



REGISTRO DE LA  
PROPIEDAD INDUSTRIAL

ESPAÑA

① N.º de publicación: ES 2 024 381

② Número de solicitud: 9100557

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: C07C 403/20

C07C 403/12 //A61K 31/595

⑫

PATENTE DE INVENCION

A6

⑫ Fecha de presentación: 06.03.91

④ Fecha de anuncio de la concesión: 16.02.92

④ Fecha de publicación del folleto de patente:  
16.02.92

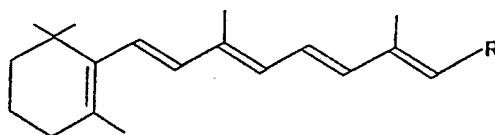
⑦ Titular/es:  
Universitat Autònoma de Barcelona  
Campus 08193 Bellaterra Barcelona, ES  
Antonio Puig S.A. y  
Isdin S.A.

⑦ Inventor/es: Trullàs Cabanas, Carles Ramón;  
Pelejero Cabruja, Carles;  
Padrós Morell, Esteve y  
Sabés Xamaní, Manuel

⑦ Agente: Curell Suñol, Marcelino

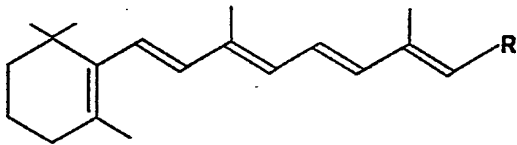
④ Título: Procedimiento de obtención de liposomas de retinoides.

⑤ Resumen:  
Procedimiento de obtención de liposomas de retinoides de fórmula I  
donde R significa COOH ó CH<sub>2</sub> - OCO (CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>  
CH<sub>3</sub>, correspondiendo respectivamente al ácido  
retinoico y al palmitato de retinol. El procedi-  
miento comprende la adición de una mezcla de  
uno de dichos retinoides a unos fosfolípidos, pre-  
ferentemente una suspensión de liposomas.  
Los retinoides son una clase de compuestos que  
consisten en análogos naturales y sintéticos deri-  
vados de la vitamina A o estructuralmente rela-  
cionados con la misma, y los liposomas obteni-  
dos son adecuados para el tratamiento tópico de  
disfunciones dermatoheliosis, fotoenvejecimiento  
y otras disqueratosis.



## DESCRIPCION

La invención se refiere a una composición dermatológica que comprende liposomas de retinoides de fórmula I



donde R significa COOH ó CH<sub>2</sub> - OCO (CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub> CH<sub>3</sub>. El primer caso corresponde al ácido retinoico y el segundo caso al palmitato de retinol.

Como ya es sabido, los retinoides son una clase de compuestos que consisten en análogos naturales y sintéticos derivados de la vitamina A o estructuralmente relacionados con la misma.

La composición citada es particularmente adecuada para el tratamiento tópico de disfunciones dermatológicas entre las que se encuentran el acné, dermatoheliosis, fotoenvejecimiento y otras disqueratosis.

Los derivados de la vitamina A ya se utilizan tópicamente en el tratamiento de las disfunciones citadas, y en particular se puede señalar que recientemente diferentes experimentos en ratones sin pelo y en humanos han demostrado que el ácido retinoico es capaz de mejorar clínica e histológicamente la piel fotoenvejecida (Kligman L. J.A.M.Acad.Dermatol.15,779-785,1986, Weis et al. J.A.M.Acad.Dermatol.19,165-175,1988).

Sin embargo, con frecuencia la utilización tópica de alguno de estos derivados de la vitamina A se ha visto restringida por los efectos secundarios que producen, especialmente irritación cutánea y, en caso, descamación.

Más adelante se exponen unos ensayos terapéuticos que muestran comparativamente los distintos resultados referidos a irritación cutánea que se obtienen en la aplicación tópica de retinoides incorporados a liposomas y los mismos compuestos formando parte de cremas, geles u otros vehículos. En los ensayos a que se ha hecho alusión, también se pone de manifiesto que la vehiculación de retinoides en liposomas, en general incrementa la actividad terapéutica de los mismos.

La invención se refiere también a un procedimiento de obtención de liposomas de retinoides, que sustancialmente está caracterizado porque una mezcla de dichos retinoides en un medio líquido, se añade a unos fosfolípidos.

Preferentemente, los fosfolípidos constituyen una suspensión de liposomas que es objeto de agitación.

La mezcla de retinoides puede ser una disolución en un solvente orgánico cuyo punto de ebullición es menor de 100°C.

En un desarrollo preferente de la invención, los fosfolípidos están constituidos por el residuo resultante de una evaporación a sequedad de una suspensión formada por una primera solución de fosfatidilcolina de huevo (EPC) y una segunda solución de ácido fosfatídico de huevo (EPA), y la suspensión tiene una concentración de fosfolípidos de por lo menos 6 mg/ml y una relación molar

EPC/EPA comprendida entre 9 y 36.

La resuspensión que se forma con la adición de la disolución de retinoides a dicho residuo, recibe la adición de una solución tamponada, resultando una mezcla que es objeto de sonicación de la que resulta una emulsión homogeneizada, la cual, sometida a evaporación a baja presión, proporciona una suspensión de liposomas cuyo tamaño se homogeneiza por medio de extrusiones sucesivas a través de membranas calibradas. Según una característica preferente de la invención, la suspensión de liposomas es el resultado de las siguientes etapas: a) formación de una suspensión de fosfolípidos a partir de una primera solución de fosfatidilcolina de huevo (EPC) y una segunda solución de ácido fosfatídico de huevo (EPA), de modo que esta suspensión tenga una concentración de fosfolípidos de por lo menos 6 mg/ml y una relación molar EPC/EPA comprendida entre 9 y 36; b) adición de una solución de tampón fosfato, de la que resulta una mezcla; c) sonicación de esta mezcla, obteniendo una emulsión homogeneizada; y d) evaporación de esta emulsión que proporciona una suspensión de liposomas, cuyo tamaño se homogeneiza por medio de extrusiones sucesivas a través de membranas calibradas.

Preferentemente, las citadas primera y segunda solución son el cloroformo.

También es preferente que estas membranas calibradas sean de policarbonato y en número de tres, cuyos poros son de 0,8 0,4 y 0,2 μm, respectivamente.

En un desarrollo de la invención, la suspensión de liposomas recibe la incorporación de agentes antioxidantes, que preferentemente son butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol o acetato de alfa-tócoferol.

Dicha suspensión también puede recibir una adición de sacarosa, a la que sigue una liofilización. En este caso, se ha conseguido preparar liposomas sin EPA en la composición lipídica, ya que la sacarosa al mismo tiempo que actúa como crioprotector, evita la agregación de los liposomas, misión que se atribuye al EPA en las preparaciones de liposomas EPC/EPA. Estos liposomas comprendiendo sacarosa pueden ser liofilizados y controles realizados mediante laser light scattering y microscopia electrónica han demostrado que los liposomas liofilizados conservan las mismas propiedades que los no liofilizados.

A continuación se exponen unos ejemplos no ilimitativos del procedimiento al que se ha hecho referencia.

## Ejemplo 1

En un balón con 57,7 mg de fosfatidilcolina de huevo (EPC) en solución clorofórmica, se añaden 2,9 mg de ácido fosfatídico de huevo (EPA) en solución clorofórmica, obteniendo una suspensión final de 6 mg/ml de fosfolípidos, cuya relación molar EPC/EPA es de 18:1. Esta suspensión se evapora a sequedad a la temperatura ambiente.

Una vez secos los fosfolípidos, se añade 4,5 ml de una solución de éter dietílico (0,074 ml de éter por mg de fosfolípido) en la que se encuentran 25 mg de ácido retinoico.

Con esta solución se resuspenden los fosfolípidos secos, y a continuación se añade 1,5 ml de una solución tampón 50 mM fosfato, 100 mM

KCl (pH 7), siendo la relación volumen tampón fosfato/éter de 1/3.

Esta mezcla se homogeneiza sonicándola a una potencia de 100 W durante 5 minutos, manteniendo la suspensión a 4°C. Una vez lograda la homogeneización, se procede nuevamente a evaporar a una presión de 410-460 mm Hg y se agita a una velocidad de rotación de 20-30 rpm, a temperatura ambiente durante 40 minutos.

Con la finalidad de eliminar posibles trazas de éter presentes en la suspensión de liposomas, se añade nuevamente 1 ml de tampón fosfato y se repite la evaporación, pero a 10 mm Hg de presión, temperatura ambiente y girando a 40-60 rpm durante 20 minutos.

Para obtener una población de liposomas de tamaño homogéneo, se procede a extrusionar secuencialmente la suspensión anterior a través de membranas de policarbonato de 0,8, 0,4 y 0,2 µm. La suspensión así obtenida se lleva a un volumen de 10 ml con tampón fosfato, consiguiéndose una concentración final de 6 mg/ml de fosfolípidos.

#### Ejemplo 2

Con el fin de evitar posibles oxidaciones de ácido retinoico durante el proceso de inclusión de liposomas, se ha diseñado un método de incorporación posterior a la preparación de los liposomas, tal y como se describe a continuación.

Se prepara la suspensión de liposomas tal como está descrita en el Ejemplo 1, pero sin incorporar el ácido retinoico en el éter dietílico.

Una vez finalizada la preparación de la suspensión de liposomas, se disuelven 2,5 mg de ácido retinoico en 0,247 ml de etanol (que representa aproximadamente, el 2% del volumen total de la suspensión). Esta solución se incorpora a la suspensión de liposomas en 4 adiciones y manteniendo la suspensión en agitación.

#### Ejemplo 3

Se procede de modo igual que en el Ejemplo 1, si bien el éter dietílico que se incorpora, contiene en disolución 2,5 mg de butilhidroxitolueno (BHT).

#### Ejemplo 4

Se procede igual que en el ejemplo 3, si bien empleando 2,5 mg de butilhidroxianisol (BHA), en lugar de BHT.

#### Ejemplo 5

Se procede igual que en el Ejemplo 1, pero incorporan 2,5 mg de acetato de α-tocoferol juntamente con las soluciones de fosfolípidos, antes de proceder a su evaporación.

#### Ejemplo 6

A 28 g de una suspensión en agitación de liposomas multilamelares previamente fabricados, se incorporan 0,12 g de ácido retinoico en solución alcohólica. A la suspensión así obtenida se adiciona tampón fosfato hasta obtener un peso final de 60 g.

#### Ejemplo 7

Se procede igual que en el Ejemplo 6, pero añadiendo a la solución alcohólica 0,16 g de BHT. De modo análogo se actúa con otros antioxidantes, como el BHA y el acetato de α-tocoferol.

#### Ejemplo 8

A 5,75 mg de fosfatidilcolina de huevo (EPC)

en solución clorofórmica contenidos en un balón, se añaden 2,9 mg de ácido fosfatídico de huevo (EPA), en solución clorofórmica, obteniendo una suspensión final de 12 mg/ml de fosfolípidos, cuya relación molar EPC/EPA es de 18:1. En el balón se incorporan también 0,02 g de palmitato de retinol. La suspensión resultante se evapora a sequedad a la temperatura ambiente.

Una vez secos los fosfolípidos, se añade al balón 9 ml de una solución de éter dietílico (0,15 ml de éter por mg de fosfolípido). En esta solución se resuspenden los lípidos secos y a continuación se añaden 3 ml de una solución tampón 50 mM fosfato y 100 mM KCl (pH 7), siendo la relación volumen fosfato/éter de 1/3.

Esta mezcla se homogeneiza sonicándola a una potencia de 100 W durante 5 minutos, manteniendo la suspensión a 4°C. Una vez lograda la homogeneización, se procede nuevamente a evaporar a una presión de 410-460 mm Hg y se agita a una velocidad de rotación de 20-30 rpm, a temperatura ambiente durante 40 minutos.

Con la finalidad de eliminar posibles trazas de éter presentes en la suspensión de liposomas, se añade nuevamente 1 ml de tampón fosfato y se repite la evaporación, pero a 10 mm Hg de presión, temperatura ambiente y girando a 40-60 rpm durante 20 minutos.

Para obtener una población de liposomas de tamaño homogéneo, se procede a extrusionar secuencialmente la suspensión anterior a través de membranas de policarbonato de 0,8, 0,4 y 0,2 µm. La suspensión así obtenida se lleva a un volumen de 5 ml añadiendo tampón fosfato, consiguiéndose una concentración final de 12 mg/ml de fosfolípidos.

Se consiguen liposomas unilamelares de tamaño muy homogéneo (0,2 µm) de diámetro y una encapsulación total del palmitato de retinol.

#### Ejemplo 9

A 3 g de una suspensión en agitación de liposomas multilamelares previamente fabricados, se incorporan 15 mg de una palmitato de retinol en solución acetónica. A la suspensión así obtenida se adiciona tampón fosfato hasta obtener un peso final de 5 g.

#### Ejemplo 10

Se procede igual que en el Ejemplo 9, pero añadiendo a la solución acetónica 1,25 mg de BHT. De modo análogo se actúa con otros antioxidantes, como el BHA y el acetato de α-tocoferol.

#### Ejemplo 11

A una suspensión de liposomas preparada según los ejemplos 1 y 2, se añaden 0,85 G de sacarosa, como agente protector, obteniéndose una concentración de 250 mM. A continuación se procede a liofilizar la suspensión.

A continuación se indican, a título orientativo, unas posibles formulaciones de la composición objeto de la invención.

ácido retinoico	0,01 a 0,3 g
fosfolípidos (EPC/EPA 18:1)	0,6 g
tampón fosfato con conservantes y antioxidantes	c.s. 100 g

ácido retinoico	0,01 a 0,3 g	
fosfolípidos (EPC/EPA 18:1)	0,6 g	
BHT	0,025 g	
tampón fosfato con conservantes y antioxidantes	c.s. 100 g	5
ácido retinoico	0,01 a 0,3 g	
fosfolípidos (EPCEPA 18:1)	0,6 g	
BHA	0,025g	10
tampón fosfato con conservantes y antioxidantes	c.s. 100 g	
ácido retinoico	0,01 a 0,3 g	15
fosfolípidos (EPC/EPA 18:1)	0,6 g	
$\alpha$ -acetato de tocoferol	0,025g	
tampón fosfato con conservantes y antioxidantes	c.s. 100 g	20
ácido retinoico	0,01 a 0,3 g	
fosfolípidos de soja	0,6 g	
tampón fosfato con conservantes y antioxidantes	c.s. 100 g	25
palmitato de retinol	0,01 a 0,4 g	
fosfolípidos (EPC/EPA 18:1)	1,2 g	30
tampón fosfato con conservantes y antioxidantes	c.s. 100 g	
palmitato de retinol	0,01 a 0,4 g	35
fosfolípidos de soja	1,2 g	
tampón fosfato con conservantes y antioxidantes	c.s. 100 g	
ácido retinoico	0,01 a 0,3 g	
fosfolípidos (EPC)	0,6 g	
sacarosa	8,5 g	
tampón fosfato con conservantes y antioxidantes	c.s. 100 g	45
ácido retinoico	0,025 g	
fosfolípidos (EPC/EPA 18:1)	0,6 g	50
excipiente para gel acuoso	c.s. 100 g	
ácido retinoico	0,025 g	
fosfolípidos (EPC/EPA 18:1)	0,6 g	55
acetato de $\alpha$ -tocoferol	0,025g	
excipiente para gel acuso	c.s. 100 g	
ácido retinoico	0,025 g	60
fosfolípidos de soja	0,6 g	
excipiente para gel acuoso	c.s. 100 g	
palmitato de retinol	0,01 a 0,4 g	65
fosfolípidos (EPC/EPA 18:1)	1,2 g	
excipiente para gel acuoso	c.s. 100 g	

palmitato de retinol	0,01 a 0,4 G
folfolípidos de soja	1,2 g
excipiente para gel acuoso	c.s. 100 g

#### Ensayos terapéuticos

##### Irritación Primaria Cutánea

Se ha determinado comparativamente sobre conejo albino neozelandés, el índice de irritación primaria cutánea (IPC) de una crema O/W, gel y de una suspensión de liposomas de ácido retinoico como la del ejemplo 1, al 0,01 y 0,025% p/p.

En la tabla 1 se representan los valores del IPC obtenidos después de aplicar el producto mediante parche semioclusivo, durante 24 horas. El valor de IPC se obtiene sumando los valores de eritema y edema a las 24 y 72 horas de aplicación. El valor medio se obtiene dividiendo el total por el número total de valores eritema + edema (= 12).

Estos estudios ponen de manifiesto que los tratamientos cutáneos con ácido retinoico incorporado en liposomas, no originan ningún tipo de irritación cutánea a diferencia de los tratamientos en que se ha empleado ácido retinoico en cremas o gel. En estos últimos casos, el IPC indica que tanto la administración del ácido retinoico en forma de gel como de crema, resultan ligeramente irritantes. En lo sucesivo, p/p indica porcentaje en peso.

Tabla 1

IPC	
Liposomas placebo 0,2 $\mu$	0
Liposomas placebo 0,4 $\mu$	0
Liposomas ácido retinoico 0,01% p/p, 0,2 $\mu$ m	0,125
Liposomas ácido retinoico 0,01% p/p, 0,4 $\mu$ m	0
Liposomas ácido retinoico 0,025% p/p, 0,2 $\mu$ m	0,5
Liposomas ácido retinoico 0,025% p/p, 0,4 $\mu$ m	0,3
gel placebo	0,13
gel ácido retinoico 0,01% p/p	0,60
gel ácido retinoico 0,025% p/p	0,90
crema placebo	0,70
crema ácido retinoico 0,025% p/p	1,00

##### Poder comedolítico

Se ha evaluado el poder comedolítico de una suspensión de liposomas de ácido retinoico al 0,01 y 0,025% p/p elaborado según el ejemplo 2. La evaluación del poder comedolítico ha sido realizada en conejo albino neozelandés y en ratón sin pelo Rhino.

Evaluación en conejo albino neozelandés

El test se realiza sobre la parte externa del canal auditivo de la oreja de conejo (Weinstein y col.

Clin. Res. 36(3) 1989, 380A). En primer lugar se provoca la formación de comedones aplicando durante 15 días miristato de isopropilo o coaltar al 10% en aceite mineral. A continuación se aplica la suspensión de liposomas durante 15 días y se evalúa el efecto comedolítico macroscópicamente y mediante estudio histológico de la estructura de la epidermis y de la glándula sebácea.

Los estudios macroscópicos muestran una fuerte disminución de la presencia de comedones por el tratamiento con la suspensión de liposomas de ácido retinoico al 0,01% y 0,025%.

El examen histológico indica que el tratamiento con la suspensión de liposomas provoca una regeneración de la epidermis y una recuperación de la estructura de la glándula sebácea. El ácido retinoico incorporado en liposomas es más efectivo que el vehiculizado en gel o en crema O/W.

Se ha observado también que el ácido retinoico vehiculizado en liposomas disminuye de forma importante los efectos irritantes y la descamación de la piel.

#### Evaluación en ratón sin pelo Rhino

El ratón sin pelo Rhino, alelo del ratón sin pelo Skh1 es un buen modelo para el estudio de agentes comedolíticos pues presenta de un modo espontáneo comedones o utrículos. (Kligman, J. Invest. Dermatol. 73: 354-358, 1979).

Se evalúa la actividad comedolítica, cuantificando las variaciones durante el tratamiento del perfil del comedón o cociente del diámetro en la boca del utrículo/ diámetro en el centro del utrículo (DII/DI), o cuantificando la disminución de los diámetros de los utrículos en whole mount epidermis. Se observa en la tabla II el tratamiento con ácido retinoico atrapado en liposomas da lugar a la disminución del diámetro en el centro del utrículo y aumenta el cociente DII/DI.

Tabla II

	Pla- cebo	Liposomas ácido retinoico 0,025%
DI	122,55 ± 1,68	23,81 ± 4,66
DII/DI	0,44 ± 0,10	1,50 ± 0,26

#### Reparación del fotoenvejecimiento

Dado que el ácido retinoico ejerce una acción reparadora sobre la piel fotoenvejecida (Kligman J. Am. Acad. Dermatol 15, 779-785, 1986), se ha evaluado comparativamente la eficacia de una suspensión de liposomas de ácido retinoico al 0,01% p/p preparada según el ejemplo 2 y la de una crema O/W de ácido retinoico al 0,025% p/p. Para ello se ha aplicado ácido retinoico según las dos formas galénicas a diferentes ejemplares de ratones sin pelo (SKh-1 hembras, de 5-6 semanas de edad), previamente fotoenvejecidos por los efectos de la radiación UV (irradiación durante 5 min,

3 días por semana durante 12 semanas con una lámpara UV Vilbert VL-6M, mantenida a 10 cm de la piel). Los productos se han aplicado 3 veces a la semana, durante 12 semanas.

Los estudios histológicos y prefilométricos realizados comparando la piel de los animales irradiados, la de los irradiados y posteriormente tratados y la de los no irradiados, demuestran que el ácido retinoico incorporado en liposomas repara notablemente los efectos de la radiación.

Estos estudios han permitido evaluar la mayor eficiencia del tratamiento del ácido retinoico incorporado en liposomas respecto a la crema de ácido retinoico.

Para conseguir resultados de tratamiento con la crema de ácido retinoico parecidos a los conseguidos con liposomas, ha sido preciso utilizar cremas con una concentración de ácido retinoico 2,5 veces mayor que en los liposomas. Esto demuestra que la incorporación del ácido en liposomas permite una mejor difusión del producto y por lo tanto permite disminuir la dosis en el tratamiento.

#### Poder antiarrugas del palmitato de retinol en liposomas.

Se ha evaluado comparativamente el poder antiarrugas del palmitato de retinol en liposomas al 0,3% p/p preparado según el ejemplo 8 y en crema O/W, en ratones sin pelo Rhino.

Se ha aplicado palmitato de retinol en las dos formas galénicas al 0,3% a estos animales una vez al día, durante 3 semanas.

Los estudios perfilométricos realizados comparando la piel de los animales tratados con crema, con liposomas, con placebos y no tratados, demuestran que la incorporación de palmitato de retinol en liposomas confiere a esta vitamina una cierta acción tipo ácido retinoico, que se refleja en la importante disminución de las arrugas del ratón Rhino. Esta acción es inapreciable en los ratones tratados con palmitato de retinol incorporada en la crema O/W.

#### Poder comedolítico del palmitato de retinol en liposomas

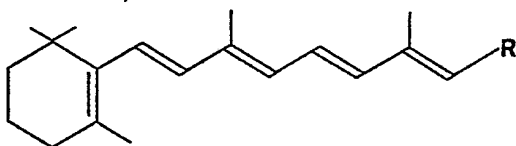
Se ha evaluado comparativamente el poder comedolítico del palmitato de retinol en liposomas al 0,3% p/p preparado según el ejemplo 8 y en crema O/W, en ratones sin pelo Rhino.

Se ha aplicado palmitato de retinol en las dos formas galénicas al 0,3% a estos animales una vez al día, durante 3 semanas.

Los estudios histológicos realizados con microscopía electrónica de rastreo comparando la piel de los animales tratados con crema, con liposomas, con placebos y no tratados, demuestran que la incorporación de palmitato de retinol en liposomas confiere a esta vitamina una cierta acción tipo ácido retinoico, que se refleja en la importante disminución del diámetro de los comedones del ratón Rhino. Esta acción es inapreciable en los ratones tratados con palmitato de retinol incorporada en la crema O/W.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de liposomas de retinoides, de fórmula I



donde R significa  $\text{COOH}$  ó  $\text{CH}_2 - \text{OCO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ , caracterizado porque una mezcla de uno de dichos retinoides en un medio líquido se añade a unos fosfolípidos.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos fosfolípidos constituyen una suspensión de liposomas que es objeto de agitación.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha mezcla es una disolución y dicho medio líquido es un solvente orgánico cuyo punto de ebullición es menor de  $100^\circ\text{C}$ .

4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque dichos fosfolípidos están constituidos por el residuo resultante de una evaporación a sequedad de una suspensión formada por una primera solución de fosfatidilcolina de huevo (EPC) y una segunda solución de ácido fosfatídico de huevo (EPA), dicha suspensión teniendo una concentración de fosfolípidos de por lo menos  $6 \text{ mg/ml}$  y una relación molar EPC/EPA comprendida entre 9 y 36, de modo que la adición de dicha solución a dicho residuo origina una resuspensión.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque dicha resuspensión recibe la adición de una solución de tampón fosfato, de lo que resulta una mezcla que es objeto de sonicación, proporcionando una emulsión homogeneizada, que es sometida a evaporación a baja

presión obteniéndose una suspensión de liposomas, cuyo tamaño se homogeneiza por medio de extrusiones sucesivas a través de membranas calibradas.

6. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicha suspensión de liposomas es el resultado de las siguientes etapas: a) formación de una suspensión de fosfolípidos a partir de una primera solución de fosfatidilcolina de huevo (EPC) y una segunda solución de ácido fosfatídico de huevo (EPA), dicha suspensión teniendo una concentración de fosfolípidos de por lo menos  $6 \text{ mg.ml}^{-1}$  y una relación molar EPC/EPA comprendida entre 9 y 36; b) adición de una solución de tampón fosfato, resultando una mezcla; c) sonicación de dicha mezcla obteniendo una emulsión homogeneizada; y d) evaporación de dicha emulsión, de lo que resulta una suspensión de liposomas, cuyo tamaño se homogeneiza por medio de extrusiones sucesivas a través de membranas calibradas.

7. Procedimiento según la reivindicaciones 4 o 6, caracterizado porque dichas primera y segunda solución son el cloroformo.

8. Procedimiento según las reivindicaciones 5 o 6, caracterizado porque dichas membranas calibradas son de policarbonato, son tres y sus poros son respectivamente de  $0,8$ ,  $0,4$ , y  $0,2 \mu\text{m}$ .

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se efectúa la incorporación de agentes antioxidantes a la suspensión de liposomas.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque dichos agentes antioxidantes son butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol o acetato de alfa-tocoferol.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la suspensión de liposomas recibe una adición de sacarosa, seguida de una liofilización.