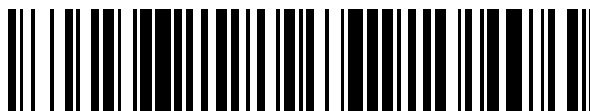


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 368**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61K 31/4745** (2006.01)  
**A61K 31/704** (2006.01)  
**A61K 47/26** (2006.01)  
**A61K 31/7072** (2006.01)  
**A61K 31/7068** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2012 PCT/US2012/060293**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13059133**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2012 E 12841616 (1)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2768484**

54 Título: **Liposomas liofilizados**

30 Prioridad:

**21.10.2011 US 201161550047 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.03.2020**

73 Titular/es:

**JAZZ PHARMACEUTICALS RESEARCH LLC  
(100.0%)  
3170 Porter Drive  
Palo Alto, CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**CABRAL-LILLY, DONNA;  
MAYER, LAWRENCE;  
TARDI, PAUL;  
WATKINS, DAVID y  
ZENG, YI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 750 368 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

Liposomas liofilizados

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a composiciones de liposomas liofilizados que contienen al menos dos agentes terapéuticos o de diagnóstico que pueden almacenarse durante periodos prolongados de tiempo y métodos para producir los mismos. En particular, la invención se refiere a liposomas liofilizados de bajo colesterol en un medio externo que comprende un crioprotector que tiene resistencia al congelamiento / descongelamiento y al daño por deshidratación de los liposomas, preservando así su tamaño e integridad.

**Antecedentes de la invención**

15 Los liposomas son vesículas cerradas que tienen al menos una bicapa lipídica que rodea un núcleo acuoso. El espacio intraliposomal y la o las capas lipídicas pueden atrapar una amplia variedad de sustancias, incluidos medicamentos, cosméticos, reactivos de diagnóstico, material genético y compuestos bioactivos. Dado que los lípidos no tóxicos actúan como la base de los liposomas, generalmente presentan baja toxicidad. La baja toxicidad, junto con la capacidad de los liposomas para aumentar la vida útil de la circulación plasmática de los agentes, da lugar a los liposomas como vehículos particularmente útiles para administrar agentes farmacéuticamente activos. En muchos casos, los fármacos administrados por liposomas dan como resultado una eficacia clínica superior combinada con una toxicidad reducida.

25 La aplicación práctica de las preparaciones liposomales como vehículos de administración de fármacos está limitada por la estabilidad química y física de la preparación. La comercialización requiere estabilidad a largo plazo tanto a nivel químico como físico. El uso de preparaciones congeladas o liofilizadas (lioilizadas) para evitar la descomposición del fármaco lábil y / o los componentes lipídicos proporciona alguna mejora en la estabilidad. Sin embargo, durante el proceso de liofilización, la formación de cristales de hielo puede conducir a la ruptura mecánica, agregación y fusión de liposomas (lo que resulta en un aumento del tamaño de los liposomas). Además, cuando los liposomas que contienen fármacos se liofilizan y luego se reconstituyen a temperatura ambiente, a menudo se producen cambios en la estructura de su (s) bicapa (s) que dan lugar a una fuga acelerada del fármaco.

35 Los intentos anteriores para preparar composiciones liposomales liofilizadas se han basado en liposomas convencionales que están típicamente en una fase líquida a temperatura corporal donde el movimiento de los lípidos es fluido y no controlado. Tales liposomas convencionales se dividen en dos categorías. Los primeros se mantienen en estado líquido porque comprenden lípidos en los que la temperatura cristalina de gel a líquido ( $T_c$ ) está por debajo de la temperatura corporal (es decir, estarán en la fase líquida a temperatura corporal). Estos liposomas se usan habitualmente en la técnica; sin embargo, la desventaja de ser fluido es la poca retención de fármacos para muchos agentes encapsulados.

40 El segundo tipo de liposomas convencionales nunca experimenta una transición de líquido a gel porque incluyen altas cantidades de agentes de rigidez de la membrana, como el colesterol (por ejemplo, 30-45 % en moles). El colesterol actúa para aumentar el grosor y la fluidez de la bicapa, al tiempo que disminuye la permeabilidad de la membrana, las interacciones proteicas y la desestabilización de las lipoproteínas del liposoma. Estas altas cantidades de colesterol se usan con mayor frecuencia en estudios liposomales e históricamente se ha enseñado que son necesarias para una adecuada estabilidad del suero y la retención de fármacos *in vivo*, aunque no todos los fármacos se pueden retener suficientemente. Ciertos fármacos exhiben mejor retención de fármacos tanto *in vitro* como *in vivo* en liposomas que no contienen sustancialmente colesterol. Véase, por ejemplo, Dos Santos, y col., Biochim. Biophys. Acta, (2002) 1561: 188-201.

50 Por otro lado, los liposomas en la fase de gel son más estables y exhiben una retención de fármaco mejorada. La presente invención aprovecha los liposomas que están en la fase de gel a temperatura corporal (es decir, la temperatura corporal está por debajo de la  $T_c$  de los liposomas). Los liposomas en fase de gel se pueden preparar con varios lípidos; sin embargo, aquellos hechos con lípidos fosfatidil de cadena lateral de acilo más saturados, tales como PC de soja hidrogenada, dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) o diestearoil fosfatidilcolina (DSPC), deben tener menos del 30 % de colesterol para lograr fases de gel a temperatura corporal. Un ejemplo de liposomas convencionales que no exhiben fases de gel a temperatura corporal son los que están hechos de fosfatidilcolina de huevo (EPC) que tienen fugas significativas.

60 Los intentos anteriores para preparar composiciones liposomales liofilizadas usando liposomas convencionales han implicado liposomas vacíos o liposomas que contienen un solo agente. Pueden emplear un crioprotector, típicamente un sacárido, tanto dentro como fuera de los liposomas, o un gran gradiente osmótico a través de la membrana liposomal.

65 por ejemplo, los crioprotectores se usaron para proteger contra el daño por congelación / descongelación de los liposomas EPC 'líquidos' que encapsulan un solo agente cuando están presentes en cantidades suficientes tanto en

el interior como en el exterior de los liposomas, idealmente cuando estas cantidades son iguales. Véase, por ejemplo, La patente de Estados Unidos Nos. 5,077,056 y 4,883,665. La presencia de 1 % -10 % de crioprotector en el medio liposomal interno conserva una formulación de doxorubicina encapsulada en liposoma EPC liofilizada donde, preferiblemente, la osmolaridad interna está cerca de la osmolaridad fisiológica. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 4,927,571. Se ha demostrado que si no se incluye un crioprotector en el interior de los liposomas, se produce una pérdida de la integridad de los liposomas tras la reconstitución, particularmente con respecto a la retención de un agente encapsulado. Como se describe, "la prevención de fugas requiere que el azúcar esté presente tanto dentro como fuera del liposoma" (Lowery, M. (junio de 2002) *Drug Development and Delivery*, vol. 2, no. 4).

En un caso, también se ha informado la protección contra la agregación y fusión de vesículas, así como contra la pérdida de un fármaco atrapado, para liposomas de PC de soja hidrogenada: colesterol: DSPE-mPEG (relación molar 51: 44: 5) donde la preparación de liposomas contiene 44 % en moles de colesterol, así como un crioprotector y una alta concentración de sal en el medio externo. La presencia de 44 % de colesterol significa que los liposomas estarán en la fase líquida a la temperatura corporal o por debajo de ella. Además, el efecto protector solo se realiza si existe un gran gradiente osmótico a través de la membrana de manera que la osmolaridad del liposoma externo sea significativamente mayor que la osmolaridad interna. Véase, por ejemplo, el documento WO01/05372.

Los crioprotectores unidos a la membrana también mejoran aún más la resistencia a la congelación y liofilización de estos liposomas en fase no gelificada. En particular, se ha informado que los azúcares injertados en EPC o EPC: colesterol (relación molar 1: 1) en las superficies de la membrana liposomal a través de conectores oligo (óxido de etileno) que consisten en una a tres unidades repetitivas son crioprotectores para los liposomas que contienen una sonda fluorescente. Véase, por ejemplo, Bendas y col., *Eur. J. Pharm. Sci.* (1996) 4: 211-222; Goodrich y col., *Biochem.* (1991) 30: 5313-5318; y Patente de Estados Unidos n.º 4,915,951. Baldeschwieler y col. informaron que en ausencia del grupo de azúcar terminal, los liposomas preparados con el enlazador de óxido de oligoetileno en sí mismos no pudieron proteger contra la fusión posterior a la congelación: Patente de Estados Unidos n.º 4,915,951.

La trehalosa en el medio externo de una formulación de liposomas de PC que encapsula un único agente proporciona resistencia a la agregación y fusión de liposomas: Patente de Estados Unidos n.º 6,319,517. Otros métodos para producir liposomas pequeños estabilizados contra la agregación requieren la formación de PC vacíos: liposomas de colesterol (relación molar 1: 1) a los que se agrega una solución de azúcar y un solo reactivo y luego se secan. Durante el proceso de secado, un porcentaje del reactivo queda atrapado dentro del liposoma. Según se informa, estos liposomas son más estables tras el almacenamiento que en ausencia de azúcar. Véase, por ejemplo, el documento WO99/65465.

Como se ha indicado anteriormente, la mayoría de las técnicas anteriores para la liofilización se centraron en la liofilización de liposomas vacíos o liposomas que encapsulan un único agente. La liofilización con retención de integridad es más difícil cuando se encapsulan dos o más agentes, especialmente si los agentes difieren en sus características de solubilidad. La encapsulación de dos o más agentes a menudo es útil, ya que muchas enfermedades potencialmente mortales, como el cáncer, están influenciadas por múltiples mecanismos moleculares y, debido a esta complejidad, el logro de la cura con un solo agente se ha encontrado con un éxito limitado. Por lo tanto, casi todos los tratamientos contra el cáncer implican combinaciones de más de un agente terapéutico. Esto también es cierto para el tratamiento de otras afecciones, incluidas las infecciones y las enfermedades crónicas.

La publicación PCT WO03/041681 y el documento US 2011/0002982 informan que los liposomas en fase de gel con temperaturas de transición de 38 °C o más pueden prepararse usando lípidos fosfatidil saturados, como DPPC y DSPC, y cantidades más bajas (0-20 %) de colesterol si al menos 1 % en moles de fosfatidilinositol (PI ) o fosfatidilglicerol (PG) están incluidos en las composiciones. Estos liposomas, cuando contienen combinaciones de irinotecán encapsulado y floxuridina (FUDR), se mostraron estables a la congelación a -20 °C. La congelación simple es generalmente menos dura y menos destructiva para la integridad de los liposomas que la liofilización.

El uso de liposomas como vehículos de suministro para estas combinaciones es ventajoso, particularmente si los liposomas incluyen, y son capaces de mantener, proporciones de los agentes que no son antagonistas. Este enfoque general se describe en detalle en la patente de Estados Unidos 7,850,990. La patente anterior enseña cómo determinar las relaciones no antagonistas o sinérgicas de varios agentes terapéuticos, incluidos los agentes antineoplásicos que mantienen tal no antagonismo o sinergia en un amplio intervalo de concentraciones. La patente anterior también enseña que es esencial administrar los fármacos en la proporción administrada y mantener esa proporción permitiendo que los vehículos de distribución controlen la farmacocinética. En la patente anterior se ejemplifican los liposomas que contienen y mantienen la proporción de relaciones no antagonistas o sinérgicas de dos o más agentes terapéuticos, incluidos irinotecán y FUDR. Dichas combinaciones encapsuladas en liposomas se beneficiarían de las ventajas de almacenarse en forma liofilizada si, tras la reconstitución, se mantienen la integridad de los liposomas y la concentración de los agentes y sus proporciones. Una combinación particularmente útil de citarabina y daunorrubicina encapsulada en liposomas se describe en La patente de Estados Unidos 8,022,279.

El uso de estas combinaciones en protocolos terapéuticos con resultados sorprendentemente buenos se describe en los documentos WO2007/050784 y WO2008/101214. Las formulaciones adicionales con encapsulación liposomal de

las opciones de administración de fármacos deseadas se describen tanto en los documentos WO2009/097011 y WO2009/070761, como en el documento WO2010/043050. Estas formulaciones son simplemente ejemplos de composiciones útiles en las que dos o más agentes terapéuticos están contenidos en liposomas para la administración al paciente.

5 Como se ha descrito anteriormente, la preparación de composiciones estables liofilizadas de liposomas en general que mantienen su integridad tras la reconstitución ha sido difícil e impredecible. Obtener tales composiciones liposomales estables para combinaciones de dos o más agentes es aún más desafiante. Por lo tanto, el éxito de la presente invención en la obtención de liposomas liofilizados en donde los liposomas contienen dos o más agentes terapéuticos o de diagnóstico, y en donde mantienen su integridad tras la reconstitución, es un logro notable.

### Divulgación de la invención

15 Se ha informado constantemente que se requiere un crioprotector tanto dentro como fuera de los liposomas para mantener la integridad de los liposomas tras la reconstitución después de la liofilización, particularmente para asegurar la retención de un agente encapsulado. Los presentes inventores han identificado liposomas estables que no requieren crioprotector interno para la liofilización exitosa de liposomas que encapsulan no solo uno, sino dos o más agentes activos.

20 La presente invención se refiere a preparaciones liposomales de fase gel liofilizadas exitosas que contienen más de un agente terapéutico y / o diagnóstico y no crioprotector interno. Por lo tanto, en un aspecto, la invención se dirige a una composición liposomal en fase de gel liofilizada que comprende:

25 (a) liposomas en fase de gel que exhiben una temperatura de fase de fusión ( $T_c$ ) de al menos 37 °C, en donde la membrana del liposoma de dichos liposomas comprende no más de 20 % en moles de colesterol y comprende al menos 1 % en moles de un fosfatidilglicerol (PG) o un fosfatidilinositol (PI) o ambos, y en donde al menos dos los agentes terapéuticos y / o diagnósticos están asociados de manera estable con dichos liposomas; y

30 (b) un crioprotector externo a dichos liposomas;

en donde dichos liposomas contienen sustancialmente ningún crioprotector interno, y

35 en el que, cuando dicha composición se reconstituye en un vehículo farmacéutico, el diámetro medio de los liposomas se mantiene por lo que dicho diámetro medio no aumenta más del 50 % en una base ponderada en volumen en comparación con dicha composición antes de la liofilización, y dichos agentes se retienen en los liposomas

40 La integridad de los liposomas se mide así como el porcentaje de agentes encapsulados retenidos después de la reconstitución de los liposomas. Un parámetro adicional utilizado como criterio para una liofilización satisfactoria es el cambio mínimo en la distribución del tamaño. Una realización particularmente importante es aquella en la que los agentes se encapsulan dentro de los liposomas en una proporción definida y en la que la proporción de estos agentes se mantiene cuando las formas liofilizadas se reconstituyen.

45 Las condiciones típicas para lograr este resultado incluyen el uso de liposomas en fase de gel con temperaturas de transición cristalina de gel a líquido ( $T_c$ ) que son al menos a temperatura ambiente y pueden ser iguales o superiores a la temperatura del cuerpo humano. Se considera que la temperatura corporal es de aproximadamente 37 °C. Los liposomas son liposomas bajos en colesterol que se estabilizan con fosfatidilglicerol y / o fosfoinositol. Los liposomas no contienen sustancialmente ningún crioprotector interno, pero contienen crioprotector externo en sus superficies y, por lo tanto, se liofilizan en presencia de un medio que contiene crioprotector. El término "sustancialmente sin crioprotector interno" pretende incluir liposomas que no comprenden crioprotector interno, así como liposomas que contienen una cantidad de crioprotector que no afecta el proceso de congelación y / o liofilización de dichos liposomas (es decir, 125 mM crioprotector o menos, es decir, una cantidad "inactiva"). Por lo tanto, "sustancialmente sin crioprotector interno" se define como de aproximadamente 0-125 mM de crioprotector dentro de los liposomas.

50 Es importante tener en cuenta que prevenir la fuga de fármacos después del proceso de liofilización es significativamente más difícil que la retención del tamaño de los liposomas. Como se mencionó anteriormente, la retención de fármacos después de la liofilización se ha logrado históricamente mediante el uso de un crioprotector tanto en el interior como en el exterior de los liposomas.

60 Por lo tanto, en una realización, los liposomas tienen temperaturas de transición cristalina de gel a líquido ( $T_c$ ) de la membrana a más de 37 °C de modo que, al menos a temperatura ambiente, por ejemplo, 25° C, la membrana lipídica es suficientemente gelatinosa para ayudar a retener los medicamentos. Las composiciones permiten la retención de agentes encapsulados y una agregación y fusión reducidas tras la liofilización y la reconstitución, proporcionando de ese modo composiciones utilizables con una vida útil prolongada. La protección mejorada del proceso de liofilización es independiente del potencial osmótico. Estos liposomas mantienen su distribución de

tamaños y perfiles de encapsulación de fármacos durante largos períodos de tiempo en condiciones farmacéuticamente relevantes.

Por lo tanto, los métodos para preparar las composiciones de liposomas liofilizados pueden incluir un crioprotector externo a los liposomas a una concentración seleccionada en la que la membrana del liposoma antes del congelamiento y la liofilización está por debajo de su temperatura de transición de fase  $T_c$ . Preferiblemente, los liposomas se congelan a una temperatura que está por debajo de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de la solución que comprende los liposomas con el fármaco encapsulado, así como el medio extraliposomal que contiene el crioprotector.

La invención también se dirige, en otros aspectos, a métodos para preparar liposomas liofilizados que contienen dos o más agentes terapéuticos y / o diagnósticos de acuerdo con las realizaciones expuestas anteriormente, a métodos para reconstituir dichas composiciones liofilizadas, y a la composición liposómica reconstituida en un portador farmacéutico para su uso en el tratamiento de animales afectados, susceptibles o sospechosos de estar afectados por un trastorno (por ejemplo, cáncer).

### Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra un perfil de tamaño de partícula de liposomas CPX-1 antes de congelar.

La **Figura 2** muestra un perfil de tamaño de partícula de liposomas de CPX-1 reconstituidos inmediatamente después de congelar, liofilizar y reconstituir.

La **Figura 3** muestra un perfil de tamaño de partícula de liposomas de CPX-1 reconstituidos 1 mes después del almacenamiento.

Las **Figuras 4A-4C** muestran perfiles de tamaño de partícula de liposomas de CPX-1 reconstituidos 6 meses después del almacenamiento.

### Modos para llevar a cabo la invención

La invención proporciona, por primera vez, composiciones liposomales liofilizadas en fase de gel que contienen dos o más agentes terapéuticos y / o diagnósticos de manera que las características y propiedades de la composición liofilizada reconstituida coinciden esencialmente con las de la composición antes de la liofilización. Estas características incluyen el diámetro medio y el contenido de los liposomas y también pueden incluir la distribución del tamaño de los liposomas. El contenido de los liposomas se refiere a la retención de los agentes; en algunas realizaciones, la proporción de los agentes también se retiene.

Aunque los liposomas contienen agentes terapéuticos y / o diagnósticos, en la presente solicitud, a veces se usan "fármacos" como abreviatura para designarlos.

Los liposomas en fase de gel comprenden una o más bicapas lipídicas que encierran un compartimento interno. Estos liposomas pueden ser vesículas bilamelares o unilamelares. Los liposomas unilamelares (también conocidos como vesículas unilamelares o "ULV") encierran un único compartimento acuoso interno y se clasifican como vesículas unilamelares pequeñas (VUP) o vesículas unilamelares grandes (LUV). El tamaño de LUV y VUP varía de aproximadamente 50 a 500 nm y de 20 a 50 nm, respectivamente. Los liposomas bilamelares tienen dos membranas lipídicas en las que la membrana interna rodea un único compartimento acuoso interno y la segunda membrana externa más grande rodea la membrana interna creando así un segundo compartimento acuoso interno.

El mantenimiento de la distribución de tamaños de los liposomas en fase de gel puede evaluarse experimentalmente obteniendo perfiles de tamaño de partícula tales como los expuestos en las Figuras 1-4 de la presente memoria. La distribución del tamaño determinada por dispersión de luz cuasielástica se presenta típicamente como un histograma que muestra el diámetro medio de los liposomas. Las medidas de distribución de tamaño significativas más comúnmente utilizadas en la técnica son D10, D90, D99 o una desviación estándar o índice de polidispersidad. Los valores "D99" significan que el 99 % de los liposomas son menores que un tamaño referenciado o más que un tamaño referenciado. Esto es particularmente útil si, por ejemplo, es importante excluir un tamaño superior o inferior. por ejemplo, en ciertas realizaciones es deseable asegurar que no estén presentes liposomas de más de 200 nm de diámetro medio.

Un ejemplo específico que tiene un valor D99 de 178 nm se utiliza para ilustrar. Un valor D99 que mide 178 nm (como se ve en la Tabla 1 del Ejemplo 2) asegura que al menos el 99 % de la población de liposomas sea inferior a 178 nm. Los valores D10 y D90 para diámetros, también de uso común, son aquellos en los que no más del 10 % de la población es más pequeña que un tamaño mínimo de referencia (es decir D10) y para D90, donde el 90 % de la población está en o por debajo de un límite de tamaño de referencia superior. por ejemplo, como se ve en los lotes 1 y 2, el valor D10 es de 68 nm, de modo que no más del 10 % de la población de liposomas es inferior a 68 nm. El valor D 90 muestra que el 90 % de la población está a 135 o 137 nm o menos para los lotes 1 y 2, respectivamente.

El mantenimiento de la distribución del tamaño de los liposomas después de la liofilización y la reconstitución se define en el presente documento como se demuestra demostrando que el referente el valor de un valor D seleccionado cambia no más del 50 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % tras la reconstitución en comparación con su valor antes de la liofilización. Los valores D seleccionados pueden ser 99, 98, 94 y enteros intermedios a 90 o D10.

Una característica de los liposomas liofilizados se relaciona con el diámetro medio de los liposomas en la composición. El diámetro medio de una composición liposomal se mantiene en la reconstitución cuando el diámetro medio de los liposomas no aumenta más del 50 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % sobre una base ponderada por volumen después de la liofilización y tras la reconstitución en función del diámetro antes de la liofilización. Un valor concomitante, como un aumento del 10 % en el diámetro medio de los liposomas junto con un aumento del 10 % en el referente para D90 (u otro valor de D como los enumerados anteriormente) es una medida para asegurar que la distribución del tamaño de los liposomas no ha cambiado. La naturaleza general de la distribución también se puede evaluar preferiblemente sobre una base ponderada por volumen, como se muestra en las Figuras 1-4.

Con más detalle, una composición de liposomas contiene una gama de tamaños que generalmente siguen una curva gaussiana. El diámetro medio de los liposomas puede aumentar en no más de aproximadamente 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % desde su tamaño original tras la reconstitución después de la liofilización. y reconstitución. por ejemplo, se consideraría que una muestra de liposomas cuyo diámetro medio es de 90 nm resiste los efectos de la liofilización si, tras la reconstitución, el diámetro medio no es más de un 30 % mayor. es decir, aproximadamente 117 nm. Los aumentos de tamaño mayores que estos sugieren que se ha producido la agregación y fusión de los liposomas. Se puede emplear una técnica de medición suficientemente sensible para medir los cambios en la distribución del tamaño o el diámetro medio para que se puedan medir cambios de menos del 10 %.

Otro criterio para la preservación de la integridad es la retención de los agentes encapsulados. A diferencia del diámetro medio, la distribución del tamaño y la proporción del fármaco, que se evalúan en relación con los valores previos a la liofilización, la retención del fármaco se evalúa en relación con el fármaco total *per se* después de la reconstitución es decir, basado en el fármaco total en la composición liofilizada. El porcentaje de fármaco encapsulado dentro de los liposomas o el porcentaje de fármaco en el medio externo fuera de los liposomas ( % "sin encapsular") son relativos a la cantidad total de fármaco en la composición. En una realización, al menos aproximadamente el 75 % de los agentes encapsulados se retienen como encapsulados después de la liofilización y tras la reconstitución. Al menos aproximadamente el 85 % de cada uno puede retenerse como encapsulado y / o al menos aproximadamente el 90 %, o el 95 %. De manera similar, esto puede medirse por la cantidad de fármaco sin encapsular en los medios circundantes que no debe ser superior al 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de las cantidades originales encapsuladas tras la reconstitución de los liposomas liofilizados.

La proporción de agentes terapéuticos y / o diagnósticos encapsulados se mantiene en la reconstitución si la proporción no varía en más del 20 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % de la proporción en la precomposición liofilizada en sí. Las relaciones se expresan como relaciones molares.

En una realización, el diámetro medio de los liposomas después de la liofilización y tras la reconstitución de dichos liposomas aumentará en no más del 25 % en comparación con dicho valor medido antes de la liofilización. En otra realización, el diámetro medio de los liposomas después de la liofilización y tras la reconstitución de dichos liposomas cambia en no más del 15 % en comparación con dicho valor medido antes de la liofilización. En otras realizaciones más, el diámetro medio de los liposomas después de la liofilización y tras la reconstitución de dichos liposomas cambia en no más del 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % en comparación con dicho valor medido antes de liofilización

En algunas realizaciones, el porcentaje de fármaco no encapsulado no es más del 25 % del encapsulado originalmente tras la reconstitución de dichos liposomas. En otras realizaciones, el porcentaje de fármaco no encapsulado no es más del 15 % del encapsulado originalmente tras la reconstitución de dichos liposomas. En otras realizaciones, el porcentaje de fármaco no encapsulado no es más del 10 %, o no es más del 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % del encapsulado originalmente tras la reconstitución de dichos liposomas.

Dicho de otra manera, en algunas realizaciones, el porcentaje de los fármacos encapsulados retenidos no es inferior al 75 % tras la reconstitución de dichos liposomas. En otras realizaciones, el porcentaje de cada fármaco encapsulado no es inferior al 85 % o 90 % o 95 % tras la reconstitución de dichos liposomas.

También se incluyen combinaciones de estos parámetros. por ejemplo, el diámetro medio puede aumentar no más del 25 %, y el porcentaje de fármaco encapsulado es al menos del 90 %, o el diámetro medio puede aumentar no más del 10 % y el porcentaje del fármaco encapsulado es al menos del 90 %.

En algunas realizaciones, la distribución de tamaños de los liposomas cambia en no más del 25 % después de la liofilización y tras la reconstitución de dichos liposomas en comparación con antes de la liofilización. En otras

realizaciones, la distribución del tamaño de los liposomas cambia en no más del 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % después de la liofilización y tras la reconstitución de dichos liposomas en comparación con antes de la liofilización.

5 Como se señaló anteriormente, se contemplan diversas combinaciones de estos parámetros o criterios para liofilizar y reconstituir con éxito los liposomas: por ejemplo, al menos 85 % de fármacos encapsulados combinados con un aumento no mayor del 15 % en el diámetro medio, opcionalmente combinado con un cambio no mayor del 5 % en la distribución del tamaño. Cada una de las combinaciones posibles de estos parámetros está dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

10 Los liposomas en fase de gel se pueden generar mediante técnicas convencionales, por ejemplo, el procedimiento de inyección de éter (Deamer, y col., Acad. Sci. (1978) 308:250), el procedimiento tensioactivo (Brunner y col., Biochim. Biophys Acta (1976) 455:322), el procedimiento de congelación-descongelación (Pick y col., Arch. Biochim Biophys (1981) 212:186) el procedimiento de evaporación de fase inversa (Szoka y col., Biochim. Biophys Acta (1980) 601: 559-571), el procedimiento de tratamiento ultrasónico (Huang, y col., Biochemistry (1969) 8:344), el  
15 procedimiento de inyección de etanol (Kremer, y col., Biochemistry (1977) 16:3932), el procedimiento de extrusión (Hope, y col., Biochim. Biophys Acta (1985) 812: 55-65) y el procedimiento de prensa francés (Barenholz, y col., FEBS Lett. (1979) 99:210).

20 Estos procesos se pueden usar en combinación. Las vesículas unilamelares pequeñas (VUP), en particular, pueden prepararse mediante el procedimiento de tratamiento ultrasónico, el procedimiento de inyección de etanol y el procedimiento de prensa francesa. Las vesículas unilamelares grandes (VUG) pueden prepararse mediante el procedimiento de inyección de éter, el procedimiento de tensioactivo, el procedimiento de congelación-descongelación, el procedimiento de evaporación de fase inversa, el procedimiento de prensa francesa o el  
25 procedimiento de extrusión. Preferiblemente, los VUG se preparan de acuerdo con el procedimiento de extrusión.

La liofilización y la reconstitución se llevan a cabo en condiciones en las que los liposomas están en la fase de gel. Por lo tanto, la temperatura de transición de gel a líquido de los liposomas debe ser igual o superior a la temperatura corporal (es decir, aproximadamente 37 °C). La temperatura ambiente puede variar considerablemente, pero es importante que el proceso de liofilización comience en condiciones en que los liposomas estén en estado de gel. En  
30 algunas realizaciones, los liposomas se preparan a una temperatura inferior a la temperatura de transición de fase para mantener el estado de gel. Se puede emplear cualquier medio interno adecuado. Típicamente, el medio interno es un medio acuoso. El medio interno no contiene sustancialmente ningún crioprotector (es decir, menos de 125 mM crioprotector). El medio interno puede contener menos de 100 mM de crioprotector, o menos de 50 mM de crioprotector, o ningún crioprotector.

35 Las formulaciones de liposomas que tienen valores de  $T_C$  adecuados son liposomas de "colesterol bajo", es decir, aquellos preparados en presencia de, y que contienen una cantidad de colesterol que es insuficiente para alterar significativamente las características de transición de fase del liposoma, es decir, 20 % molar o menos colesterol. Más del 20 % en moles de colesterol amplía el intervalo de temperaturas a las cuales ocurre la transición de fase, y  
40 la transición de fase desaparece a niveles más altos de colesterol. Un liposoma que tiene colesterol bajo tendrá menos del 20 % en moles, o menos del 15 % en moles, o 10 % en moles o 5 % en moles o menos, o estará libre de colesterol. Tales liposomas requieren al menos 1 % en moles de un agente estabilizante PG y / o PI.

45 El crioprotector preferiblemente está presente solo en el medio externo de la formulación. Típicamente, los crioprotectores son disacáridos tales como sacarosa, maltosa, trehalosa y lactosa. El crioprotector puede ser un disacárido tal como sacarosa que tiene una concentración de aproximadamente 100 mM a 500 mM o aproximadamente 250-400 mM, o superior a 300 mM. El medio externo puede contener aproximadamente 100 mM a 500 mM crioprotector y el medio interno contiene menos de 125 mM crioprotector o el medio externo contiene  
50 aproximadamente 250 mM a 400 mM crioprotector y el medio interno contiene menos de 100 mM crioprotector o el medio externo contiene aproximadamente El crioprotector de 250 mM a 400 mM y el medio interno contiene menos de 50 mM de crioprotector o el medio externo contiene aproximadamente 250 mM a 400 mM de crioprotector y el medio interno no contiene crioprotector. El crioprotector puede ser un sacárido, como la sacarosa.

55 Las formulaciones liposomales en fase de gel pueden liofilizarse o liofilizarse usando cualquier protocolo apropiado. La temperatura inicial de la cámara de liofilización es preferiblemente inferior a la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de la solución que comprende el medio externo, además de contener los liposomas con fármacos encapsulados. por ejemplo, los liposomas pueden congelarse a una temperatura inferior a aproximadamente -5 °C, o inferior a aproximadamente -10 °C, o inferior a aproximadamente -20 °C, o inferior a aproximadamente -30 °C, o inferior a aproximadamente -40 °C. En algunas realizaciones, cuando se usa sacarosa como la solución crioprotectora, la  
60 temperatura inicial de la cámara de liofilización es inferior a -32 °C, que es la  $T_g$  de solución de sacarosa. " $T_g$ " incluye la temperatura de transición vítrea "y la temperatura de transición de fase vítrea", que es la temperatura aproximada del punto medio a la que la solución no congelada experimenta una transición de un gel blando y viscoso a una forma dura y relativamente frágil.

65 Los liposomas liofilizados pueden almacenarse a temperatura ambiente o por debajo de ella. Algunas realizaciones ejemplificadas tienen liposomas que se almacenan a 5 °C o menos. Algunas otras realizaciones ejemplificadas

tienen liposomas que se almacenan a 25 °C. El producto liofilizado permanece estable (por ejemplo, conserva su tamaño de partícula relativo y mantiene el fármaco encapsulado) durante al menos aproximadamente seis meses, o al menos aproximadamente nueve meses, o al menos aproximadamente un año, o al menos aproximadamente veinticuatro a treinta y seis meses.

5 Los agentes atrapados son agentes terapéuticos o de diagnóstico, a menudo agentes anticancerígenos. Sorprendentemente, el contenido y la integridad de las composiciones liposomales en fase de gel se mantienen, aunque los agentes difieren en sus características de solubilidad con respecto a los disolventes acuosos y no acuosos. Usando el enfoque de la presente invención, los agentes que difieren en el coeficiente de partición logarítmica (LogP) en hasta 1.0 pueden ser retenidos con éxito. También se pueden tolerar diferencias en el coeficiente de partición logarítmica de 1.5 o 2.0 o 3.0. Uno de los agentes puede ser anfipático mientras que el otro es soluble en agua, o uno puede ser hidrófobo mientras que el otro es soluble en agua. Los valores de LogP se basan en los coeficientes de partición entre octanol y agua. es decir, son el logaritmo base 10 de la proporción de cantidad en octanol a la cantidad en agua cuando el compuesto se somete a separación de fases.

15 Los agentes anticancerígenos pueden incluir una antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina o idarrubicina). Estos agentes son anfipáticos. Los agentes anticancerígenos pueden incluir un análogo de nucleósido tal como, por ejemplo, arabinósido de citosina, 5-FU o FUDR que son hidrófilos. Otros agentes anticancerígenos incluyen camptotecina o derivados de camptotecina, como el irinotecán, que son anfipáticos. Tanto una antraciclina como un análogo de nucleósido están encapsulados en algunos casos, o tanto una camptotecina como un derivado de camptotecina y un análogo de nucleósido están encapsulados. La encapsulación y / o carga de agentes en liposomas se puede llevar a cabo utilizando cualquier técnica de carga adecuada, incluida la carga pasiva y activa. Las realizaciones importantes incluyen las descritas las patentes de Estados Unidos 7,850,990 y U.S. 8,022,279 citadas anteriormente, es decir, combinaciones de irinotecán:floxuridina (FUDR) en una relación molar de 1:1 y daunorrubicina:citarabina (AraC) en una relación molar de 1: 5. Las formulaciones particulares de estos medicamentos se designan CPX-1 y CPX-351, respectivamente.

30 Los fármacos se incorporan en el compartimiento interno acuoso de los liposomas mediante procedimientos de carga pasivos o activos o alguna combinación de los mismos. En la carga pasiva, el agente biológicamente activo se puede incluir simplemente en la preparación a partir de la cual se forman los liposomas o, como alternativa, el agente activo se puede agregar al exterior de los liposomas preformados y se carga pasivamente por su gradiente de concentración en los liposomas. Opcionalmente, el material sin encapsular se puede eliminar de la preparación mediante cualquier procedimiento adecuado. Alternativamente, se pueden emplear procedimientos de carga activa, tales como gradientes de iones, ionóforos, gradientes de pH y procedimientos de carga basados en metales basados en la formación de complejos de metales. Una realización de uso habitual para fármacos adecuados es la carga a través de procedimientos basados en metales.

40 Los liposomas tienen un tamaño de aproximadamente 80-500 nm. En una realización, los liposomas tienen un diámetro de menos de 300 nm, a veces menos de 200 nm. En un ejemplo, el tamaño nominal de estos liposomas es de aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, la membrana del liposoma está compuesta de diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) y colesterol (CHOL). En algunas realizaciones, la membrana de liposoma está compuesta de 50-80 % de DSPC, 1-20 % de DSPG y 1-20 % de CHOL. En otras realizaciones, la membrana del liposoma está compuesta de 50-80 % de DSPC o DPPC, 1-20 % de DSPG o diestearoilfosfatidilinositol (DSPI), 1-20 % de CHOL y los liposomas contienen menos de 125 mM de crioprotector en el medio intraliposomal. En algunas realizaciones ejemplificadas, la membrana de liposoma está compuesta de 50-80 % de DSPC o DPPC, 1-20 % de DSPG o DSPI, 1-20 % de CHOL y los liposomas contienen menos de 50 mM de crioprotector en el medio intraliposomal. En otras realizaciones ejemplificadas, la membrana de liposomas está compuesta de DSPC, DSPG y CHOL en una relación molar de aproximadamente 7: 2: 1 y los liposomas no contienen crioprotector en el medio liposomal interno. En un caso, los liposomas se preparan mediante un procedimiento de liposomas derivados de agua en aceite y los liposomas extruidos se suspenden en sacarosa tamponada con fosfato a pH 7,0. En otro caso, los liposomas extruidos se suspenden en sacarosa. En una realización, los liposomas extruidos se suspenden en sacarosa 250-400 mM.

55 Se puede emplear cualquier medio adecuado para encapsular la combinación de fármacos en los liposomas. En una realización específica, el irinotecán y la floxuridina se cargan conjuntamente en liposomas preformados DSPC / DSPG / CHOL (7/2/1) mediante los cuales la floxuridina se carga pasivamente en los liposomas y el irinotecán se carga activamente a 50 °C usando sulfato de cobre o gluconato de cobre. en el medio interno. Ver copropiedad La patente de Estados Unidos Nos. 7,850,990 y 7,238,367. En otra realización específica, la citarabina y la daunorrubicina se encapsulan en el liposoma por lo que la citarabina se encapsula pasivamente en liposomas preformados y la daunorrubicina se acumula activamente dentro de los liposomas a altas eficiencias de atrapamiento usando un procedimiento de carga basado en gluconato de cobre / trietanolamina. Véase, por ejemplo, las solicitudes PCT copropietarias, WO05/102359 y WO07/076117A2.

65 Las composiciones liofilizadas de la presente invención proporcionan conveniencia en el almacenamiento, conservación y facilidad de envío. Estas composiciones liofilizadas conservan sus características durante largos períodos de tiempo.



Para su uso, las composiciones de la presente invención se reconstituyen en un vehículo o medio farmacéutico adecuado.

5 Estas formulaciones para uso se preparan de acuerdo con técnicas de reconstitución estándar usando un vehículo farmacéuticamente aceptable. Generalmente, se usará solución salina normal como el vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros portadores adecuados incluyen, por ejemplo, agua, agua tamponada, dextrosa, cloruro de sodio al 0,4 %, glicina al 0,3 %, incluidas las glucoproteínas para una mayor estabilidad, como albúmina, lipoproteína y globulina. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y  
10 liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste y tamponamiento del pH, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio. Además, la suspensión de liposomas puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen los  
15 lípidos contra los radicales libres y los daños por peroxidación de los lípidos en el almacenamiento. Los extintores de radicales libres lipofílicos, como el alfatocoferol, y los quelantes solubles en agua específicos de hierro, como la ferrioxamina, son adecuados.

20 Las formulaciones reconstituidas pueden administrarse a animales, incluidos humanos u otras especies de mamíferos, tales como primates no humanos, perros, gatos, vacas, caballos, ovejas y similares, y pueden usarse para tratar una variedad de enfermedades. Los ejemplos de usos médicos de las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, tratar cáncer, tratar enfermedades cardiovasculares tales como hipertensión, arritmia cardíaca y reestenosis, tratar infecciones bacterianas, fúngicas o parasitarias, tratar y / o prevenir enfermedades mediante el uso de Las composiciones de las presentes invenciones como vacunas, para  
25 tratar la inflamación o para tratar enfermedades autoinmunes. Para el tratamiento de dolencias humanas, un médico calificado determinará cómo se deben utilizar las composiciones de la presente invención con respecto a la dosis, el horario y la vía de administración usando protocolos establecidos. Dichas aplicaciones también pueden utilizar el aumento de la dosis, si los agentes bioactivos encapsulados en liposomas y los portadores de lípidos de la presente invención exhiben una toxicidad reducida para los tejidos sanos del sujeto.

30 Las composiciones farmacéuticas se administran típicamente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, pero pueden emplearse otras rutas. La dosificación para las formulaciones de liposomas dependerá de la proporción de fármaco a lípido y de la opinión del médico que administra según la edad, el peso y el estado del paciente.

35 En general, un proceso útil de acuerdo con las realizaciones de la presente invención comprende liofilizar una composición de liposomas en donde dichos liposomas comprenden 20 % en moles o menos de colesterol, al menos 1 % en moles de PG y / o PI, y dos o más agentes activos, y en donde la membrana del liposoma está por debajo de su temperatura de transición de fase cuando está a temperatura ambiente y en un medio externo que contiene un crioprotector; almacenar los liposomas liofilizados; y reconstituir los liposomas liofilizados en un volumen acuoso  
40 predeterminado. Los liposomas se liofilizan a una temperatura inferior a aproximadamente -5 °C, o inferior a aproximadamente -10 °C, e inferior a aproximadamente -20 °C, o incluso inferior a aproximadamente -30 °C o -40 °C, y se pueden almacenar a o por debajo de la temperatura ambiente (aproximadamente 23-25 °C).

45 En una realización, la membrana de liposomas de los liposomas de la composición está compuesta de 2-20 % de colesterol, o cualquier valor intermedio tal como 10 % de colesterol.

50 En una realización, la composición liofilizada comprende liposomas en los que la membrana del liposoma está compuesta de aproximadamente 10 % de colesterol y un disacárido a una concentración seleccionada en el medio externo donde la reconstitución, realizada a temperatura ambiente, está por debajo de la  $T_c$ , y en donde el crioprotector no está unido y está presente en el exterior solo de los liposomas.

55 En otra realización, la composición de liposomas liofilizados que comprende dos o más fármacos encapsulados tras la reconstitución con un volumen predeterminado de medio acuoso, produce una composición de liposomas que comprende: (a) liposomas en los que la membrana del liposoma contiene 20 % en moles o menos de colesterol, (b) liposoma tamaños predominantemente entre aproximadamente 80-500 nanómetros, (c) agente (s) atrapado (s) en liposomas en donde el porcentaje de encapsulación de dicho (s) agente (s) no es menor de aproximadamente 95 %, 90 %, 85 %, 80 % o 75 %; y (d) entre aproximadamente 100 mM - 500 mM de crioprotector en el medio liposomal externo. En algunas realizaciones, está presente entre 250-400 mM de crioprotector en el medio liposomal externo. En algunas realizaciones, aproximadamente 9,5-10 % de crioprotector está presente en el medio liposomal externo.

60 En una realización, los liposomas en fase de gel unilamelares o dilamelares, en donde la membrana del liposoma comprende 20 % en moles o menos de colesterol, y los liposomas comprenden al menos dos fármacos y al menos aproximadamente 300 mM de sacarosa en el exterior de los liposomas, se liofilizan. y, tras la reconstitución, se encapsula al menos aproximadamente el 90 % de cada uno de los fármacos encapsulados y el diámetro medio del  
65 liposoma cambia en menos de aproximadamente el 25 %.

Como se usa en el presente documento, "un" o "uno/una" significa "al menos uno" o "uno o más", a menos que sea claro por el contexto que solo se pretende un único referente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar, pero no limitar, la presente invención.

5

### **Ejemplo 1 (no está dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas) Liofilización de CPX-1**

10 El irinotecán y la floxuridina 1: 1 se encapsulan en liposomas DSPC / DSPG / colesterol (relación molar 7: 2: 1) y se denominan CPX-1. El CPX-1 liofilizado dio como resultado liposomas estables cargados de fármaco, de modo que hubo una filtración mínima de ingredientes farmacéuticos activos de la forma de dosificación reconstituida. El clorhidrato de irinotecán, utilizado en CPX-1, tiene un coeficiente de partición logarítmico (LogP) predicho de 3.94. La floxuridina tiene un LogP previsto de -1,14.

15 Se generaron análisis térmicos para el producto de fármaco liposomal CPX-1 utilizando varios lotes para proporcionar información sobre la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), cambio en la capacidad calorífica y otros eventos exotérmicos. La temperatura de colapso del producto de fármaco liposomal CPX-1 se determinó por microscopio liofilizado durante dos lotes. Estos resultados se emplearon para determinar el ciclo final de liofilización.

20 Las muestras consistieron en una suspensión acuosa a granel verde azulada formulada con liposomas que contenían una proporción 1: 1 de dos ingredientes farmacéuticos activos, clorhidrato de irinotecán y floxuridina. Las muestras se almacenaron a -20 °C (o en algunos casos -80 °C) con humedad relativa ambiental, y se descongelaron durante la noche en un refrigerador y se mezclaron completamente antes del llenado y la liofilización.

25 Ciclo 1: Utilizando una pipeta Clase A de 20 ml, 20 cc de CPX-1, se introdujeron en viales moldeados de vidrio de 60 cc. Se cargaron veinticuatro viales en un secador de bandejas LyoStarII con dos viales de producto equipados con sondas de termopar para registrar la temperatura del producto y se secaron por congelación durante cuatro días y medio. Después de rellenar los viales con gas nitrógeno a una presión de cámara de aproximadamente 720,000 mTorr, los viales se taparon, se retiraron del secador de bandeja y se etiquetaron como Lote TP-CPX1-001-032405. Varios de los viales liofilizados se colocaron luego en estabilidad acelerada a 25 °C y 40 °C, y los viales restantes se almacenaron a -20 °C.

35 Ciclo 2: se introdujeron aproximadamente 21 ml de CPX-1 en viales moldeados de vidrio de 60 cc y viales de tubo de vidrio de 50 cc, respectivamente. Los viales se cargaron en un secador de bandejas LyoStarII™ con una sonda de termopar en un vial de producto en el estante superior y uno en un vial de producto en el estante inferior. Una vez completado el ciclo de liofilización, los viales se rellenaron con gas nitrógeno a una presión de cámara de aproximadamente 720,000 mTorr, se taponaron, se retiraron del secador de bandeja y se etiquetaron como Lot TP-CPX1-002-041305T. Varios de los viales liofilizados se colocaron luego en estabilidad acelerada a 25 °C y 40 °C, y los viales restantes se almacenaron a -20 °C.

40 Ciclo 3: Las muestras para liofilización se prepararon de manera similar al Ciclo 2, excepto que solo se introdujeron en viales de tubos de vidrio de 50 cc. Los viales sellados se etiquetaron como producto farmacológico CPX-1, lote TP-CPX1-003-051105T. Varios de los viales liofilizados se colocaron luego en estabilidad acelerada a 25 °C y 40 °C, y los viales restantes se almacenaron a -20 °C.

45 Ciclo 4: Las muestras para liofilización se prepararon de manera similar a la del Ciclo 2, excepto que CPX-1 se llenó en viales de tubos de vidrio de 50 cc. Los viales sellados y liofilizados se marcaron como producto farmacológico CPX-1, lote TP-CPX1-004-051805T y se almacenaron para estudios de estabilidad a -20 °C, 5 °C, 25 °C y 40 °C.

50 Ciclo 5: Las muestras para liofilización se prepararon de manera similar a la del Ciclo 2 y se introdujeron en viales de tubos de vidrio de 50 cc. Los viales sellados y liofilizados se marcaron como CPX-1 Drug Product TP-CPX1-005 062705T-300. Los viales del producto farmacológico liposomal CPX-1 se almacenaron en cámaras de estabilidad a -20 °C, 5 °C y 25 °C.

55 **Primer ciclo de liofilización.** El objetivo principal para el primer ciclo de liofilización (Ciclo 1) fue determinar si el producto farmacológico liposomal CPX-1 a granel formulado (CPX-1) podía liofilizarse con éxito con una fase seca primaria suave de dos pasos. El éxito de esta prueba de liofilización se midió analizando los perfiles de temperatura y presión del producto farmacéutico e inspeccionando visualmente la apariencia de las tortas liofilizadas.

60 El perfil del producto de liofilización para el ciclo 1 mostró que el hielo a granel se eliminó durante la etapa de secado primario de -10 °C. Esto fue evidente en que la temperatura del producto excedió ligeramente la temperatura de almacenamiento. Además, la presión del termopar, que mide la presión verdadera más la presión parcial del vapor de agua disminuyó hacia la presión del manómetro de capacitancia, o presión verdadera. Además, los viales del producto farmacológico liofilizado parecían secos con poca o ninguna evidencia de colapso de la torta. Sin embargo, se observó cierta concentración de analito o estratificación. Para optimizar el ciclo, la fase de tratamiento térmico y los pasos de secado primario se alteraron para la segunda carrera.

65

**Segundo ciclo de liofilización.** La segunda corrida de liofilización (ciclo 2) se realizó usando fases secas primarias y secundarias suaves similares a las del ciclo 1. Para maximizar la carga de hielo en el liofilizador, los viales llenos de agua desionizada se cargaron en un espacio de estante desocupado. El éxito de la carrera de liofilización también se midió por los perfiles de temperatura y presión y por inspección visual de las tortas liofilizados.

5 El producto farmacológico en los viales de tubos de 50 cc pareció secarse por congelación de una manera más homogénea, a pesar de que la temperatura del producto y los perfiles de presión para el vial de tubo de vidrio de 50 cc y el vial moldeado de vidrio de 60 cc durante el ciclo de cuatro días y medio fueron similares. Aproximadamente  
10 muestra la finalización de la sublimación de hielo a granel cruzando la barrera de hielo. (es decir, la temperatura del producto supera los 0 ° C). Sin embargo, estos viales no estaban suficientemente secos. La temperatura del producto estaba por debajo de la temperatura de almacenamiento al final de la fase seca primaria, y la diferencia entre la presión del termopar y la presión del manómetro de capacitancia no cambió desde el comienzo de la carrera hasta el final de la fase seca secundaria, lo que indica la presencia de hielo a granel sustancial en los viales.

15 Debido a que las temperaturas del estante empleadas en la fase seca primaria no lograron impartir suficiente energía para conducir la tasa de sublimación del producto hacia su finalización, se desarrolló un tercer ciclo de liofilización para llevar la fase de secado primaria al final mediante el uso de una temperatura del estante y la presión de la cámara que aumenta la sublimación del hielo, sin exceder la temperatura de colapso.

20 **Tercer ciclo de liofilización.** En base a los resultados del ciclo 2 y los análisis térmicos, la temperatura del estante y la presión de la cámara para el ciclo 3 se ajustaron para facilitar el secado primario, mientras se mantienen las temperaturas del producto por debajo de la temperatura de colapso estimada de -20 °C. Para maximizar la carga de hielo, el ciclo se realizó bajo condiciones de funcionamiento completamente cargadas.

25 La gráfica de perfil obtenida para el Ciclo 3 mostró que la temperatura inicial de la plataforma seca primaria, -20 °C a 100 mTorr de presión, no condujo la sublimación de hielo a granel lo suficiente en 40 horas bajo condiciones de funcionamiento completamente cargadas. Además, la traza de presión del termopar no disminuyó significativamente hacia la presión del manómetro de capacitancia hasta el final de la fase seca primaria de -10 °C debido a la duración limitada de esta fase. Sin embargo, el perfil demostró que la temperatura y la duración del segundo estante seco  
30 primario de -10 °C fue capaz de mantener la temperatura del producto por debajo de la temperatura de colapso de -20 °C hasta que todo el hielo a granel se sublimó, lo que fue evidente en el rápido aumento de temperatura del producto para eventualmente exceder la temperatura de almacenamiento al final de la fase.

35 **Cuarto ciclo de liofilización.** Para finalizar la temperatura del estante para la fase de secado primario, el cuarto ciclo de liofilización (ciclo 4) empleó una temperatura del estante de -10 °C durante un período más largo con un paso de secado inicial primario de 6 horas a -20 °C bajo condiciones de funcionamiento completamente cargadas.

40 Según el perfil del ciclo de liofilización y la observación visual, la temperatura de almacenamiento de -20 °C para la fase seca primaria inicial pareció tener pocos beneficios en el secado de los viales. Las sondas de temperatura del producto excedieron la temperatura de almacenamiento a -10 °C después de un tiempo de retención de aproximadamente 60 horas. La presión del termopar durante la fase de secado secundario indicó que los viales tenían humedad residual relativamente baja, ya que el perfil de temperatura del producto coincidía estrechamente con el de la temperatura de almacenamiento.

45 La encapsulación de sustancias farmacológicas, el tamaño de partícula liposomal y la humedad residual promedio se evaluaron para los viales del producto liofilizado. El procedimiento Karl Fischer empleado recuperó un contenido medio de humedad residual del 3,1 %, que no era un producto liposomal demasiado seco. Además, los análisis para el tamaño de partícula y el porcentaje de encapsulación de irinotecán encontraron que el producto liofilizado no cambió en comparación con el material preliofilizado. Sin embargo, el porcentaje de floxuridina sin encapsular aumentó de 7.0 % en el volumen preliofilizado a 8.6 % en el producto liofilizado cuando se almacenó a -20 °C durante 13 semanas. Además, después de almacenar el producto durante cuatro semanas a 25 °C, el porcentaje de floxuridina sin encapsular aumentó a 11.8 %, lo que excedió la especificación provisional de menos de 10 % de floxuridina sin encapsular para este medicamento.

50 **Quinto ciclo de liofilización.** El objetivo de la quinta carrera del ciclo de liofilización (Ciclo 5) era disminuir la temperatura del estante para la fase de secado secundario de + 20 °C a + 10 °C para minimizar la fuga de floxuridina, al tiempo que se logra una humedad residual adecuada bajo una carga completamente cargada condiciones. El contenido de humedad para este material se evaluó durante la fase seca secundaria realizando  
55 periódicamente una medición de aumento de presión.

60 El perfil del producto farmacológico para el ciclo 5 mostró que el hielo a granel se sublimó en gran medida después de 72 a 84 horas de secado primario a -10 °C. Además, el material parece haberse secado suficientemente empleando una temperatura de almacenamiento de + 10 °C a 50 mTorr durante 12 horas, en función de las diferencias del detector de presión y los estudios de aumento de presión.

65

Para evaluar la idoneidad de este material liofilizado, se evaluó el tiempo de reconstitución de los viales de productos farmacológicos liofilizados de ambos ciclos 4 y 5 utilizando 19 ml de agua inyectada a través de los tapones con una aguja de calibre 18 y una jeringa de 30 cc. Se determinó que el tiempo de reconstitución promedio era de 40 y 93 segundos para los ciclos 4 y 5, respectivamente. Además, los resultados de Karl Fischer para el ciclo 5 recuperaron una humedad residual promedio de 3.2 %, que estaba en buen acuerdo con la de los viales del ciclo 4.

También se evaluó la encapsulación de las sustancias farmacológicas y el tamaño de partícula liposomal. Para el producto farmacológico liofilizado del ciclo 5, el porcentaje de irinotecán sin encapsular fue del 0,4 % a -20 °C después de 7 semanas de almacenamiento y del 0,9 % a 25 °C después de 4 semanas de almacenamiento. El tamaño de partícula para el producto farmacológico liofilizado aumentó solo ligeramente después de 8 semanas de almacenamiento a 5 °C en comparación con el producto farmacológico cuando se almacenó a -20 °C, pero aumentó casi 10 nm después de solo 4 semanas de almacenamiento a 25 °C. Como era de esperar, el porcentaje de floxuridina sin encapsular mostró una tendencia similar a los cambios de tamaño de partícula. El porcentaje de floxuridina sin encapsular fue del 5,5 % a -20 °C después de 7 semanas, del 7,7 % después de 8 semanas a 5 °C y del 18,7 % a 25 °C después de 4 semanas.

La quinta carrera del ciclo de liofilización, que empleó una temperatura de almacenamiento disminuida durante su fase seca secundaria, logró producir un producto de fármaco liposomal CPX-1 liofilizado aceptable con una mayor retención del producto encapsulado.

## **Ejemplo 2**

### **El perfil del tamaño de partícula a lo largo del tiempo permanece sin cambios en los liposomas liofilizados**

Se realizaron experimentos para examinar el impacto de la congelación, la liofilización y el almacenamiento en la distribución de tamaños de los liposomas de doble carga CPX-1 y CPX-351. CPX-351 es una formulación de daunorrubicina y citarabina en una proporción molar de 1: 5 en liposomas que son diestearoilfosfolina (DSPC): diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG): y colesterol (CHOL) en una proporción molar de 7: 2: 1. La daunorrubicina tiene un LogP previsto de 1,68. La citarabina tiene un LogP previsto de -2,17.

La distribución del tamaño de partícula de los liposomas cocargados se midió antes y después de congelar y liofilizar los liposomas, así como después de uno y seis meses de almacenar las preparaciones liofilizadas.

Los liposomas CPX-1 se prepararon con un tampón externo de sacarosa 300 mM, fosfato 20 mM, pH 7,0. Se agregaron alícuotas de 900 µl en viales de 2 ml en un recipiente de metal (preenfriado a -20 °C) y se almacenaron a -20 °C durante la noche. Después de la congelación, las muestras se trasladaron al liofilizador (preenfriado a -20 °C). Se aplicó el vacío y la temperatura de almacenamiento se mantuvo a -20 °C durante 7 horas y posteriormente se aumentó a -10 °C durante aproximadamente 16 horas. Para un tercer paso de temperatura, la temperatura del estante se aumentó luego a 4 °C durante las siguientes 3 horas y luego se terminó con un secado de 3 horas a temperatura ambiente. Las muestras secas se hidrataron con 1 ml de H<sub>2</sub>O y disuelve fácilmente la torta liofilizada. Luego, las muestras se analizaron usando Dispersión dinámica de luz (DLS).

Los liposomas CPX-1 precongelados mostraron un diámetro de tamaño medio de 110 nm (Figura 1). Se observó que el tamaño de los liposomas inmediatamente después de la liofilización y la rehidratación era de 116 nm (Figura 2). Se almacenaron dos muestras de liposomas liofilizados CPX-1 a 5 °C durante un mes o seis meses, y se observó el tamaño de los liposomas de las composiciones rehidratadas. El tamaño medio de los liposomas para cada uno fue de 117 nm y 123 nm, respectivamente (Figuras 3 y 4, respectivamente). Las Figuras 1-3 muestran la distribución ponderada por volumen. La Figura 4B muestra la distribución ponderada de volumen comparable. Los resultados de otros algoritmos menos preferidos se muestran en las Figuras 4A y 4C. A menos que se especifique lo contrario, el diámetro medio se refiere a la distribución ponderada por volumen.

También se llevaron a cabo experimentos similares a los representados en las Figuras 1-4 para liposomas CPX-351.

Como se señaló anteriormente, CPX-351 es una formulación liposomal de una combinación fija de fármacos antineoplásicos, citarabina y clorhidrato de daunorrubicina. Los liposomas se hacen usando DSPC, DSPG y CHOL en una relación molar 7: 2: 1 y con un gluconato de cobre - tampón de trietanolamina, pH 7,4. Los liposomas brutos se extruyen para lograr la distribución del tamaño de las partículas de liposomas donde el diámetro medio de los liposomas debe estar entre 80 nm y 110 nm, con D99 no más de 200 nm (análisis por dispersión dinámica de luz). La citarabina está encapsulada por un mecanismo de carga pasiva. La daunorrubicina se encapsula mediante un mecanismo activo mediado por cobre para lograr una relación molar citarabina: daunorrubicina de 5: 1. Cualquier sustancia farmacológica no encapsulada se elimina y el tampón a granel se cambia por diafiltración. Se intercambian múltiples volúmenes de sacarosa 300 mM para finalizar los liposomas CPX-351 que luego se procesan mediante una optimización de liofilización. Las muestras secas de CPX-351 se reconstituyen con 19 ml de H<sub>2</sub>O y reformar fácilmente una dispersión liposomal. Luego, las muestras se analizan utilizando la dispersión dinámica de la luz (DLS).

Los liposomas CPX-351 preliofilizados mostraron un diámetro de tamaño medio de aproximadamente 100 nm. Se observó que el tamaño de los liposomas inmediatamente después de la congelación y luego la liofilización / rehidratación era de 99 nm y 100 nm, respectivamente para el lote 1 ("1C001" en la tabla 1 a continuación). Para un segundo lote, 1D002, se observó que el tamaño del liposoma CPX-351 inmediatamente después de la congelación y luego liofilización / rehidratación era de 104 nm y 105 nm, respectivamente.

Estos resultados muestran que los liposomas DSPC / DSPG / bajos en colesterol cargados juntamente con irinotecán más floxuridina o citarabina más daunorrubicina, mantienen eficazmente sus perfiles de distribución de tamaños al congelarse, así como liofilizar y durante períodos prolongados de almacenamiento. Los resultados aquí también muestran que estos liposomas en fase de gel preparados con bajo contenido de colesterol son resistentes a la agregación y fusión que comúnmente resultan de la congelación y liofilización, particularmente en ausencia de altos niveles de colesterol.

Tabla 1 Efectos de congelación y liofilización en el tamaño de liposoma CPX-351

CPX-351 Liposomas	1C001 (lote 1)		1D002 (lote 2)	
	Congelado	Liofilizado / rehidratado	Congelado	Liofilizado / rehidratado
Diámetro medio (nm)	99	100	104	105
D10 (nm)	68	68	74	71
D90 (nm)	135	137	137	142
D99 (nm)	178	182	178	191

**Ejemplo 3**

**El porcentaje de encapsulación del fármaco a lo largo del tiempo permanece sin cambios en los liposomas liofilizados**

Se realizaron experimentos para examinar el impacto de la congelación y / o la liofilización y el almacenamiento en la extensión de la fuga del fármaco de los liposomas CPX-1 o CPX-351 de doble carga.

La cantidad de irinotecán y floxuridina encapsulados en liposomas CPX-1 cocargados se midió inmediatamente después de la liofilización ("inicial"), así como 6 y 9 meses después del almacenamiento a 5 °C. Los estudios de estabilidad demostraron que el porcentaje (%) de encapsulación de irinotecán es del 99 % inmediatamente después de la liofilización, del 97 % seis meses después del almacenamiento y del 97 % nueve meses después del almacenamiento (Tabla 2 a continuación). Del mismo modo, el porcentaje de encapsulación de floxuridina fue del 98 % inmediatamente después de la liofilización y del 95 % a los seis y nueve meses después del almacenamiento a 5 °C (Tabla 3 a continuación).

Para los liposomas CPX-351, también se estudiaron los efectos de la congelación y la liofilización en el porcentaje de encapsulación del fármaco. Como se ve en la Tabla 4 a continuación, se midió que la cantidad de citarabina encapsulada en liposomas CPX-351 co-cargados era del 100 % inmediatamente después de la congelación ("Congelado") y del 98 % después de la liofilización ("Liofilizado") en dos lotes separados (1C001 y 1D002). El porcentaje de encapsulación de daunorrubicina fue del 99 % tanto inmediatamente después de la congelación como de la liofilización en ambos lotes. La encapsulación del fármaco también es estable cuando CPX-351 se almacena a 5 °C o 25 °C (ver Tablas 5 y 6).

Estos resultados demuestran claramente que tanto los liposomas en fase de gel CPX-1 como CPX-351 que incorporan bajas cantidades de colesterol y un crioprotector en la solución externa pueden congelarse, deshidratarse y reconstituirse de manera efectiva con una fuga mínima de ambos fármacos encapsulados.

Tabla 2 Porcentaje de encapsulación de irinotecán en liposomas de CPX-1 reconstituídos

Intervalos de estabilidad			
Prueba	Inicial	6 mes	9 mes
Irinotecán - % de encapsulación	99 %	97 %	97 %

## ES 2 750 368 T3

Tabla 3 Porcentaje de encapsulación de floxuridina en liposomas de CPX-1 reconstituidos

<b>Intervalos de estabilidad</b>			
<b>Prueba</b>	<b>Inicial</b>	<b>6 mes</b>	<b>9 mes</b>
Floxuridina - % de encapsulación	98 %	95 %	95 %

5

Tabla 4 Porcentaje de encapsulación de citarabina y daunorrubicina en liposomas de CPX-351 reconstituidos

CPX-351 Liposomas	<b>1C001</b>		<b>1D002</b>	
	Congelado	Liofilizado	Congelado	Liofilizado
Citarabina % de encapsulación	100	98	100	98
Daunorrubicina % de encapsulación	99	99	99	99

Tabla 5

CPX-351: Encapsulación en porcentaje de citarabina			
	Tiempo posliofilización	Almacenado a 5 ° C	Almacenado a 25 ° C
Lote 1C001	Inicial	98	98
	3 meses	98	98
	6 meses	98	98
	9 meses	98	-
Lote 1D001	Inicial	98	98
	3 meses	98	99
	6 meses	99	99
	9 meses	98	-

10

Tabla 6

CPX-351: Encapsulación porcentual de daunorrubicina			
	Tiempo posliofilización	Almacenado a 5 ° C	Almacenado a 25 °
Lote 1C001	Inicial	99	99
	3 meses	99	99
	6 meses	99	99
	9 meses	99	-
Lote 1D001	Inicial	99	99
	3 meses	99	99
	6 meses	99	99
	9 meses	99	-

## REIVINDICACIONES

1. Una composición liposomal liofilizada en fase de gel, cuya composición comprende:

5 (a) liposomas en fase de gel que exhiben una temperatura de fase de fusión ( $T_C$ ) de al menos 37 °C, en donde la membrana del liposoma de dichos liposomas comprende no más de 20 % en moles de colesterol y comprende al menos 1 % en moles de un fosfatidilglicerol (PG) o un fosfatidilinositol (PI) o ambos, y en donde al menos dos los agentes terapéuticos y / o diagnósticos están asociados de manera estable con dichos liposomas; y

10 (b) un crioprotector externo a dichos liposomas;

en el que dichos liposomas contienen sustancialmente ningún crioprotector interno, y en el que, cuando dicha composición liposomal en fase de gel se reconstituye en un vehículo farmacéutico, el diámetro medio de los liposomas se mantiene por lo que dicho diámetro medio no aumenta más del 50 % en una base ponderada en volumen en comparación con dicha composición antes de la liofilización, y dichos agentes se retienen en los liposomas.

20 2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha membrana de liposoma está compuesta de diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) y colesterol (CHOL).

3. La composición de la reivindicación 2, en la que la membrana de liposoma está compuesta de 50-80 % en moles de DSPC, 1-20 % en moles de DSPG y 1-20 % en moles de CHOL.

25 4. La composición de la reivindicación 2, en la que la membrana del liposoma está compuesta de DSPC, DSPG y CHOL en una relación molar de 7: 2: 1 y los liposomas no contienen crioprotector interno.

5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los agentes son agentes antineoplásicos.

30 6. La composición de la reivindicación 2, en la que la membrana del liposoma está compuesta de DSPC, DSPG y CHOL en una relación molar 7: 2: 1 y en donde (i) los agentes antineoplásicos daunorrubicina y citarabina están encapsulados en dichos liposomas en una relación molar 1:5; o (ii) los agentes antineoplásicos irinotecán y floxuridina se encapsulan en dichos liposomas en una relación molar de 1:1.

35 7. La composición de la reivindicación 1, en la que los agentes encapsulados en dichos liposomas están en una proporción fija y en donde, cuando dicha composición se reconstituye, dicha proporción de los agentes cambia en no más del 25 % en comparación con dicha composición antes de la liofilización.

40 8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el diámetro medio de los liposomas aumenta en no más del 25 % en una base ponderada en volumen después de la liofilización y tras la reconstitución de dichos liposomas en comparación con dicho valor medido antes de la liofilización.

45 9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho diámetro medio se mantiene durante al menos 6 meses tras el almacenamiento de dicha composición a 5°C o a 25°C.

10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que al menos el 75 % de cada agente se retiene tras la reconstitución de dichos liposomas.

50 11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los agentes encapsulados en dichos liposomas se mantienen encapsulados durante al menos 6 meses tras el almacenamiento de dicha composición a 5°C o a 25°C.

55 12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la distribución del tamaño de los liposomas cambia en no más del 25 % después de la liofilización y tras la reconstitución de dichos liposomas.

60 13. Un procedimiento para preparar la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, cuyo procedimiento comprende someter a liofilización, en presencia de crioprotector externo, un medio acuoso que comprende liposomas en fase de gel que exhiben una temperatura de fase de fusión ( $T_C$ ) de al menos 37 °C, en donde la membrana del liposoma de dichos liposomas comprende no más de 20 % en moles de colesterol y comprende al menos 1 % en moles de un fosfatidilglicerol (PG) o un fosfatidilinositol (PI) o ambos, y en donde dichos liposomas son asociado de manera estable con al menos dos agentes terapéuticos y / o diagnósticos y no contiene sustancialmente ningún crioprotector interno.

65 14. El procedimiento de la reivindicación 13 en el que dicho medio acuoso que comprende dichos liposomas en fase de gel se congela a una temperatura que está por debajo de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de dicho medio.

15. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica para administrar agentes terapéuticos y / o diagnósticos a un sujeto, cuyo procedimiento comprende reconstituir la composición liposomal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en un vehículo farmacéutico para obtener una composición reconstituida.

5 16. La composición reconstituida de la reivindicación 15 para su uso como medicamento.



**Resumen gaussiano:**

Diámetro medio = 109,7 nm  
 Desviación típica = 31.3 nm (28.6 %)  
 Coef. de var. = 0,286

Chi cuadrado = 0,241  
 Adj. basal = 0,009 %  
 Coef. dif. medio = 4,18E-08 cm<sup>2</sup>/s

Diámetro (nanómetros)	Volumen ; Relativo	Porcentaje
19,7	0,000	0,000
22,7	0,000	0,000
26,2	0,000	0,000
30,3 □	0,000	0,001
35,0 □	0,001	0,012
40,4 □	0,004	0,072
46,6 □	0,017	0,345
53,8 □	0,064	1,277
62,2 □	0,185	3,672
71,8 □	0,414	8,190
82,9 □	0,715	14,171
95,8 □	0,960	19,021
110,6 □	1,000	19,807
127,7 □	0,808	16,001
147,4 □	0,506	10,029
170,3 □	0,246	4,876
196,6 □	0,093	1,839
227,1 □	0,027	0,538
262,2 □	0,006	0,122
302,8 □	0,001	0,022
349,7 □	0,000	0,003
403,8 □	0,000	0,000
466,3	0,000	0,000
538,4	0,000	0,000

**Resultados acumulados:**

25 % de distribución < 80,64 nm  
 50 % de distribución < 98,03 nm  
 75 % de distribución < 119,28 nm  
 90 % de distribución < 142,05 nm  
 99 % de distribución < 191,84 nm

Tiempo de carrera = 0 Hr 6 Min 22 S  
 Fase de recuento = 353 Khz  
 Canal n.º1 = 271,0 K  
 anchura del canal = 11,0 uS

Longitud de onda = 632,8 nm  
 Temperatura = 23 °C  
 viscosidad = 0,945 cp  
 índice de ref. = 1,335

**FIG. 1**

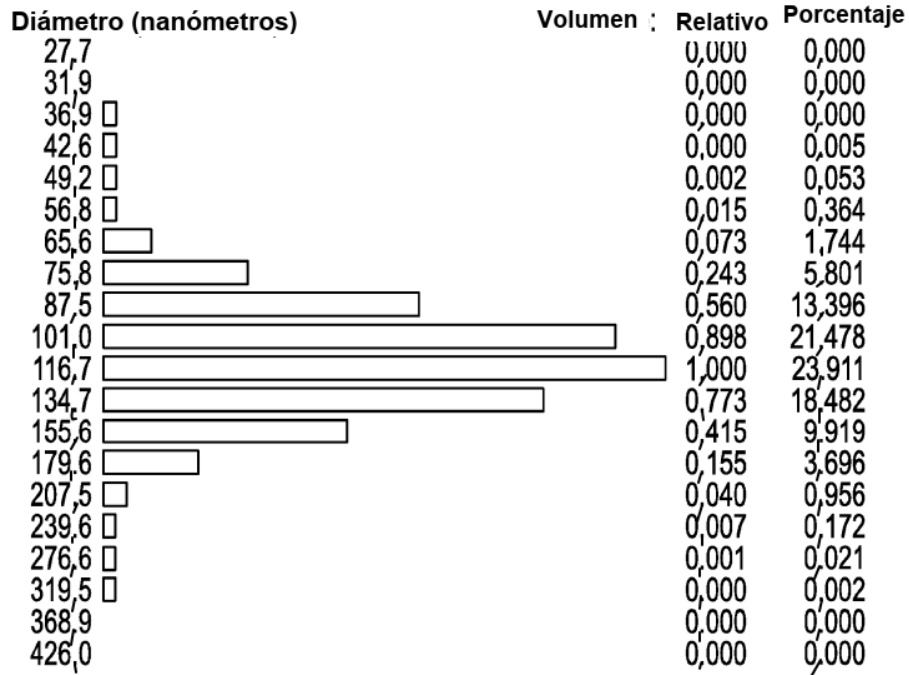
**CPX-1 liofilizado**

Archivo del menú : C370. TBL 1/4/80

Análisis gaussiano ponderado en volumen (vesículas)

**Resumen gaussiano:**

Diámetro medio = 116,5 nm	Chi cuadrado = 0,161
Desviación típica = 27,8 nm (23.8 %)	Adj. basal = 0,046 %
Coef. de var. = 0,238	Coef. dif. medio = 3,94E-08 cm <sup>2</sup> /s



**Resultados acumulados:**

25 % de distribución < 89,64 nm  
 50 % de distribución < 105,47 nm  
 75 % de distribución < 124,40 nm  
 90 % de distribución < 144,36 nm  
 99 % de distribución < 183,79 nm

Tiempo de carrera = 0 Hr 4 Min 56 Sec	Longitud de onda = 632,8 nm
Tasa de recuento = 360 KHz	Temperatura = 23 C
Canal n.º1 = 256,8 K	viscosidad = 0,945 cp
Anchura del canal = 13,0 uSec	índice de ref. = 1,335

**FIG. 2**

Archivo del menú : C370. TBL 1/4/80

Análisis gaussiano ponderado en volumen (vesículas)

**Resumen gaussiano:**

Diámetro medio = 116,9 nm  
 Desviación típica = 37,9 nm (32.4 %)  
 Coef. de var. = 0,324

Chi cuadrado = 0,204  
 Adj. basal = 0,009 %  
 Coef. dif. medio = 3,92E-08 cm<sup>2</sup>/s

Diámetro (nanómetros)	Volumen	Relativo	Porcentaje
15,6		0,000	0,000
18,0		0,000	0,000
20,8		0,000	0,000
24,0	□	0,000	0,000
27,7	□	0,000	0,002
32,0	□	0,001	0,011
36,9	□	0,003	0,055
42,6	□	0,013	0,225
49,2	□	0,043	0,757
56,8	▬	0,120	2,094
65,6	▬	0,271	4,754
75,8	▬	0,506	8,858
87,5	▬	0,773	13,547
101,0	▬	0,971	17,004
116,7	▬	1,000	17,518
134,7	▬	0,846	14,813
155,6	▬	0,587	10,280
179,7	▬	0,334	5,856
207,5	▬	0,156	2,738
239,6	□	0,060	1,051
276,7	□	0,019	0,331
319,5	□	0,005	0,086
369,0	□	0,001	0,018
426,1	□	0,000	0,003
492,1	□	0,000	0,000
568,2	□	0,000	0,000
656,2	□	0,000	0,000

**Resultados acumulados:**

25 % de distribución < 82,71 nm  
 50 % de distribución < 103,31 nm  
 75 % de distribución < 128,81 nm  
 90 % de distribución < 155,92 nm  
 99 % de distribución < 221,87 nm

Tiempo de carrera = 0 Hr 21 Min 0 Sec      Longitud de onda = 632,8 nm  
 Tasa de recuento = 358 KHz                      Temperatura = 23 C  
 Canal n.º1 = 1202,9 K                              viscosidad = 0,945 cp  
 Anchura del canal = 14,0 uSec                   índice de ref. = 1,335

**FIG. 3**

Sistemas de dimensionado de partículas: análisis gaussiano

Tiempo posiofilizado 0, GMP Lote 071 (Dec 15/03 )

Archivo de menú: C370. TBL 1/4/80

Chi cuadrado = 0,24

Tiempo de carrera = 0 Hr 11 Min 19 Sec

Tasa de recuento = 353 KHZ

Canal n.º 1 = 628,7 K

Anchura del canal = 14,0 uS

Adj. basal = 0.03

Longitud de onda = 632.8 nm

Temperatura = 23 deg C

Viscosidad = 0,945 cp

índice de ref. = 1,335

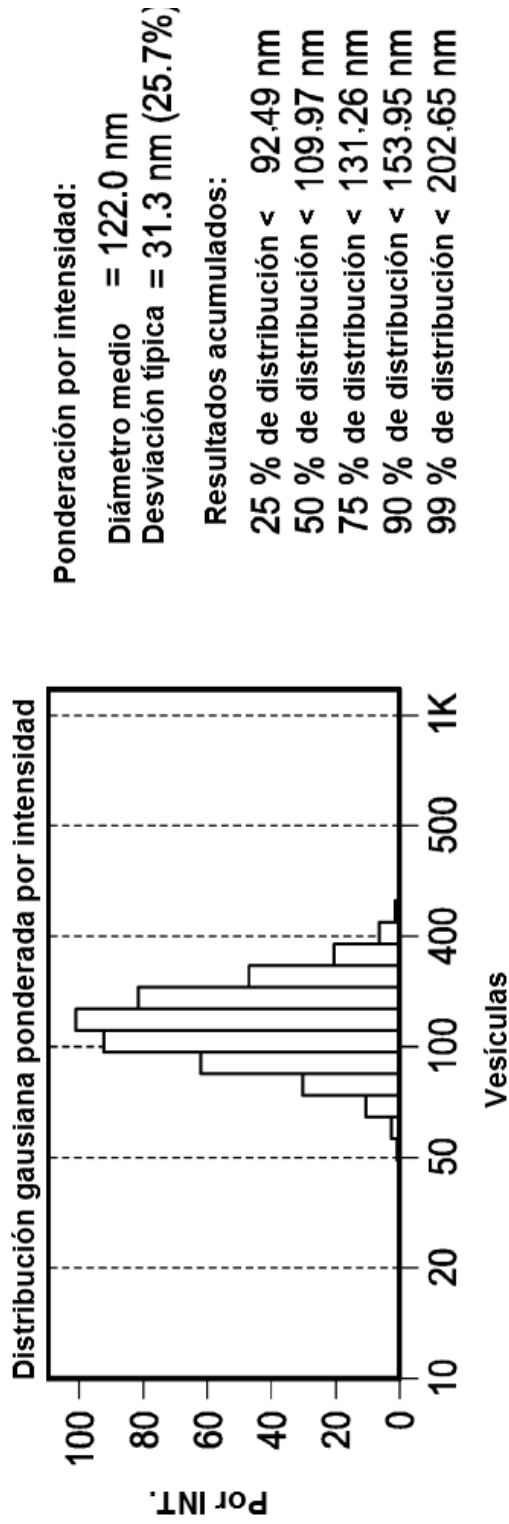


FIG. 4A

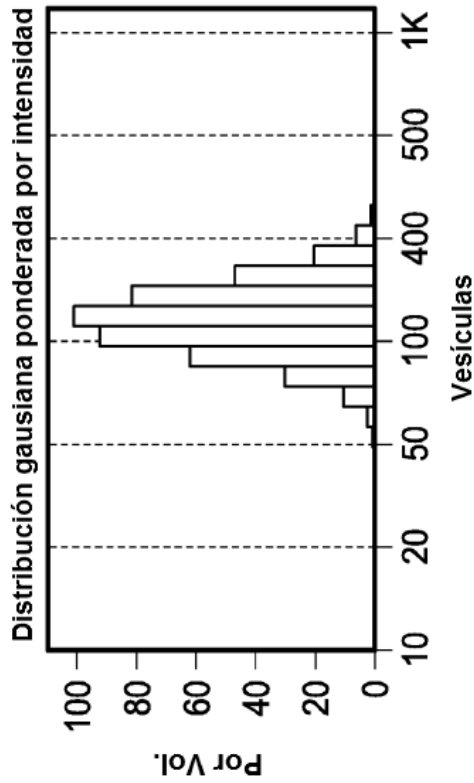
Sistemas de dimensionado de partículas: análisis gaussiano

Tiempo posfiliofilizado 0, GMP Lote 071 (Dec 15/03 )

Archivo de menú: C370. TBL 1/4/80

Chi cuadrado = 0,24  
 Tiempo de carrera = 0 Hr 11 Min 19 S  
 Tasa de recuento = 353 KHz  
 Canal n.º 1 = 628,7 K  
 Anchura del canal = 14,0 uS

Adj. basal = 0.03  
 Longitud de onda = 632.8 nm  
 Temperatura = 23 C  
 Viscosidad = 0.945 cp  
 índice de ref. = 1.335



Ponderación por intensidad:

Diámetro medio = 122,0 nm  
 Desviación típica = 31,5 nm (25,7%)

Resultados acumulados:

25 % de distribución < 92,94 nm  
 50 % de distribución < 110,56 nm  
 75 % de distribución < 131,96 nm  
 90 % de distribución < 154,72 nm  
 99 % de distribución < 203,82 nm

FIG. 4B

Sistemas de dimensionado de partículas: análisis gaussiano

Tiempo posiofilizado 0, GMP Lote 071 (Dec 15/03 )

Archivo de menú: C370. TBL 1/4/80

Chi cuadrado	= 0,24	Adj. basal	= 0,03
Tiempo de carrera	= 0 Hr 11 Min 19 S	Longitud de onda	= 632,8 nm
Tasa de recuento	= 353 KHz	Temperatura	= 23 deg C
Canal n.º 1	= 628,7 K	Viscosidad	= 0,945 cp
Anchura del canal	= 14,0 uS	Índice de ref.	= 1,335

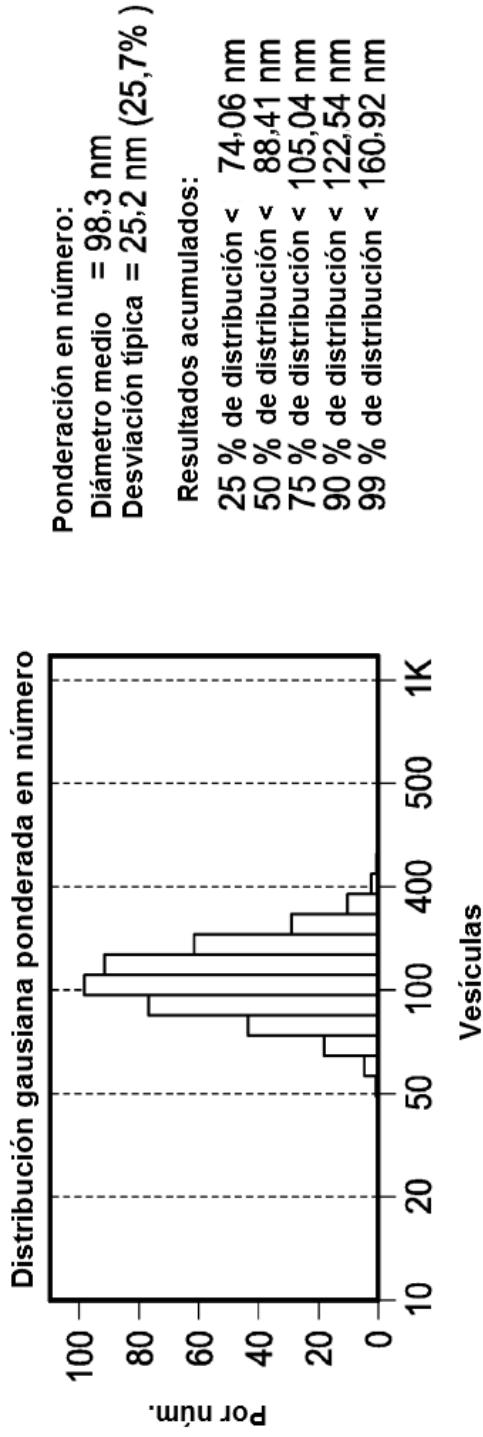


FIG. 4C