferentemente una bomba de tubo o una bomba de diafragma que no tengan superficies deslizantes. También es posible utilizar preferentemente una bomba rotatoria de desplazamiento positivo
50 con una pequeña pulsación de un caudal de circulación. Particularmente preferente es una bomba de diafragma o una bomba rotatoria que puede asegurar fácilmente un gran caudal.

55 Para la emulsificación, preferentemente, se agita una mezcla en el primer tanque utilizando un aparato de emulsificación. Entre los ejemplos de aparatos de emulsificación que se pueden utilizar se incluyen de tipo de impulsor, de tipo cuchilla con diente de sierra, de tipo rotor cerrado, de tipo de rotor/estator, de tipo mezclador estático, de tipo molino coloidal y de tipo homogeneizador de alta presión. Entre ellos, es preferente tipo impulsor, tipo diente de sierra, tipo rotor cerrado o tipo de rotor/estator que es adecuado para el procesamiento discontinuo en un tanque.

60 Es particularmente preferente un tipo de rotor/estator que es capaz de generar un flujo de chorro en un líquido de tratamiento por rotación a alta velocidad para miniaturización, y capaz de ejercer suficientemente fuerzas de cizalla entre líquido y líquido o entre el líquido y la superficie de la pared. Como ejemplo, se puede utilizar un aparato de emulsión de tipo generador de flujo de chorro intermitente.

65 El aparato de emulsión de tipo generador de flujo de chorro intermitente está compuesto por un rotor y una pantalla, en el que el rotor gira a alta velocidad al mismo tiempo que mantiene un despeje mínimo con la pantalla. La

velocidad del material de procesamiento al que se le ha suministrado energía cinética a través del rotor giratorio de alta velocidad se incrementa al pasar a través de la porción de ranura de la pantalla. El material de procesamiento con una velocidad incrementada forma un flujo de chorro intermitente dentro del material de procesamiento en el tanque y genera fuerzas de corte líquido-líquido en la interfaz de velocidad. Es posible llevar a cabo la atomización por las fuerzas de cizalla generadas por este flujo de chorro intermitente. El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula se pueden controlar mediante la combinación de un rotor y una pantalla.

En la presente invención, un tamaño de partícula promedio de un liposoma para su preparación puede controlarse seleccionando arbitrariamente la velocidad y el tiempo de agitación. Con vistas a obtener un liposoma que tenga seguridad y estabilidad, es preferente proporcionar cizallamiento a una velocidad circunferencial de 15 m/s o superior a una solución acuosa que contiene lípidos. El cizallamiento no está limitado y un ejemplo específico del mismo es el cizallamiento a una velocidad circunferencial de preferentemente 15 m/s o superior y 35 m/s o inferior, más preferentemente el cizallamiento a una velocidad circunferencial de 20 m/s o superior y 35 m/s o inferior y aún más preferentemente, cizallamiento a una velocidad circunferencial de 23 m/s o superior y 30 m/s o inferior.

(Aparato para producir liposomas)

El aparato para producir un liposoma de acuerdo con la presente invención incluye un primer tanque y una ruta de circulación, en la que la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del depósito y la ruta de circulación es de 0,3 o menos. El intervalo preferente de la relación mencionada es tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria descriptiva. Además, el intervalo preferente de la capacidad del primer tanque es también como ha descrito anteriormente en la presente memoria descriptiva.

En la figura 1 se muestra un ejemplo de la configuración del aparato para producir un liposoma de acuerdo con la presente invención. 1.

Se proporciona una ruta de circulación 2 en primer tanque 1, que es un tanque de emulsificación. Se descarga el líquido en el primer tanque 1 del primer tanque 1 y circula a través de la ruta de circulación 2 para volver al primer tanque 1. El primer tanque 1 está provisto de un aparato de emulsificación 3. Al poner en funcionamiento el aparato de emulsificación 3, se agita el líquido y se emulsiona en el primer tanque 1. En el centro del recorrido de circulación 2, hay un segundo tanque 4, que es un tanque de desespumado, y una bomba 5. Las burbujas se pueden separar y retirar en el segundo tanque 4. Además, el líquido puede circular en la ruta de circulación haciendo funcionar la bomba 5. Asimismo, el caudal de circulación se puede controlar ajustando la salida de la bomba.

(Etapa de evaporación)

En la presente invención, se puede proporcionar una etapa de evaporación si es necesario. En la etapa de evaporación, se evapora un disolvente orgánico de la solución acuosa que contiene los liposomas obtenidos en la etapa de emulsión. En la presente invención, la etapa de evaporación incluye al menos una de una etapa de eliminación forzada de una parte o la totalidad del disolvente orgánico derivado de la fase oleosa como una etapa de evaporación y una etapa de evaporación natural de una porción o todo el disolvente orgánico en la fase oleosa durante el transcurso de la agitación-emulsificación.

El método de evaporación de un disolvente orgánico en la etapa de evaporación no está particularmente limitado. Por ejemplo, puede llevarse a cabo al menos una entre una etapa de calentamiento para evaporar un disolvente orgánico, una etapa de continuación de la agitación o la agitación lenta después de la emulsificación o una etapa de realización la desgasificación al vacío.

En la presente invención, en la etapa de evaporación de un disolvente orgánico, preferentemente la concentración de un disolvente orgánico contenido en una solución acuosa que contiene liposomas es de 15 % en masa o menos en el plazo de 30 minutos desde el inicio de una etapa de evaporación del disolvente orgánico.

La temperatura del líquido cuando se lleva a cabo el método de producción de la presente invención se puede ajustar de manera apropiada, pero la temperatura del líquido en el momento de mezclar una fase de aceite y una fase acuosa es preferentemente mayor o igual a la temperatura de transición de fase del lípido que se utilice. Por ejemplo, en el caso de que se use un lípido que tenga una temperatura de transición de fase de 35 ° C a 40 ° C, la temperatura del líquido se ajusta preferentemente a 35 ° C a 70 ° C.

La solución acuosa que contiene los liposomas preparados a través de una etapa de emulsión puede someterse a un procesamiento posterior, como centrifugación, ultrafiltración, diálisis, filtración en gel o criodesecación para eliminar los componentes que no se han incluido en los liposomas, o el ajuste de la concentración y la presión osmótica.

Los tamaños de partícula de los liposomas resultantes pueden hacerse uniformes por diálisis, filtración, procesamiento por extrusión o similares. En el método para producir una composición de liposomas de acuerdo con la presente invención, preferentemente se preparan liposomas vacíos en un estado en el que un fármaco no está

cargado, sin someterse a un proceso de extrusión. Además, si se desea separar el fármaco encapsulado en liposomas del fármaco no encapsulado en liposomas, puede emplearse centrifugación, diálisis, filtración en gel o similares.

5 (Etapa de carga de fármacos)

10 El liposoma obtenido según el método de la presente invención puede encapsular un fármaco. En la etapa de carga del fármaco de encapsulación del fármaco, en el caso de encapsular un fármaco hidrosoluble en los liposomas, puede encapsularse el fármaco en la fase acuosa interna del liposoma a través de un método de disolución del fármaco en un medio acuoso capaz de producir hidratación e hinchazón, seguido de calentamiento a una temperatura por encima o igual que la temperatura de transición de fase, y sonicación o extrusión. Asimismo, puede encapsularse fármaco en una fase acuosa interna disolviendo el fármaco en la fase acuosa en el momento de la emulsificación de lípidos.

15 El fármaco contenido en el liposoma puede ser cualquier fármaco hidrosoluble que pueda encapsularse en liposomas y entre los ejemplos específicos de los mismos se incluyen, sin limitarse a ellos, materiales hidrosolubles que tienen una actividad fisiológica o una actividad farmacológica como enzimas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos (ADN, ARNm, ARNsi, ARNmi), compuestos de bajo peso molecular, azúcares (oligosacáridos y polisacáridos), compuestos poliméricos, agentes antitumorales, agentes antimicrobianos, agentes de contraste, antioxidantes, agentes antiinflamatorios, agentes blanqueadores, humectantes, y agentes para el crecimiento del cabello. En el caso de utilizar un liposoma como vehículo para un sistema de administración de fármacos, el fármaco hidrosoluble es preferentemente un compuesto de bajo peso molecular desde el punto de vista de la estabilidad.

20 Entre los ejemplos específicos del fármaco hidrosoluble se incluyen agentes contra el cáncer como un agente contra el cáncer a base de antraciclina, como la doxorubicina, daunorrubicina o epirubicina, un agente contra el cáncer a base de cisplatino como el cisplatino u oxaliplatina, un agente contra el cáncer a base de taxano como paclitaxel o docetaxel, un agente contra el cáncer a base de alcaloides de la vinca como la vincristina o vinblastina, un agente contra el cáncer a base de bleomicina como la bleomicina, un agente contra el cáncer a base de sirolimus como el sirolimus y un antagonista metabólico como metotrexato, fluorouracilo, gemcitabina, citarabina o pemetrexed. Entre estos, es preferente un fármaco hidrosoluble, como doxorubicina, gemcitabina o pemetrexed.

25 El fármaco hidrosoluble encapsulado en el liposoma está presente en un estado disuelto en la fase acuosa interna del liposoma. En este punto, en lo que se refiere al estado disuelto, se considera que está encapsulado como un estado disuelto en un caso donde la cantidad del fármaco cargado con respecto al volumen del liposoma está por debajo de la solubilidad de saturación del fármaco en la composición líquida de la fase interior del agua. Además, incluso cuando la cantidad del fármaco cargado está por encima de la solubilidad de saturación del fármaco, un caso en el que los cristales del fármaco no se observan con un microscopio electrónico de criotransmisión (Cryo-TEM) y los patrones de difracción atribuibles a la red cristalina no se observan a través de la medición de la difracción de rayos X (XRD) indica que se disuelve la mayor parte del fármaco debido a la aceleración de la disolución en un entorno fisicoquímico creado por la membrana lipídica, la incorporación parcial del fármaco en la membrana lipídica o similar, y se considera que está encapsulado en un estado disuelto. Por otra parte, una sustancia encapsulada a través de un método de carga en el que se forma una sustancia sólida dentro del liposoma y se encapsula un fármaco no se está en estado disuelto ni siquiera cuando el fármaco es altamente hidrosoluble.

40 El fármaco hidrosoluble que se va a encapsular en un estado disuelto tiene preferentemente una solubilidad en agua de 1 mg/ml o más, y más preferentemente una solubilidad en agua de 10 mg/ml o más.

(Filtración estéril)

50 Con el fin de formular una solución acuosa que contenga liposomas, obtenida mediante el método para producir una composición de liposoma de acuerdo con la presente invención, en una composición farmacéutica, preferentemente se lleva a cabo una filtración estéril. Con respecto al método de filtración, es posible eliminar materiales no deseados de la solución acuosa que contiene liposomas utilizando una membrana de fibra hueca, una membrana de ósmosis inversa, un filtro de membrana o similar. En la presente invención, la solución acuosa que contiene liposomas se filtra preferentemente utilizando un filtro que tiene un tamaño de poro estéril (preferentemente un filtro estéril de 0,2 μm) aunque no existe una limitación particular. Normalmente, puede tener lugar la adsorción o agregación de liposomas en un filtro estéril en la etapa de filtración. Sin embargo, la presente invención presenta efectos inesperados como la escasa influencia en la pérdida de presión o similares cuando se realiza la filtración, ya que se obtienen liposomas que tienen un tamaño de partícula promedio específico y una distribución del tamaño de partícula uniforme.

60 Para evitar un efecto de deformación de los liposomas sobre el tamaño de partícula promedio, la etapa de filtración estéril y la etapa de llenado aséptico que se describen a continuación se llevan a cabo preferentemente a una temperatura inferior o igual a la temperatura de transición de fase de los lípidos que constituyen el liposoma. Por ejemplo, en el caso de que la temperatura de transición de fase del lípido sea en torno a 50 °C, la etapa de filtración estéril y la etapa de llenado aséptico descrita a continuación se llevan a cabo a una temperatura de

aproximadamente 0 °C a 40 °C y más específicamente aproximadamente 5 °C a 30 °C.

(Rellenado aséptico)

- 5 La solución acuosa que contiene los liposomas obtenidos después de la filtración estéril se rellena preferentemente asépticamente para aplicaciones médicas. Se pueden aplicar métodos conocidos para el relleno aséptico. Se puede preparar una composición de liposoma adecuada para aplicaciones médicas rellenando asépticamente la solución acuosa que contiene liposomas en un envase.
- 10 Se puede agregar apropiadamente un disolvente acuoso, un aditivo o similar a la solución acuosa que contiene los liposomas obtenidos según la presente invención para preparar así una composición farmacéutica que contiene liposomas. En relación con la vía de administración, la composición farmacéutica también puede contener al menos uno de entre un agente de tonicidad, un estabilizador, un antioxidante o un agente de ajuste del pH que sea farmacéuticamente aceptable.
- 15 El agente de tonicidad no está particularmente limitado y entre los ejemplos de los mismos se incluyen sales inorgánicas tales como cloruro sódico, cloruro potásico, hidrógeno fosfato sódico, dihidrógeno fosfato sódico y dihidrógeno fosfato potásico; polioles como glicerol, manitol y sorbitol; y azúcares como la glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa.
- 20 El estabilizador no está particularmente limitado y entre los ejemplos del mismo se incluyen azúcares como glicerol, manitol, sorbitol, lactosa y sacarosa.
- 25 El antioxidante no está particularmente limitado y entre los ejemplos del mismo se incluyen ácido ascórbico, ácido úrico, homólogos de tocoferol (por ejemplo, vitamina E, cuatro isómeros de tocoferol α , β , γ y δ), cisteína y EDTA. Los estabilizadores y antioxidantes se pueden utilizar respectivamente solos o combinando dos o más de los mismos.
- 30 Entre los ejemplos del agente de ajuste del pH se incluyen hidróxido sódico, ácido cítrico, ácido acético, trietanolamina, hidrógeno fosfato sódico, dihidrógeno fosfato sódico y dihidrógeno fosfato potásico.
- 35 La composición farmacéutica puede contener un disolvente orgánico, colágeno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, un polímero carboxivinilo, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilato sódico, alginato sódico, dextrano hidrosoluble, carboximetil almidón sódico, pectina, metil celulosa, etil celulosa, goma xantana, goma arábica, caseína, gelatina, agar, diglicerol, propilen glicol, polietilen glicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina de suero humano (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, PBS, cloruro sódico, azúcares, un polímero biodegradable, un medio sin suero, siendo cada uno de ellos farmacéuticamente aceptable, o un aditivo que es aceptable como un aditivo farmacéutico.
- 40 En particular, en el contexto de la presente invención, la composición farmacéutica contiene preferentemente sulfato de amonio, L-histidina, sacarosa purificada, hidróxido sódico, ácido clorhídrico, o similares.
- 45 El envase en el que se carga una composición farmacéutica no está particularmente limitado y, preferentemente, está fabricado con un material que tiene baja permeabilidad al oxígeno. Entre los ejemplos del envase se incluyen un envase de plástico, un envase de vidrio y una bolsa hecha de una película laminada con papel de aluminio, una película con depósito de aluminio, una película con depósito de óxido de aluminio, una película con depósito de óxido de silicio, un poli(alcohol vinílico), un copolímero de etileno-alcohol vinílico, un poli (tereftalato de etileno), un poli(naftalato de etileno), un cloruro de polivinilideno, o similares, como una capa barrera a los gases. Si es necesario, puede blindarse contra la luz adoptando una bolsa o similar utilizando un vidrio coloreado, papel de aluminio, una película con depósito de aluminio o similar.
- 50 Para evitar la oxidación por el oxígeno presente en el envase en el que se carga una composición farmacéutica en el espacio del envase, preferentemente, se reemplazan los gases en el espacio del envase y el fármaco por gases inertes como nitrógeno. Por ejemplo se forman burbujas en una solución de inyección con nitrógeno, gracias a lo cual se puede llevar a cabo la carga de la solución para inyección en un envase bajo una atmósfera de nitrógeno.
- 55 El método de administración de una composición farmacéutica es preferentemente una administración parenteral. Por ejemplo, puede seleccionarse entre inyecciones intravenosas como goteo intravenoso, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, inyección intraocular o inyección intratecal. El método de administración específico de una composición de liposoma incluye, por ejemplo, una jeringa y la administración por goteo intravenoso.
- 60 La dosis de un fármaco contenido en la composición farmacéutica se selecciona generalmente de un intervalo de 0,01 mg a 100 mg/kg de peso corporal/día. Sin embargo, la composición de liposomas de la presente invención no se limita a dicha dosis.
- 65

Ejemplos

A partir de aquí, se describirá la presente invención en detalle haciendo referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no queda limitada con dichos ejemplos. La relación de mezcla en la composición de disolvente se refiere a una relación en volumen. Por ejemplo, "etanol/acetato de etilo = 90/10" se refiere a etanol al 90 %/acetato de etilo al 10 % en una relación de volumen.

(Ejemplo 1)

10 a) Preparación del equipo de emulsificación

Se preparó el equipo de emulsificación combinando una ruta de circulación (la capacidad de la ruta de circulación es de 6 l) que incluyó un aparato de emulsificación de tipo generador de flujo de chorro intermitente con una parte rotatoria con un diámetro exterior de hendidura de 90 mm, un tanque de emulsificación con una capacidad de agua completa de 26 l, un tanque de desespumado y una bomba de circulación (bomba de diafragma de actuación directa) tal como se muestra en la FIG. 1. La capacidad de la ruta de circulación es la capacidad de toda la ruta de circulación, incluyendo el tanque de desespumado.

20 b) Preparación de la fase oleosa

Fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol y sal sódica de N-(carbonilmetoxipolietilen glicol 2000) -1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (en adelante denominada DSPE-PEG) se mezclaron a una relación molar de 57/38/5 y, a continuación, se añadió un disolvente orgánico (etanol/acetato de etilo = 75/25), seguido de calentamiento a 70 °C y disolución de los lípidos para preparar una fase oleosa. En este punto, se preparó la fase oleosa de tal modo que la concentración de lípidos en la fase oleosa fue de 70 mmoles/l.

c) Preparación de la fase acuosa

Se prepararon 177 mmoles/l de una solución acuosa de sulfato de amonio y, a continuación, se preparó como una fase acuosa en un tanque de emulsificación.

d) Emulsificación

Se calentó a 70 °C la fase acuosa preparada en c). Se añadió la fase oleosa preparada en b) de modo que se obtuvo la relación de volumen de fase acuosa/fase oleosa = 8/3 al mismo tiempo que el aparato de emulsificación funcionaba a una velocidad circunferencial de 15 m/s y la bomba de circulación funcionaba a un caudal de 20 L/min. La cantidad total de líquido después de la adición fue de 32 l. Una vez que el tanque de emulsificación se hidrató completamente, los 6 l desbordados circularon a través de la ruta de circulación, incluyendo el tanque de desespumado. Se ajustó la presión interna del tanque de emulsificación a 30 kPa. En este estado, se incrementó la rotación del aparato de emulsificación a una velocidad circunferencial de 30 m/s, seguido de agitación durante 30 minutos.

e) Desolvatación

Se eliminó el disolvente orgánico ventilando aire al mismo tiempo que se calentaba la emulsión preparada en d) a una temperatura mayor o igual a la temperatura de transición de fase de los lípidos, produciendo así liposomas.

(Ejemplo 2)

Se preparó un liposoma líquido de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la bomba de circulación funcionó a un caudal de 10 l/min.

(Ejemplo 3)

Se preparó un liposoma líquido de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la bomba de circulación funcionó a un caudal de 5 L/min.

(Ejemplo comparativo 1)

Se preparó un liposoma líquido de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la bomba de circulación funcionó a un caudal de 2,5 l/min.

(Ejemplo comparativo 2)

Se preparó un liposoma líquido de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la capacidad del tanque de emulsificación se ajustó a 16 l, la capacidad de la ruta de circulación se ajustó a 16 l y la bomba de circulación se

hizo funcionar a un caudal de 12 l/min.

(Ejemplo 4)

- 5 Se preparó un liposoma líquido de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la capacidad del tanque de emulsificación se ajustó a 16 l, la capacidad de la ruta de circulación se ajustó a 16 l y la bomba de circulación se hizo funcionar a un caudal de 24 l/min.

(Ejemplo 5)

- 10 Se preparó un líquido de liposomas de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la capacidad del tanque de emulsificación se ajustó a 6 l, la capacidad de la ruta de circulación se ajustó a 26 l y la bomba de circulación se hizo funcionar a un caudal de 32 l/min.

15 (Ejemplo 6)

Se preparó un líquido de liposomas de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la presión interna del tanque de emulsificación se ajustó a una presión atmosférica y la bomba de circulación se hizo funcionar a un caudal de 10 l/min.

20 (Ejemplo 7)

- 25 Se preparó un liposoma líquido de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la capacidad del tanque de emulsificación se ajustó a 2,8 l, la capacidad de la ruta de circulación se ajustó a 11,2 l, el volumen de líquido en el tanque de emulsificación se ajustó a 80 % en volumen y la bomba de circulación funcionó a un caudal de 14 l/min.

(Ejemplo 8)

- 30 Se preparó un liposoma líquido de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que la bomba de circulación se cambió a una bomba rotatoria.

(Medición del tamaño de partícula promedio de los liposomas según método de dispersión dinámica de la luz)

- 35 Se diluyeron 40 veces los líquidos de liposomas preparados en los Ejemplos 1 a 7 y el Ejemplo comparativo 1 con agua pura para obtener muestras para medir un tamaño de partícula promedio. Se midió el tamaño de partícula promedio de las muestras para medir un tamaño de partícula promedio por lo que respecta tamaño de partícula promedio en volumen utilizando un analizador de tamaño de partícula FPAR-1000AS (fabricado por Otsuka Electronics Co., Ltd.). Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 1. Las calificaciones se dieron de la siguiente manera: A: tamaño de partícula promedio de 55 nm o menos; B: tamaño de partícula promedio de 56 nm o más y 60 nm o menos; y C: tamaño de partícula promedio de 61 nm o más.
- 40

Tabla 1

	I Tanque de emulsificación	I ruta de circulación	I total	Volumen de líquido en tanque emulsificación (relación de volumen)	Presión interna de tanque de emulsificación	Caudal de circulación l/min	Período de circulación	Relación ruta de circulación/ total	Tamaño partícula promedio	Evaluación
Ejemplo 1	26	6	32	Nivel de agua completo (100%)	30 kPa	20	0,30	0,19	53	A
Ejemplo 2	26	6	32	Nivel de agua completo (100%)	30 kPa	10	0,60	0,19	55	A
Ejemplo 3	26	6	32	Nivel de agua completo (100%)	30 kPa	5	1,20	0,19	57	B
Ejemplo Comparativo 1	26	6	32	Nivel de agua completo (100%)	30 kPa	2,5	2,40	0,19	66	C
Ejemplo Comparativo 2	16	16	32	Nivel de agua completo (100%)	30 kPa	12	1,33	0,50	65	C
Ejemplo 4	16	16	32	Nivel de agua completo (100%)	30 kPa	24	0,67	0,50	56	B
Ejemplo 5	6	26	32	Nivel de agua completo (100%)	30 kPa	32	0,81	0,81	58	B
Ejemplo 6	26	6	32	Nivel de agua completo (100%)	Presión atmosférica	10	0,60	0,19	57	B
Ejemplo 7	20,8	11,2	32	Nivel de agua completo (100%)	30 kPa	14	0,80	0,35	60	B
Ejemplo 8	26	6	32	Nivel de agua completo (100%)	30 kPa	20	0,30	0,19	53	A

5 Tal como puede apreciarse en la Tabla 1, en los Ejemplos 1 a 7, pudo alcanzarse un tamaño de partícula promedio pequeño, que satisface las condiciones en las cuales la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del tanque de emulsificación y la ruta de circulación es 0,4 o menos y/o el tiempo de circulación (el tiempo requerido para que el líquido retorne al tanque de emulsificación después de descargarlo) está en el plazo de 2,0 minutos, mientras que en el Ejemplo comparativo 1 no se pudo alcanzar un tamaño de partícula promedio pequeño, que satisface las condiciones anteriores.

(Preparación de liposomas encapsulados con fármacos)

10 Con respecto a los liposomas encapsulados que no son fármacos preparados en el Ejemplo 1, la concentración de lípidos del liposoma líquido se concentró en un intervalo de 120 a 150 mmoles/l por filtración de flujo tangencial, al mismo tiempo que se reemplazó la fase acuosa externa del liposoma por una solución acuosa de cloruro sódico al 0,09 % en masa. Se añadió una solución de fármaco preparada por calentamiento para disolver clorhidrato de gemcitabina en una solución tampón de fosfato. Se calentó la mezcla a aproximadamente 70 °C durante 30 minutos y después se enfrió a temperatura ambiente. A continuación, se filtró la mezcla de liposomas de fármaco a través de un filtro de esterilización que tenía un tamaño de poro de 0,2 µm. Asimismo, se purificó la mezcla de liposomas de fármaco por diálisis frente a una solución acuosa de sacarosa 9,4 % en mas/10 mmoles/l-histidina por filtración de flujo tangencial para eliminar la gemcitabina no encapsulada. Esto fue seguido de filtración de liposomas a través de un filtro de esterilización que tenía un tamaño de poro de 0,2 µm para obtener una solución de liposomas encapsulados con gemcitabina estériles que tenían un tamaño de partícula promedio de 65 nm. De acuerdo con la presente invención, se confirmó que se pueden producir liposomas que tienen un pico de dispersión único y un tamaño de partícula promedio pequeño de 100 nm o menos que se pueden emplear para aplicaciones médicas. Aunque el tamaño de partícula promedio de los liposomas descrito en la Evaluación de la Tabla 1 se mide para los liposomas vacíos, si el tamaño de partícula promedio de los liposomas encapsulados con fármaco es de 100 nm o menos, dichos liposomas se pueden utilizar para uso médico, siendo el tamaño de partícula promedio de 65 nm un buen resultado.

Susceptibilidad de aplicación industrial

30 De acuerdo con la presente invención, los liposomas miniaturizados pueden producirse en una producción a gran escala. Los liposomas producidos según la presente invención se pueden aplicar a medicinas, cosméticos, alimentos o similares y son particularmente útiles para aplicaciones médicas.

Explicación de las referencias

35 1: primer tanque
2: ruta de circulación
3: aparato de emulsificación
40 4: segundo tanque
5: bomba

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un liposoma, que comprende:
5 una etapa de agitar una mezcla que contiene una fase oleosa en la que se disuelve al menos un lípido en un disolvente orgánico y una fase acuosa en un primer tanque de un aparato que tiene el primer tanque y una ruta de circulación, en donde
- 10 (i) el primer tanque se llena con la mezcla, y la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del tanque y la ruta de circulación es de 0,4 o menos y/o
(ii) el tiempo requerido para que la mezcla retorne al primer tanque después de descargarse está dentro del plazo de 2,0 minutos.
2. El método para producir un liposoma de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el aparato tiene un segundo tanque en el centro de la ruta de circulación.
- 15 3. El método para producir un liposoma de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el interior del segundo tanque tiene vapor saturado.
4. El método para producir un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se somete la mezcla en el primer tanque a una carga de presión.
- 20 5. El método para producir un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde se hace circular la mezcla en el primer tanque y la ruta de circulación utilizando una bomba de diafragma o una bomba rotatoria.
- 25 6. El método para producir un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se agita la mezcla en el primer tanque utilizando un aparato de emulsificación de tipo generador de flujo de chorro intermitente.
- 30 7. El método para producir un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el lípido incluye un lípido modificado con polietilén glicol.
8. El método para producir un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el tamaño de partícula promedio de los liposomas que se producen es de 60 nm o menos.
- 35 9. El método para producir un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la capacidad del primer tanque es de 10 l, o más, y de 100 l, o menos.
- 40 10. Método para producir un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del tanque y la ruta de circulación es de 0,4 o menos y el tiempo requerido para que la mezcla retorne al primer tanque después de ser descargado está dentro del plazo de 2,0 minutos.
- 45 11. Un aparato para producir un liposoma, que comprende:
un primer tanque; y
una ruta de circulación,
donde la relación entre la capacidad de la ruta de circulación y la capacidad total del tanque y la ruta de
50 circulación es de 0,4 o menos.
12. El aparato para producir un liposoma de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además un segundo tanque en el centro de la ruta de circulación.
13. El aparato para producir un liposoma de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, que comprende además una
55 bomba en el centro de la ruta de circulación.
14. El aparato para producir un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde la bomba es una bomba de diafragma o una bomba rotatoria.
- 60 15. El aparato para producir un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que hay instalado en el primer tanque un aparato de emulsión de tipo generador de flujo de chorro intermitente.

FIG. 1

