

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 886**

51 Int. Cl.:
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02774210 .5**
96 Fecha de presentación: **13.11.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1443900**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2004**

54 Título: **Composiciones que transportan lípidos con una mejor estabilidad sanguínea**

30 Prioridad:
13.11.2001 US 331248 P
09.07.2002 US 394271 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.10.2012

73 Titular/es:
CELATOR PHARMACEUTICALS, INC.
303B COLLEGE ROAD EAST
PRINCETON, NJ 08540, US

72 Inventor/es:
WEBB, Murray;
TARDI, Paul;
MAYER, Lawrence D. y
ICKENSTEIN, Ludger M.

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 387 886 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

Composiciones que transportan lípidos con una mejor estabilidad sanguínea

Referencia cruzada con otras solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la patente EE.UU. con número de serie 60/394.271, presentada el 9 de julio de 2002, y de la patente EE.UU. con número de serie 60/331.248, presentada el 13 de noviembre de 2001. Los contenidos de dichas solicitudes se incorporan en esta memoria por referencia.

Campo técnico

La presente invención hace referencia a composiciones liposomales que tienen una vida útil en circulación larga. Estos liposomas incluyen la incorporación de lípidos cargados negativamente que no tienen iones zwitteriónicos.

10 Antecedentes del estado de la técnica

15 Los liposomas son vehículos de distribución preparados para dispersiones acuosas de lípidos anfipáticos dispuestos en una o más bicapas en torno a un núcleo central acuoso. Los solutos pueden estar atrapados en el compartimento acuoso interno lo que les protege así de la reacción con componentes de la sangre. Con objeto de distribuir efectivamente un agente atrapado a un punto objetivo, es deseable que un liposoma exhiba una longevidad en circulación óptima y la retención de un agente encapsulado.

20 Las propiedades farmacológicas de los liposomas pueden modificarse cambiando los tipos de lípidos incorporados en la membrana. Los liposomas compuestos de lípidos neutros (sin carga neta) se usan habitualmente debido a que son estables a la exposición a las numerosas proteínas, carbohidratos y componentes lípidos presentes en el compartimento sanguíneo. La incorporación de lípidos cargados negativamente como la fosfatidilserina en composiciones liposomales ha llevado a un aumento en el reconocimiento y a la eliminación de liposomas en circulación. Kirby, et al., Biochem. J. (1980) 186: 591-598. Así, se reduce el transporte de medicamentos al lugar donde se localiza la enfermedad. Allen, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 85: 8.061-8.071.

25 Una comparación de los tiempos de vida en circulación de los liposomas que contienen fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, cardiolipina y fosfatidilserina reveló que los liposomas con fosfatidilserina fueron eliminados rápidamente de la circulación mientras que los liposomas con cardiolipina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol se eliminaban a una velocidad reducida en ratas (Kao, Y, et al., J.Pharm.Sci (1980) 69:1.338-1.349).

30 Aunque se ha reconocido que determinados liposomas cargados negativamente podrían tener utilidad en aplicaciones *in vivo*, el uso de estos lípidos para proporcionar propiedades en circulación largas sólo ha sido reconocido recientemente el documento WO99/594547. Estos estudios han descrito que la incorporación de fosfatidilglicerol en liposomas que contienen colesterol/DP-PC condujo a una estabilidad en sangre mejorada. Estas investigaciones también describieron, no obstante, que el % en moles de incorporación del lípido dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) tenía influencia en las propiedades de circulación del portador ya que los liposomas colesterol/DPPC preparados con menos de 10 % en moles de DMPG mostraban una estabilidad en sangre aumentada en relación con aquellos que tenían más de 10 % en moles DMPG. También se observó que los componentes como diestaroilfosfatidilcolina (DSPC) y dimiristoil-fosfatilcolina (DMPC) poseen propiedades indeseables y por lo tanto no fueron incluidas en estas formulaciones.

35 Las preparaciones liposomales que contienen fosfatidilglicerol junto a lípidos formadores de vesículas adicionales se describen en Brodt, P., et al., Cancer Immunol. Immunother. (1989) 28:54-58 y por Hope, et al., patente EE. UU. Número 6.139.871. En estas preparaciones, no obstante, el lípido cargado negativamente emparejado con un fragmento hidrofílico que no es zwitteriónico, ejemplificado por PG, está presente en una proporción inferior al 10 % en moles. Similarmente, los liposomas descritos en el documento WO99/594547 contienen menos de 10% en moles de PG. Los liposomas descritos por Akhtar, S., et al., Nucleic Acids Res. (1991) 19:5551-5559 y por Ahl, P.L., et al., Biochim. Biophys. Acta (1997) 1329:370-382 y por Farmer, M.C., et al., Meth. Enzymol. (1987) 149:184-200 contienen cantidades considerables de colesterol, a diferencia de los liposomas de la presente invención. Adicionalmente, los liposomas de Akhtar presentan temperaturas de transición inferiores a 38°C ya que las cadenas acilo contenidas en los fosfolípidos empleados contienen menos de 18 átomos de carbono.

40 La patente EE.UU. 5.415.869 describe formulaciones de taxol contenidas en liposomas que pueden contener fosfatidilcolinas y fosfatidilgliceroles. No hay ninguna sugerencia de que los liposomas tengan vidas útiles en circulación ampliadas, tampoco se indica que se prefieren temperaturas de transición superiores a 38°C.

50 La patente E.E.U.U. 4.769.250 describe formulaciones hechas de mezclas de fosfolípidos aniónicos y neutros incluyendo DSPG y DSPC; no obstante, estos liposomas son SUVs con dimensiones de 45-55 nm.

Se han añadido crioprotectores a las preparaciones liposomales con objeto de evitar los efectos perjudiciales debidos a la congelación y la congelación-secado (liofilización). Los disacáridos como trehalosa, sacarosa, lactosa,

sorbitol, manitol, sacarosa, maltodextrina y dextrano son los crioprotectores más usados habitualmente (véanse el documento WO01/05372 y la patente EE.UU. número 5.077.056).

Los crioprotectores unidos a membranas se han utilizado con el objetivo mejorar aún más la resistencia al daño por congelación y por secado - congelación. En particular, los azúcares unidos a las superficies de membrana de los liposomas mediante oligo-ligandos (óxido de etileno) que existen en tres unidades repetitivas sobre las que se ha informado que son crioprotectoras (Bendas, et al., Eur.J.Pharm. Sci. (1996)4:211-222; Goodrich, et al., Biochemistry (1991) 30:5313-5318; patente E.E.U.U. número 4.915.951). Baldeschwieler, et al., informaron de que en ausencia del grupo azúcar terminal, los liposomas preparados con el ligando de óxido de oligoetileno por sí mismo eran incapaces de proteger frente a la fusión que sigue a la congelación (véase la patente EE.UU. número 4.915.951).

La inclusión de colesterol en las membranas liposomales ha mostrado que reduce la liberación de medicamentos tras la administración intravenosa (por ejemplo, véase las patentes EE.UU. números 4.756.910, 5.077.056, y 5.225.212; Kirby, C., et al., Eur. J. Nucl. Med. (1989) 15:617). Generalmente, el colesterol aumenta el espesor y la fluidez de la bicapa a la vez que disminuye la permeabilidad de la membrana, las interacciones entre proteínas, y la desestabilización de las lipoproteínas del liposoma. Las aproximaciones convencionales a las formulaciones de liposomas dictan la inclusión en los liposomas de cantidades considerables (p. ej., 30-45% en moles) de colesterol o de agentes de rigidización de membranas equivalentes (como otros esteroides) dentro de los liposomas.

Descripción de la invención

Esta invención describe por tanto un liposoma que comprende: un lípido cargado negativamente que tiene un fragmento hidrofóbico con una fracción neutra no zwitteriónica unida al fragmento hidrofílico del lípido. En particular, los liposomas como se describen en esta memoria están sustancialmente libres de colesterol. Los liposomas típicamente contendrán un agente activo biológicamente. Los liposomas de la invención presentan sorprendentemente una longevidad en circulación mejorada en la corriente sanguínea.

El lípido cargado negativamente es típicamente un fosfolípido o un esfingofosfolípido. Preferentemente, el lípido es un fosfolípido; esto es, un glicerol al que se unen dos grupos acilo y en el que el tercer hidroxilo está acoplado a un fosfato. La fracción no zwitteriónica está unida a este lípido cargado negativamente, preferentemente al grupo fosfato. Preferentemente, la fracción no zwitteriónica es neutra de forma que la carga neta negativa de un lípido utilizado en esta invención se debe solamente a la carga negativa del componente lipídico.

La fracción no zwitteriónica puede comprender grupos funcionales que proporcionen una hidrofilia deseada en el lípido, dichos grupos se seleccionan de entre alcoholes, cetonas, ácidos carboxílicos, éteres y aminas. Una fracción no zwitteriónica preferida es un alcohol de cadena corta como el glicerol, un ciclitol como el inositol, o un óxido de polialqueno como el PEG.

En una realización, el liposoma comprende más del 10% en moles de uno o más de los mencionados lípidos que previenen la agregación- esto es, los lípidos cargados negativamente que comprenden una fracción no - zwitteriónica, como se describe anteriormente; y hasta 90 % en moles de uno o más lípidos formadores de vesículas, en la que el liposoma no contiene sustancialmente nada de colesterol. Preferiblemente, la fracción no zwitteriónica es un alcohol de cadena corta como glicerol, o es un ciclitol como el inositol, o un óxido de polialqueno. Más preferiblemente, los lípidos formadores de vesículas que conforman el liposoma se seleccionan de forma que la temperatura de transición de fase sea superior a 38°C, preferiblemente al menos 40°C. Preferiblemente, las dimensiones de los liposomas son del orden de 80 - 200 nm \pm 25 nm. En relación con la protección frente al daño por congelación, debe estar presente tan sólo un 1% de los lípidos que previenen la agregación.

Para el almacenamiento, los liposomas de la invención pueden estar congelados o liofilizados, y pueden comprender crioprotectores. La cantidad de crioprotector usada depende del tipo de crioprotector y de las características de liposoma a proteger. Un experto en la técnica puede ensayar fácilmente varios tipos de crioprotectores y concentraciones para determinar que tipo de crioprotector y concentración funciona mejor para una preparación de liposomas determinada. En general, se ha encontrado que son necesarias concentraciones de azúcar del orden de 100 mM y superiores para alcanzar el nivel más alto de protección. En términos de moles de fosfolípidos de membrana, niveles milimolares del orden de 100 mM corresponden aproximadamente a 5 moles de azúcar por mol de fosfolípido.

Los liposomas de la presente invención pueden no contener sustancialmente ningún crioprotector. El término "sustancialmente ningún crioprotector" hace referencia a liposomas que comprenden menos de 20 mM de un crioprotector o menos de 10 mM de crioprotector. En el caso de que estén presentes diferentes concentraciones de crioprotector en el interior y el exterior del liposoma, la máxima concentración presente en el exterior o el interior se toma como concentración a la que se hace referencia en estas definiciones.

En el caso de que los liposomas de la presente invención vayan a congelarse, es preferible, aunque no se requiere, que los liposomas estén sustancialmente libres de colesterol y que comprendan conjugados de polímeros de lípidos hidrofílicos, particularmente aquellos mayores de alrededor de 125 daltons y que estos liposomas sean resistentes a la fusión y a la fuga del agente subsiguiente a la congelación. De esta forma, si los liposomas van a congelarse,

5 contendrán en torno a 1-30 % en moles de uno o más lípidos conjugados con polímeros hidrofílicos y hasta un 99 % en moles de uno o más lípidos formadores de vesículas, y sustancialmente nada de colesterol. Preferiblemente, el conjugado lípido - polímero hidrofílico es un conjugado lipídico de PEG. Los liposomas pueden contener crioprotectores como trehalosa, maltosa, sacarosa, glucosa, lactosa, dextrano o aminoglicósidos. Se prefiere particularmente la glucosa.

Los liposomas pueden estar congelados hasta alrededor de -5°C, preferiblemente por debajo de alrededor de -10°C y más preferiblemente por debajo de -20°C. Los liposomas pueden ser liofilizados cuando se congelan.

La presente invención proporciona por tanto

10 Una composición que comprende liposomas que contienen al menos un agente biológicamente activo en el que dichos liposomas tienen un diámetro medio de 80-200 nm +/- 25 nm; y tienen una temperatura de transición (T_c) de al menos 38 °C,

(a) en la que la(s) bicapa(s) de dichos liposomas consiste(n) esencialmente en:

(i) uno o más lípidos formadores de vesículas, que son fosfolípidos o esfingolípidos

15 (ii) al menos 1% en moles de uno o más ácidos fosfatídicos cada uno acoplado con un fragmento no - zwitteriónico que es un alcohol, una cetona, un éster, un éter, una amida, un aldehído, un ciclitol o un sacárido;

(iii) de un 5 % a un 20 % en moles de colesterol; o

(b) en el que la(s) bicapa(s) ordenada(s) de dichos liposomas consiste(n) esencialmente en:

(i) uno o más lípidos formadores de vesículas, que son fosfolípidos o esfingolípidos

20 (ii) al menos 1% en moles de uno o más ácidos fosfatídicos cada uno acoplado con un fragmento no - zwitteriónico;

(iii) de un 5 % en moles a un 20 % en moles de colesterol; y

en los que el agente activo mencionado en 1(a) y 1 (b) está asociado con la(s) bicapa(s) ordenada(s) o está encapsulado dentro de un espacio acuoso confinado definido por la(s) mencionada(s) bicapa(s) ordenada(s).

25 También el uso de la composición de la presente invención en la preparación de un medicamento para su uso en un método para administrar un agente biológico a un sujeto con necesidad de dicho agente.

Además la presente invención proporciona un método para conservar una composición de liposoma que comprende congelar o liofilizar la composición de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

30 La Figura 1A es un gráfico que muestra el porcentaje de lípidos que permanecen en sangre después de la administración intravenosa de liposomas cargados con daunorubicina que contienen DSPC/DSPG en relaciones molares de 90:10 (círculos rellenos), 80:20 (círculos blancos/abiertos) y 70:30 (triángulos invertidos).

La Figura 1B es un gráfico que muestra el porcentaje de daunorubicina que permanece en la sangre después de la administración intravenosa de liposomas cargados con daunorubicina que contienen DSPC/DSPG en relaciones molares de 90:10 (círculos rellenos), 80:20 (círculos blancos/abiertos) y 70:30 (triángulos invertidos).

La Figura 2 es un gráfico que muestra la relación FUDR a lípido en varios puntos temporales después de la administración intravenosa de liposomas DSPC/DSPG (razón molar 80:20) y DSPC/Col (razón molar 55:45) con FUDR atrapado pasivamente.

40 La Figura 3 es un gráfico que muestra el efecto del contenido en colesterol en el porcentaje inicial de la relación FUDR - lípido en varios puntos temporales de la administración intravenosa de liposomas DSPC/DSPG co-cargados con FUDR e irinotecan. Los liposomas contenían colesterol a 5 % en moles (círculos rellenos), 10 % en moles (círculos sin relleno) y 20 % en moles (triángulos invertidos, sin relleno) y los niveles de DSPG se mantuvieron constantes al 20 % en moles.

45 La Figura 4 es un gráfico que muestra el porcentaje de lípido inyectado en la sangre que permanece tras la administración intravenosa de liposomas que contienen DSPC/ DPPG en relaciones molares 90:10 (círculos rellenos), 80:20 (círculos sin relleno) y 70:30 (triángulos invertidos).

La Figura 5 es un gráfico que muestra el porcentaje de lípido inyectado en la sangre que permanece tras la administración intravenosa de liposomas que contienen DSPC/PI (vegetal hidrogenado) en relaciones molares 90:10 (círculos rellenos), 80:20 (círculos sin relleno) y 70:30 (triángulos invertidos).

La Figura 6A es un histograma que muestra el tamaño de los liposomas DSPC/DSPG (razón molar 80:20) co-cargados con FUDR e irinotecan antes de la congelación después de la carga de ambos medicamentos, después de la congelación a -20°C durante 24 horas seguida de descongelación a temperatura ambiente y después de la congelación a -70°C durante 24 horas seguida de descongelación a temperatura ambiente.

- 5 La Figura 6B es un histograma que muestra la relación FUDR - lípido de liposomas DSPC/DSPG (razón molar 80:20) co-cargados con FUDR e irinotecan antes de la congelación posterior a la carga de ambos medicamentos, después de la congelación a -20°C durante 24 horas seguida de descongelación a temperatura ambiente y después de la congelación a -70°C durante 24 horas seguida de descongelación a temperatura ambiente.

- 10 La Figura 6C es un histograma que muestra la relación irinotecan-lípido de liposomas DSPC/DSPG (razón molar 80:20) co-cargados con FUDR e irinotecan antes de la congelación posterior a la carga de ambos medicamentos, después de la congelación a -20°C durante 24 horas seguida de descongelación a temperatura ambiente y después de la congelación a -70°C durante 24 horas seguida de descongelación a temperatura ambiente.

- 15 La Figura 7 es un histograma que muestra el tamaño de los liposomas que contienen un tampón de citrato 300 mM tanto dentro como fuera de la a membrana liposomal previo a (barra negra) y subsecuente a (barra gris) la congelación durante 24 horas. Se ensayaron liposomas que consistían en DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles), DPPC/colesterol (55:45 % en moles) y DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles).

- 20 La Figura 8 es un histograma que muestra el tamaño de los liposomas que contienen un tampón de citrato 300 mM tanto dentro como fuera de la a membrana liposomal previo a (barra negra) y subsecuente a (barra gris) la congelación durante 24 horas. Se ensayaron liposomas que consistían en DSPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles), DSPC/colesterol (55:45 % en moles) y DSPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5% mol).

La Figura 9 es un histograma que muestra el tamaño de los liposomas que contienen HBS tanto dentro como fuera de la a membrana liposomal previo a (barra negra) y subsecuente a (barra gris) la congelación durante 24 horas. Se ensayaron liposomas que consistían en DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % mol), DPPC/colesterol (55:45 % mol) y DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles).

- 25 La Figura 10 es un histograma que muestra el tamaño de los liposomas que contienen HBS tanto dentro como fuera de la a membrana liposomal previo a (barra negra) y subsecuente a (barra gris) la congelación durante 24 horas. Se ensayaron liposomas que consistían en DSPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % mol), DSPC/colesterol (55:45 % mol) y DSPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 mol).

- 30 La Figura 11 es un histograma que muestra el tamaño de los liposomas que contienen HBS tanto dentro como fuera de la a membrana liposomal previo a (barra negra) y subsecuente a (barra gris) la congelación durante 24 horas. Se ensayaron liposomas que consistían en DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % mol), DPPC/colesterol (55:45 % mol) y DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 mol).

- 35 La Figura 12 es un histograma que muestra el tamaño de los liposomas previo a (barra negra) y subsecuente a (barra gris) la congelación durante 24 horas. Se ensayaron liposomas que consistían en DAPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % mol).

La Figura 13 es un histograma que muestra el tamaño de los liposomas que contienen citrato a pH 4,0 en el interior y HBS en el exterior de la membrana liposomal previo a (barra negra) y subsecuente a (barra gris) la congelación durante 24 horas. Se ensayaron liposomas que consistían en DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles), y DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles).

- 40 La Figura 14 es un histograma que muestra el tamaño de los liposomas que contienen citrato a pH 4,0 en el interior y HBS en el exterior de la membrana liposomal previo a (barra negra) y subsecuente a (barra gris) la congelación durante 24 horas. Se ensayaron liposomas que consistían en DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles), y DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles).

- 45 La Figura 15 es un histograma que muestra el tamaño de los liposomas que contienen glucosa encapsulada previo a la congelación (barra negra) y subsecuente a la congelación (barra gris) durante 24 horas. Se ensayaron liposomas que consistían en DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles), y DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles).

- 50 La Figura 16 es un histograma que muestra el porcentaje de encapsulación de glucosa en liposomas previo a la congelación (barra negra) y subsecuente a la congelación (barra gris) durante 24 horas. Se ensayaron liposomas que consistían en DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles), y DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles).

La Figura 17 es un histograma que muestra el tamaño de los liposomas DPPC/DSPE-PEG 2000 que contienen doxorubicina encapsulada previo a la congelación (barra negra) y subsecuente a la congelación (barra gris) durante 24 horas (panel izquierdo) y el porcentaje de retención de doxorubicina (panel derecho).

La Figura 18 es un histograma que muestra el porcentaje de encapsulación de doxorubicina en liposomas DPPC/DSPE-PEG 2000 (95:5 % en moles) durante la carga en función del tiempo. La carga se realizó previa a (círculos rellenos) y subsecuente a la congelación (círculos sin relleno).

5 La Figura 19 es un histograma que muestra el porcentaje de encapsulación de doxorubicina en liposomas DSPC/DSPE-PEG 2000 (95:5 % mol) durante la carga en función del tiempo. La carga se realizó previa a (círculos rellenos) y subsecuente a la congelación (círculos sin relleno).

Formas de llevar a cabo la invención

10 “Liposoma” como se usa en la presente memoria quiere decir vesículas compuestas de una o varias bicapas de lípidos ordenadas concéntricamente que encapsulan una fase acuosa. La formación de dichas vesículas requiere de la presencia de “lípidos formadores de vesículas” que son lípidos anfipáticos capaces de asumir o ser incorporados dentro de una estructura en bicapa. Esto incluye aquellos lípidos que son capaces de formar una bicapa por sí mismos o en combinación con otro u otros lípidos. Se incorpora un líquido anfipático en un a bicapa lipídica manteniendo en contacto su fracción hidrofóbica con el interior, la región hidrofóbica de la membrana de la bicapa y su fracción de cabeza polar se orienta hacia una superficie polar, exterior de la membrana. La mayoría de los fosfolípidos pertenecen al primer tipo de lípidos formadores de vesículas mientras el colesterol es un representante de este último tipo.

15 Los lípidos formadores de vesículas adecuados que pueden ser incorporados en los liposomas o portadores de lípidos de esta invención pueden seleccionarse de entre una variedad de lípidos anfipáticos, que típicamente incluyen fosfolípidos como fosfatidilcolina (PC, de sus siglas en inglés) y, esfingofosfolípidos como la esfingomielina. En esta especificación, los términos “bruto” o “estructural” haciendo referencia a un lípido quieren decir un lípido formador de vesículas que contribuye a la estructura de un liposoma.

20 Los liposomas preparados de acuerdo a esta invención pueden prepararse mediante técnicas convencionales utilizadas para preparar vesículas. Estas técnicas incluyen el método de inyección de éter (Deamer, et al., Acad. Sci (1978) 308:250), el método del tensioactivo (Brunner, et al., Biochim. Biophys. Acta (1976) 455:322), el método de congelación-descongelación (Pick, et al., Arch. Biochim. Biophys. (1981) 212: 186), el método de evaporación de fase inversa (Skoza, et al., Biochim. Biophys. Acta (1980) 601:559-571), el método de tratamiento ultrasónico (Huang, et al., Biochemistry (1969) 8:344), el método de inyección de etanol (Kremer, et al., Biochemistry (1977) 16:3932), el método de extrusión (Hope, et al., Biochim. Biophys. Acta (1985) 812:55-65) y el método de la prensa francesa (Barenholz, et al., FEBS Lett. (1979) 99:210). Estos procesos pueden usarse en combinación o modificados. Las vesículas unilamelares pequeñas (SUVs, de sus siglas en inglés) pueden prepararse mediante el método de tratamiento ultrasónico, el método de inyección de etanol y el método de la prensa francesa. Preferiblemente, las vesículas multilamelares (MLVs, de sus siglas en inglés) se preparan mediante el método de evaporación de fase inversa o mediante la simple adición de agua a una capa de lípido seguida de dispersión por agitación mecánica (Bangham, et al., J. Mol. Biol. (1965) 13: 238 - 252).

35 Una preparación de liposomas particularmente adecuada que puede ser usada en la realización práctica de la invención son las vesículas lamelares grandes (LUVs, de sus siglas en inglés). Las LUVs pueden prepararse mediante el método de inyección de éter, el método del tensioactivo, el método de congelación - descongelación, el método de evaporación de fase inversa, el método de la prensa francesa o el método de extrusión. Preferiblemente, las LUVs se preparan conforme al método de extrusión. El método de extrusión implica combinar primero lípidos en cloroformo para conseguir la relación molar deseada. Puede añadirse opcionalmente un marcador de lípidos a la preparación de lípidos. La mezcla resultante se seca en una corriente de vapor de nitrógeno en fase gas y se coloca en una bomba de vacío en la que se elimina sustancialmente el disolvente. Las muestras se hidratan después en un tampón adecuado o una mezcla de agente o agentes terapéuticos. La mezcla se pasa después por un equipo de extrusión para obtener liposomas de un tamaño promedio definido. El tamaño promedio de los liposomas puede determinarse mediante dispersión de la luz cuasi-elástica utilizando, por ejemplo, un clasificador de tamaños de partícula submicrónicas NICOMP™ 370 a una longitud de onda de 632,8 nm.

45 Los liposomas que “no contienen sustancialmente nada de colesterol” pueden contener una cantidad de colesterol que es insuficiente para alterar significativamente las características de transición de fase del liposoma (típicamente menos de un 20 % en moles colesterol). Un 20 % en moles o más de colesterol aumenta el rango de temperaturas a la que ocurre la transición entre fases, con la transición de fase desapareciendo a niveles de colesterol más altos. Preferiblemente, un liposoma que no contiene sustancialmente nada de colesterol tendrá alrededor de un 15 o menos y más preferiblemente alrededor de un 10 o menos de colesterol en % en moles, más preferiblemente alrededor de un 5 o menos en % en moles, o alrededor de un 2 o menos en % en moles o alrededor de un 1 o menos en % en moles de colesterol. También, puede no estar presente o no añadirse nada de colesterol cuando se preparan liposomas “libres de colesterol”.

55 Los términos “lípido que está cargado negativamente a pH fisiológico” o “lípido cargado negativamente” se refieren a lípidos formadores de vesículas que tienen una o más cargas eléctricas negativas a pH fisiológico. Los lípidos cargados negativamente adecuados para su uso en esta invención pueden ser fosfolípidos o fosfoesfingolípidos. Pueden incorporarse al liposoma lípidos cargados negativamente que comprendan fracciones no zwitteriónicas a

razones del 5 al 95 % en moles, más preferiblemente del 10 al 50 % en moles, y más preferiblemente del 15 al 30 % en moles. La "fracción no zwitteriónica" se refiere a una fracción que no tiene cargas eléctricas opuestas a pH fisiológico, pero que es hidrofílica.

5 La carga eléctrica neta negativa en un lípido usado en esta invención puede surgir solamente desde la presencia de carga eléctrica en el lípido cargado negativamente (p. ej., en el grupo fosfato) o la carga eléctrica negativa adicional puede ser debida a la presencia de grupos cargados negativamente que residen en la fracción no zwitteriónica. Preferiblemente, la carga negativa neta surge de la presencia en el lípido de uno o más grupos cargados negativamente, en cuyo caso la fracción no zwitteriónica es un grupo neutro. Preferiblemente, la fracción no zwitteriónica comprende de 2 a 6 átomos de carbono.

10 Las fracciones no zwitteriónicas contienen grupos funcionales captadores de electrones que le imparten al grupo de cabeza características hidrofílicas. Dichos grupos funcionales pueden seleccionarse del grupo que consiste en alcoholes, ácidos, cetonas, ésteres, éteres, amidas y aldehídos. También pueden usarse sacáridos con este propósito.

15 Los monosacáridos incluyen arabinosa, fucosa, galactosa, glucosa, lixosa, manosa, ribosa y xilosa. Los disacáridos incluyen sacarosa, glucosa, trehalosa, celobiosa, gentobiosa y maltosa. Se prefieren los monosacáridos y disacáridos que no se unen a receptores celulares ya que la eliminación aumentada de los liposomas de la circulación puede resultar de la unión de un liposoma a la superficie de la célula.

Cuando la fracción no zwitteriónica se selecciona para ser neutra a pH fisiológico, se elige la incorporación de grupos no ionizables como alcoholes, cetonas, ésteres, éteres, amidas y aldehídos.

20 La fracción no zwitteriónica puede ser un alcohol de cadena corta, un alcohol preferido es el que contiene dos o más grupos hidroxilo. El alcohol puede ser un polialcohol de cadena lineal del que el glicerol es un ejemplo, que está unido a un fosfato de un fosfolípido por medio de un grupo hidroxilo terminal de la molécula de glicerol, la molécula resultante se denomina fosfatidilglicerol (PG, de sus siglas en inglés). Preferiblemente las cadenas de ácidos grasos de fosfatidilglicerol son independientemente caproílo (6:0), octanoílo (8:0), caprílo (10:0), laurilo (12:0), miristoílo (14:0), palmitoílo (16:0), estearoílo (18:0), araquidoílo (20:0), behenoílo (22:0), lignoceroílo (24:0) o fitanoílo, incluyendo las versiones insaturadas de estas cadenas de ácidos grasos en las configuraciones cis o trans como oleoílo (18:1), linoleílo (18:2), araquidonoílo (20:4) y docosahexanoenolino (22:6). Se prefieren los fosfolípidos que tienen dos cadenas acilo de 14 a 18 átomos de carbono. En todo caso, la naturaleza de los sustituyentes hidrofóbicos del lípido cargado negativamente es tal que la temperatura de cambio de fase del liposoma es superior a alrededor de 38 °C, preferiblemente superior a alrededor de 40 °C.

35 La fracción no zwitteriónica puede ser además un polímero para formar un "conjugado lípido – polímero hidrofílico". Este término hace referencia a un lípido formador de vesículas unido covalentemente en su fracción de cabeza polar a un polímero hidrofílico, y está típicamente hecho a partir de un lípido que tiene un grupo reactivo funcional en la fracción de cabeza polar con el fin de unirse al polímero. Son grupos funcionales reactivos adecuados por ejemplo, amino, hidroxilo, carboxilo o formilo. El lípido puede ser cualquier lípido descrito en la técnica para su uso en dichos conjugados como fosfolípidos, esfingolípidos y ceramidas. Preferiblemente, el lípido es un fosfolípido como PC, PE, PA o PI, que tiene dos cadenas acilo que comprenden alrededor de 6 a 24 átomos de carbono de longitud con grados de insaturación variables. El lípido en el conjugado puede, por ejemplo, ser un PE, preferiblemente con la forma diestearoílo. El polímero es un polímero biocompatible caracterizado por una solubilidad en agua que permite a las cadenas de polímeros extenderse efectivamente más allá de la superficie del liposoma con la flexibilidad suficiente que produce un recubrimiento uniforme de la superficie de un liposoma. Preferiblemente, el polímero es un poliaquiléter, que incluye polimetilenglicol, polihidroxipropilenglicol, polipropilenglicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poliacrílico y copolímeros de los mismos, así como aquellos que se describen en las patentes de Estados Unidos 5.013.556 y 5.395.619. Un polímero preferido es polietilenglicol (PEG). El conjugado puede ser preparado para incluir un enlace lípido-polímero liberable como un enlace péptido, éster o disulfuro. El conjugado puede incluir también un ligando marcador. Para su uso en esta invención se pueden incorporar mezclas de conjugados dentro de los liposomas.

El término "lípido conjugado PEG" como se usa en la presente memoria se refiere al conjugado polímero-lípido hidrofílico definido anteriormente en el que el polímero es PEG.

50 Un conjugado polímero-lípido hidrofílico u otro lípido cargado negativamente que no contenga un ion zwitteriónico puede prepararse para incluir un enlace lípido-polímero liberable como un enlace péptido, éster o disulfuro que puede ser escindido bajo condiciones fisiológicas selectivas como exponer una superficie transportadora de LUV una vez que se haya conseguido la biodistribución deseada, como se describe en la patente de Estados Unidos nº 6.043.094; o, en Kirpotin, D., et al., FEBS Letters (1996) 388:115-188.

55 Un conjugado polímero-lípido hidrofílico puede incluir también un ligando marcador unido al extremo libre del polímero para dirigir el liposoma a células específicas. Los derivados de polietilenglicol que permiten la conjugación de un ligando marcador son por ejemplo, metoxi (hidrazido) polietilenglicol y bis (hidrazido) polietilenglicol.

Los lípidos cargados negativamente pueden obtenerse a partir de fuentes naturales o pueden ser sintetizados químicamente. Los métodos para unir covalentemente compuestos al grupo de cabeza de un lípido son bien conocidos en la técnica y generalmente implican hacer reaccionar grupos funcionales en la porción terminal del grupo de cabeza del lípido con grupos funcionales en la fracción que se va a unir. Los lípidos cargados negativamente adecuados para la unión química a una fracción hidrofílica no zwitteriónica incluyen lípidos que tienen un grupo de cabeza polar que termina con un grupo reactivo como fosfato, y amina. Un ejemplo de un lípido particularmente adecuado es una fosfatidiletanolamina ya que contiene un grupo amino reactivo. Los métodos para preparar derivados de fosfatidiletanolamina se han descrito en Ahl., P., et al., *Biochim. Biophys. Acta* (1997) 1329:370-382. Los ejemplos de lípidos cargados negativamente obtenidos de fuentes naturales que ya contienen fracciones no zwitteriónicas incluyen fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol obtenidos de huevos y fuentes vegetales respectivamente.

Los liposomas pueden prepararse de forma que sean sensibles a aumentos de la temperatura en el ambiente que les rodea. La sensibilidad a la temperatura de dichos liposomas permite la liberación de compuestos atrapados en el interior del espacio acuoso de los liposomas, y/o la liberación de compuestos asociados a la bicapa de lípidos, en una zona objetivo que está o calentada (como en el procedimiento clínico de hipertermia) o que está intrínsecamente a una temperatura mayor que el resto del cuerpo (como en la inflamación). Los liposomas que permiten la liberación de compuestos de una forma dependiente de la temperatura se denominan "liposomas termosensibles" y contienen bajos niveles de colesterol. Los liposomas de la presente invención comprenden un lípido que posee temperatura de transición gel - líquido cristalino en el rango hipertérmico (p. ej., el rango de aproximadamente 38°C a aproximadamente 45°C). Se prefieren los fosfolípidos con una temperatura de transición de fase desde alrededor de 38°C a alrededor de 45°C, y se prefieren más los fosfolípidos cuyos grupos acilo son saturados. Un fosfolípido particularmente preferido es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, de sus siglas en inglés).

Los liposomas termosensibles pueden incorporar un agente superficial activo relativamente soluble en agua, como un lisolípido, en una bicapa compuesta primariamente por una molécula relativamente insoluble en agua, como un fosfolípido de cadena doble (p. ej., DPPC). La incorporación del agente superficial activo en la fase gel del componente lípido primario aumenta la liberación de contenidos desde el liposoma resultante cuando se calienta a la temperatura de transición de fase gel-líquido cristalino del lípido primario. Los agentes superficiales activos preferidos son lisolípidos, y un agente superficial activo particularmente preferido es monopalmitoilfosfatidilcolina (MPPC, de sus siglas en inglés). Son agentes superficiales activos adecuados aquellos que son compatibles con el lípido primario de la bicapa, y que se desorben cuando el lípido funde a fase líquida. Los agentes superficiales activos adicionales para su uso en bicapas de lípidos incluyen alcoholes palmitoilo, alcoholes estearoilo, monopalmitato de palmitoilo, estearoilo y glicerilo, monooleato de glicerilo, y lípidos monoacilados como esfingosina y esfingamina.

Los liposomas también pueden prepararse de forma que la temperatura de transición líquida cristalina sea mayor de 45°C. En este caso, los lípidos formadores de vesículas que constituyen el liposoma son fosfolípidos como PC o PE. El fosfolípido preferido es PC. Cuando se seleccionan lípidos, se deben tomar precauciones ya que se puede producir una separación de fases si las longitudes de la cadena acilo de estos lípidos difieren en cuatro o más grupos metileno. Preferiblemente el lípido tendrá dos ácidos grasos insaturados, las cadenas acilo de las que se seleccionan independientemente del grupo que consiste en estearoilo (18:0), nonadecanoilo (19:0), araquidoilo (20:0), hencosanoilo (21:0), behenoilo (22:0), tricosanoilo (23:0), lignoceroilo (24:0) y cerotoilo (26:0). Preferiblemente, al menos una (y más preferiblemente ambas) de las cadenas acilo será 18:0, o mayor.

Las realizaciones pueden hacer uso de liposomas que sustancialmente no tengan colesterol que tengan temperaturas de transición de fase superiores a aquellas que serían útiles para aplicaciones termosensibles (p. ej., alrededor de 45°C o más) que presentan una retención de medicamentos acentuada como se describe en el documento PCT/CA01/00655 publicado el 15 de noviembre de 2001 (incorporado aquí por referencia). Dichos liposomas incluyen liposomas libres de colesterol que tienen al menos un 60 % en moles de fosfolípidos que tienen al menos una cadena acilo de más de 18 átomos de carbono.

Las realizaciones pueden hacer uso de liposomas que están sustancialmente libres de colesterol que proporcionan una retención sistemática aumentada de agentes cuando se cargan conforme a la técnica de carga en gradiente de pH con una carga interna de tampón por debajo de alrededor de 200mM. Dichos liposomas están descritos en la patente EE.UU. 60/331.249 archivada el 13 de noviembre de 2001, que se incorpora en la presente memoria por referencia. Los agentes que demuestran una retención sistémica pobre en liposomas libres de colesterol pueden ser retenidos más establemente de acuerdo con esta realización.

Las realizaciones pueden emplear liposomas libres de colesterol que presentan una retención sistémica aumentada de agentes terapéuticos encapsulados cuando la osmolaridad del tampón interno se selecciona para ser próxima a la osmolaridad de un medio en el que los liposomas están presentes cuando se administran mediante inyección. Dichos liposomas se describen en la patente EE.UU. 60/331.249 archivada el 13 de noviembre de 2001, que se incorpora en la presente memoria por referencia. Por tanto, esta realización incluye el uso de liposomas libres de colesterol de bajo contenido en soluto y medios de inyección que contienen liposomas libres de colesterol en los que el tampón interno del liposoma se corresponde con la osmolaridad del soluto del medio.

5 La realizaciones pueden hacer uso de liposomas "termosensibles" que se desestabilicen a temperaturas que puedan ser aplicables a un paciente (p. ej., alrededor de 45°C o menos), incluyendo aquellas descritas en la patente EE.UU. 60/331.249 archivada el 13 de noviembre de 2001, que se incorpora en la presente memoria por referencia. Por tanto, esta realización puede incluir o puede resultar del uso de métodos para suministrar un agente en un lugar de interés de un sujeto mediante la administración de liposomas termosensibles que contienen un agente activo para un sujeto, permitiendo un periodo de tiempo ampliado para el liposoma, la localización del lugar de interés, y administrar subsecuentemente un tratamiento hipertérmico en el lugar de interés para producir la liberación de los contenidos del liposoma.

10 Las realizaciones pueden hacer uso de liposomas libres de colesterol que comprenden fracciones hidrofílicas conjugadas con lípidos. Dichos liposomas son resistentes a la fusión y a la pérdida de agentes subsecuente a la congelación y se describen en la patente EE.UU. 60/331.249 archivada el 13 de noviembre de 2001, que se incorpora en la presente memoria por referencia.

15 En un aspecto, los liposomas libres de colesterol son proporcionados en donde el lípido cargado negativamente se incorpora en la liposoma a una concentración superior al 10 % en moles. En este aspecto de la invención, la fracción no zwitteriónica es preferiblemente un alcohol de cadena corta como el glicerol. Más preferiblemente, los lípidos formadores de vesículas que constituyen el liposoma en esta realización de la invención se seleccionan de forma que la temperatura de transición de fase del liposoma sea mayor de alrededor de 40°C. Todas las otras características y condiciones preferidas para este aspecto de la invención son generalmente como se describe anteriormente.

20 La determinación de la longevidad en circulación de un liposoma puede llevarse a cabo mediante medios conocidos en la técnica, incluyendo los métodos descritos en los Ejemplos siguientes que implican la administración intravenosa en un animal de ensayo y controlar los niveles en sangre. La determinación puede hacerse midiendo la cantidad de un componente como un marcador radioactivo presente en un liposoma o un portador de lípidos después de la administración a un modelo animal de la enfermedad.

25 Las realizaciones pueden hacer uso de liposomas libres de colesterol que se seleccionan o están hechos para comportarse de forma comparable a liposomas que contienen colesterol a través de la incorporación de una fracción hidrofílica conjugada con un lípido como se describe en la patente EE.UU. 60/339.404 archivada el 14 de diciembre de 2001, que se incorpora en esta memoria por referencia. Tales realizaciones de la presente invención pueden incluir, o pueden resultar de el uso de métodos para preparar o seleccionar liposomas que usan un formato de ensayo basado en la comparación de la longevidad en circulación de liposomas libres de colesterol que tienen temperaturas de transición de fase levemente hipertérmicas con respecto a la temperatura corporal de un sujeto con la longevidad en circulación de un liposoma comparable que contiene colesterol. Tales composiciones de liposomas seleccionadas permiten que aumenten la estabilidad del liposoma y las propiedades de retención de medicamentos.

De esta forma la presente invención proporciona particularmente:

35 1. Una composición que comprende liposomas que contienen al menos un agente biológicamente activo dónde dichos liposomas tienen un diámetro medio entre 80-200 nm +/- 25 nm; y tienen una tempera de transición (T_c) de al menos 38 °C,

(a) en las que la(s) bicapa(s) ordenada(s) de dichos liposomas consiste(n) esencialmente en:

(i) uno o más lípidos formadores de vesículas, que son fosfolípidos o esfingofosfolípidos;

40 (ii) al menos 1 % en moles de uno o varios ácidos fosfatídicos cada uno unido a un fracción no zwitteriónica que es un alcohol, un ácido, una cetona, un éster, un éter, una amida, un aldehído, un ciclitol o un sacárido;

(iii) de un 5% a menos de un 20 % en moles de colesterol; o

(b) en las que la(s) bicapa(s) ordenada(s) de dichos liposomas consiste(n) esencialmente en:

45 (i) uno o más lípidos formadores de vesículas, que son fosfolípidos o esfingofosfolípidos;

(ii) al menos 1% de uno o varios ácidos fosfatídicos cada uno unido a una fracción no zwitteriónica;

(iii) de un 5% a menos de un 10 % en moles de colesterol; y

50 en la que el agente biológicamente activo mencionado en 1(a) y 1(b) está asociado con la(s) bicapa(s) ordenada(s) o está encapsulado dentro del espacio acuoso definido por las mencionada(s) bicapa(s) ordenada(s).

2. La composición de 1(a) en la que cada uno de los mencionados ácidos fosfatídicos unidos a la fracción no zwitteriónica es un fosfatidilglicerol (PG) o un fosfatidilinositol (PI).

3. La composición de 1(b) en la que el mencionado ácido fosfatídico unido a la fracción no zwitteriónica es un ácido fosfatídico unido a un polímero hidrofílico.
4. La composición de 3 en la que el mencionado polímero hidrofílico es polietilenglicol (PEG).
5. La composición de cualquiera de los puntos 1-4 en la que los mencionados liposomas comprenden al menos un 10 % en moles del mencionado ácido fosfatídico unido a una fracción no zwitteriónica.
6. La composición de cualquiera de los puntos 1-5 en la el mencionado lípido formador de vesículas es diestearoilfosfatidilcolina.
7. La composición de cualquiera de los puntos 1-6 en la el mencionado agente biológicamente activo comprende FUDR y/o CPT-11 y/o carboplatino.
8. La composición de cualquiera de los puntos 1-7 que es criostable en ausencia de un crioprotector.
9. La composición de cualquiera de los puntos 1-8 que está en forma congelada o crioliofilizada.
10. La composición de cualquiera de los puntos 1-9 que además contiene un excipiente farmacológicamente estable.
11. El uso de la composición de cualquiera de los puntos 1-10 en la preparación de un medicamento para su uso en un método para administrar un agente biológicamente activo a un sujeto con necesidad de dicho agente.
12. El método para conservar una composición de liposoma que comprende congelar o liofilizar la composición de cualquiera de los puntos 1-10.

Los liposomas de la invención serán útiles en la entrega de medicamentos y serán por tanto formulados para contener un agente biológicamente activo.

- Una amplia variedad de agentes pueden encapsularse en los liposomas de la presente invención. Los liposomas de esta invención también pueden congelarse con el agente encapsulado o el agente puede congelarse subsecuentemente a la congelación. El término "agente" hace referencia a fracciones químicas que pueden utilizarse en aplicaciones terapéuticas o diagnósticas. Los términos "agente terapéutico" y "medicamento" como se usan en la presente memoria se refieren a fracciones químicas usados en terapia para lo que es deseable la entrega de medicamentos basada en liposomas. Los liposomas de esta invención pueden estar encapsulados con agentes terapéuticos como agentes antineoplásicos, agentes antivirales y agentes antimicrobianos. Los términos "agente antimicrobiano" y "agente antiviral" como se usan en la presente memoria se refieren a grupos químicos que tienen efecto en el crecimiento, proliferación y supervivencia de los microbios y virus respectivamente. Los agentes antimicrobianos incluyen, aunque no están limitados a, penicilina G, estreptomycin, ampicilina, penicilina, carbenicilina, tetraciclina, estreptomycin, anfotericina B, vancomicina y floxacina y derivados de la floxacina como ciprofloxacina, norfloxacina, gatifloxacina, levofloxacina, moxifloxacina y trovafloxacina. Los agentes antivirales incluyen AZT. El término "agente antineoplásico" como se usa en la presente memoria hace referencia a fracciones químicas que tienen un efecto en el crecimiento, proliferación, invasividad o supervivencia de células neoplásicas o tumores. Los agentes terapéuticos antineoplásicos incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos citotóxicos y varios alcaloides vegetales y sus derivados.

- Los agentes pueden estar encapsulados dentro de los liposomas de la presente invención mediante técnicas de carga pasiva conocidas en la técnica. Los métodos pasivos para encapsular agentes terapéuticos en liposomas implican encapsular el agente durante la síntesis de los liposomas. En este método, el agente puede estar asociado a la membrana o encapsulado dentro de un espacio atrapado. Esto incluye un método de atrapamiento pasivo descrito por Bargham, et al., J.Mol.Biol. (1965) 12:238 en el que la fase acuosa que contienen el agente de interés se pone en contacto con un lámina de lípidos formadores de vesículas secas depositada en las paredes del recipiente de reacción. Bajo agitación por medios mecánicos, se producirá un hinchamiento de los lípidos y se formarán vesículas multilaminares (MLVs). Utilizando la extrusión, las MLVs pueden convertirse en grandes vesículas unilamelares (LUVs) o pequeñas vesículas unilamelares (SUVs) siguiendo la extrusión con sonicación. Otro método para la carga pasiva que puede ser utilizado incluye el descrito por Deamer, et al., Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629. Este método implica disolver los lípidos formadores de vesículas en éter y, en lugar de evaporar primero el éter para formar una lámina fina en una superficie, siendo esta lámina puesta posteriormente en contacto con una fase acuosa que va a ser encapsulada, la solución de éter se inyecta directamente en dicha fase acuosa y el éter se evapora después, a través de este método se obtienen liposomas con agentes encapsulados. Un método adicional que puede emplearse es el método de evaporación en fase inversa (REV, de sus siglas en inglés) de Szoka, et al., P.N.A.S. (1978) 75:4194 en el que una solución de lípidos en un disolvente insoluble en agua se emulsiona en una fase acuosa transportadora y el disolvente orgánico se elimina subsecuentemente a presión reducida.

- Otros métodos para el atrapamiento pasivo que pueden utilizarse incluyen someter a los liposomas a tratamientos sucesivos de deshidratación y rehidratación, o congelación y descongelación. Esta técnica ha sido descrita por

Kirby, et al., *Biotechnology* (1984) 979-984. También, Shew, et al., *Biochim. Biophys. Acta* (1985) 816:1-8 describe un método en el que los liposomas preparados por sonicación son mezclados en solución acuosa con el soluto que va a ser encapsulado, y la mezcla se seca con nitrógeno en un rotavapor. Bajo rehidratación, se producen grandes liposomas en los que ha sido encapsulada una fracción significativa del soluto.

5 Los agentes pueden ser encapsulados usando métodos activos de encapsulación. La carga activa implica el uso de gradientes transmembrana a través de la membrana del liposoma para inducir la captación de un agente terapéutico después de que se ha formado el liposoma. Esto puede implicar el gradiente de uno o más iones incluyendo Na⁺, K⁺, H⁺, y/o un grupo nitrógeno protonado. Las técnicas de carga activa que pueden utilizarse de acuerdo a esta invención incluyen carga por gradiente de pH, atracción de cargas eléctricas y el lanzamiento del medicamento
10 mediante un agente que puede unirse con el medicamento.

Los liposomas pueden cargarse de acuerdo a la técnica del gradiente de pH. De acuerdo con esta técnica, se forman liposomas que encapsulan una fase acuosa con un pH seleccionado. Los liposomas hidratados se colocan en un entorno acuoso de pH diferente seleccionado para eliminar la carga eléctrica del medicamento o de otro agente que va a ser encapsulado. Una vez que el medicamento entra en el liposoma, el pH del interior da como
15 resultado un estado cargado del medicamento, que previene que el medicamento permee a través de la bicapa de lípidos, atrapando de esta forma el medicamento en el liposoma.

Para crear un gradiente de pH, el medio original externo se reemplaza con un medio externo nuevo que tiene diferentes concentraciones de protones. La sustitución del medio externo puede conseguirse mediante varias técnicas, tales como, mediante el paso de preparación de vesículas de lípido a través de una columna de filtración en fase gel, p. ej., una columna Sephadex, que ha sido equilibrada con el nuevo medio (descrito en los ejemplos
20 siguientes), o por centrifugación, diálisis o técnicas relacionadas. El medio interno puede ser o ácido o básico con respecto al medio externo.

Después del establecimiento de un gradiente de pH, se añade un agente que puede ser cargado con un gradiente de pH en la mezcla y se produce la encapsulación del agente en el liposoma como se ha descrito anteriormente.

25 La carga utilizando un gradiente de pH puede llevarse a cabo de acuerdo con los métodos descritos en las patentes EE.UU. n^{os} 5.616.341, 5.736.155 y 5.785.987 incorporadas en la presente memoria por referencia.

Los agentes terapéuticos que pueden cargarse utilizando carga en gradiente de pH comprenden una o varias fracciones ionizables de forma que la forma neutra del grupo ionizable permite al medicamento atravesar la membrana del liposoma y la conversión d la fracción en una forma cargada eléctricamente hace que el medicamento permanezca encapsulado dentro de el liposoma. Los grupos ionizables pueden comprender, pero no se limitan a comprender, amina, ácido carboxílico y grupos hidroxilo. Los agentes que se cargan en respuesta a un interior ácido pueden comprender fracciones ionizables que están cargados eléctricamente como respuesta a un medio ambiente ácido mientras que los medicamentos que se cargan en respuesta a un interior básico comprenden fracciones que se cargan eléctricamente en respuesta a un medio ambiente básico. En el caso de un interior básico, pueden utilizarse fracciones ionizables que incluyen pero no se limitan a ácido carboxílico o grupos hidroxilo. En el caso de un interior ácido, pueden utilizarse fracciones ionizables que incluyen pero no se limitan a grupos amino primarios, secundarios y terciarios Preferiblemente, el agente cargable mediante gradiente de pH es un agente terapéutico y más preferiblemente, un agente antineoplásico, un agente antimicrobiano o un agente antiviral. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden ser cargados en los liposomas mediante el método de carga por gradiente de pH y por la tanto pueden se usados en esta invención incluyen, pero no se limitan a, antibióticos del grupo de las antraciclinas, tales como doxorubicina, daunorubicina, mitoxantrona, epirubicina, aclarubicina e idarubicina; antibióticos antineoplásicos como mitomicina, bleomicina y dactinomomicina; alcaloides de la vinca como vinblastina, vincristina y navelbina; derivados de la purina tales como 6-mercaptopurina y 6-tioguanina; derivados de la purina y la pirimidina tales como 5-fluoruroacil; camptotecinas tales como topotecan, irinotecan, lurtotecan, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocampotecina y 10-hidroxycamptotecina; citarabinas tales como arabinósido de citosina; agentes antimicrobianos tales como ciprofloxacino y las sales del mismo. Esta invención no sólo se limita a drogas actualmente disponibles, sino que se extiende a otras no desarrolladas o no disponibles comercialmente todavía, y que puedan ser cargadas utilizando gradientes de pH transmembrana.

Para mantener el gradiente de pH a través del liposoma pueden emplearse varios métodos. Esto puede implicar el uso de ionóforos que pueden insertarse en la membrana del liposoma y transportar iones a través de las membranas en un intercambio por protones (véase, por ejemplo, la patente EE.UU. n^o 5.837.282). También pueden ser utilizados los tampones encapsulados en el interior del liposoma capaces de transportar protones a través de la membrana liposomal y por tanto establecer un gradiente de pH (véase por ejemplo la patente EE.UU. número 5.837.282). Estos tampones comprenden un grupo ionizable que es neutro cuando se desprotona y que está cargado eléctricamente cuando está protonado. La forma neutra desprotonada del tampón (que está en equilibrio con la forma protonada) es capaz de atravesar la membrana del liposoma y dejar así atrás el protón en el interior del liposoma y por lo tanto causar un aumento de pH en el interior. Ejemplos de este tipo de tampones incluyen cloruro de metilamonio, sulfato de metilamonio, sulfato de etilendiamonio (véase la patente EE.UU. n^o 5.785.987) y sulfato de amonio. También pueden utilizarse, los tampones de carga interna que son capaces de establecer un pH interno básico. En este caso,
60 la forma neutra del tampón está protonada de forma que los protones son lanzados fuera del interior del liposoma

para establecer un interior básico. Un ejemplo de ese tipo de tampón es el acetato cálcico (véase patente nº 5.939.096).

5 Pueden utilizarse métodos de atracción de carga eléctrica para cargar activamente agentes terapéuticos. El mecanismo de atracción de carga eléctrica para la carga de medicamentos implica crear un potencial transmembrana a través de la membrana mediante la creación de un gradiente de concentración para una o más especies cargadas eléctricamente. Por tanto, para un medicamento que está cargado negativamente cuando se ioniza, se crea un potencial transmembrana a través de la membrana que tiene un potencial interior que es positivo con respecto al potencial exterior. Para un medicamento que está cargado positivamente, se utilizaría el potencial transmembrana opuesto.

10 En una realización, subsecuentemente a la preparación, los liposomas se someten a temperaturas por debajo de 0 °C de forma que están presentes en estado congelado. Los liposomas pueden congelarse por: inmersión en nitrógeno líquido, hielo seco, un congelador convencional a -20°C o un congelador convencional a -80°C o -70°C. En un ejemplo alternativo, los liposomas pueden congelarse en nitrógeno líquido seguida por una inmersión en un congelador. Los liposomas pueden almacenarse de una forma estable en el estado congelado durante largos periodos de tiempo hasta que vayan a ser utilizados. Subsecuentemente a la congelación, los liposomas pueden ser descongelados para su uso posterior, sometiéndolos a temperaturas superiores a 0°C.

15 Los liposomas pueden comprender agentes encapsulados previamente a someterse a temperaturas por debajo de 0°C. Esto puede implicar cargar el agente en el liposoma preformado usando las técnicas de carga activas y pasivas mencionadas anteriormente. Si el agente encapsulado es un agente terapéutico, los liposomas descongelados pueden utilizarse directamente en la terapia siguiendo procedimientos conocidos para administrar agentes encapsulados en liposomas.

20 Los liposomas pueden ser cargados activamente con el agente subsecuentemente a la congelación. Esto permite que los liposomas congelados se proporcionen a los fabricantes de medicamentos de forma no encapsulada que los fabricantes puedan subsecuentemente cargar activamente con el agente. Un método de carga activo preferido es el método del gradiente de pH descrito anteriormente. Los liposomas pueden congelarse con un gradiente de pH a través de la membrana o el gradiente puede generarse subsecuentemente a la congelación.

25 En el caso de que el gradiente se genere subsecuentemente a la congelación, el tampón externo puede intercambiarse y sustituirse por un medio externo nuevo que tenga diferente concentración de protones. El pH externo puede también ajustarse por adición de un ácido o una base. El remplazo del medio externo puede conseguirse por medio de varias técnicas, tales como, mediante el paso de una preparación de vesículas de lípido a través de una columna de filtración en gel, p. ej. una columna Sephadex, que ha sido equilibrada con el nuevo medio (una descripción en los ejemplos siguientes), o por centrifugación, diálisis o técnicas relacionadas. El medio interno puede ser ácido o básico con respecto al medio externo.

30 Los liposomas de la presente invención pueden estar sujetos también a más de un ciclo de congelación y descongelación.

35 Siguiendo a la congelación, la preparación de liposomas puede estar deshidratada por la eliminación de un disolvente acuoso en la que los liposomas están inmersos. Los liposomas se deshidratan preferentemente usando un equipo estándar de congelación –secado o un equipo equivalente; esto es, son deshidratados preferentemente bajo presión reducida. Previo a su uso, la preparación de liposomas secos se deshidrata mediante la introducción de presión reducida. Los medios para aplicar presión reducida incluyen bombas de vacío o un equipo equivalente. El proceso de deshidratación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura reducida que a temperatura ambiente. Una vez que los liposomas se han deshidratado, pueden almacenarse durante largos periodos de tiempo hasta que vayan a ser utilizados.

40 El término "crioestable" en esta especificación se refiere a liposomas que son sustancialmente resistentes a cualquiera de los numerosos efectos indeseables que ocurren bajo la exposición de la composición del liposoma a una temperatura por debajo de 0 °C suficiente para causar uno de los efectos indeseables. Los efectos indeseables incluyen, pero no se limitan a, un aumento en el tamaño de los liposomas, distribución de tamaños o turbidez de la preparación de liposomas debida a la agregación o fusión de los liposomas debido a la agregación o fusión de los liposomas, o pérdida del agente encapsulado. Típicamente, los efectos colaterales no deseables ocurren a temperaturas por debajo de 0°C, más típicamente por debajo de -5°C e incluso más típicamente por debajo de -10°C.

45 Puede evaluarse si un liposoma es crioestable o no, por ejemplo, midiendo los efectos indeseables asociados con la exposición de los liposomas a temperaturas por debajo de 0 °C. Las medidas de la variación de tamaño de los liposomas antes y después de someterse a temperaturas por debajo de 0°C pueden realizarse como se describe más adelante utilizando dispersión de la luz cuasi-elástica (QELS, de sus siglas en inglés). La fusión de los liposomas puede medirse mediante otros medios incluyendo transferencia de energía por fluorescencia en resonancia. Esto implica la medida de la transferencia de energía desde una muestra excitada a una segunda muestra debido a la proximidad de ambas muestras. La medida de la liberación de un agente encapsulado

subsecuente a la congelación puede realizarse como se describe a continuación. El agente encapsulado puede incorporarse a los liposomas usando los métodos de carga activos o pasivos descritos anteriormente. La pérdida del agente atrapado puede determinarse mediante la determinación de agente encapsulado atrapado previo a y subsecuente a la congelación. El agente puede cuantificarse mediante recuento por centelleo en el caso de un agente radiomarcado o por espectroscopia en el caso de un agente que tenga una absorbancia detectable por cuantificación. Alternativamente, el agente puede cuantificarse por cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución, absorción atómica o técnicas relacionadas.

Las preparaciones de liposomas también pueden ser inspeccionadas visualmente para detectar evidencias macroscópicas de daño por congelación, como la presencia de partículas macroscópicas, o por claridad o turbidez de la suspensión en comparación con muestras de control no congeladas. La turbidez puede medirse utilizando un espectrofotómetro fijado en 650 nm. Los liposomas también pueden analizarse para determinar partículas grandes, agregados u otros cambios que puedan indicar que el liposoma no es crioestable por centrifugación. Subsecuente a la centrifugación, el tubo de la centrífuga se observa para determinar la presencia de partículas en el fondo del tubo que puedan verse a simple vista.

Los efectos indeseables asociados con la exposición de liposomas a temperaturas por debajo de 0°C pueden compararse a formulaciones de liposomas equivalentes que contienen colesterol.

Esta invención también incluye la composición de esta invención para su uso en el tratamiento de un mamífero afectado por o susceptible a o sospechoso de estar afectado por un trastorno (p. ej., cáncer). Ejemplos de usos médicos de las composiciones de la presente invención incluyen pero no se limitan a tratamiento del cáncer, tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, restenosis y arritmia cardiaca, tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas o parasitarias, tratamiento y/o prevención de enfermedades mediante el uso de composiciones de la presente invención como vacunas, tratamiento de la inflamación o tratamiento de enfermedades autoinmunes. Generalmente se entenderá que el tratamiento o la administración comprenden la administración de la composición farmacéutica en una dosis suficiente para mejorar los mencionados trastornos o los síntomas de los mismos.

Para el tratamiento de dolencias humanas, debe esperarse que un médico cualificado determine cómo se van a utilizar las composiciones de la presente invención con respecto a la dosis, calendario y ruta de administración utilizando protocolos establecidos. Dichas aplicaciones también pueden utilizar escalas de dosis en caso de que los agentes activos encapsulados en las composiciones de los vehículos de entrega de la presente invención exhiban una toxicidad reducida para los tejidos sanos del sujeto.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los liposomas de la invención se preparan de acuerdo a técnicas estándares y además comprenden un portador farmacéutico aceptable. Generalmente, se empleará una solución salina normal como portador farmacéutico aceptable. Otros transportadores aceptables incluyen, p. ej., agua, agua tamponada, suero salino 0,4%, glicina 0,3%, dextrosa 5% y similares, incluyendo glicoproteínas para conseguir una estabilidad aumentada, como albumina, lipoproteína, globulina, etc. Estas composiciones pueden ser esterilizadas mediante técnicas de esterilización bien conocidas, convencionales. La solución acuosa resultante puede estar empaquetada para su uso o filtrada en condiciones asépticas y liofilizada, la preparación liofilizada se combina con una solución acuosa previamente a su administración. Las composiciones pueden contener las sustancias farmacéuticas auxiliares que se requieran para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes que ajustan el pH o agentes tampón, agentes que regulan la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, etc. Adicionalmente, la suspensión de liposomas puede contener agentes protectores de lípidos que protegen a los lípidos frente los daños por radicales libres y peroxidantes de lípidos durante el almacenamiento. Son adecuados los neutralizadores de radicales libres, como el alfatocoferol, y quelantes específicos de hierro solubles en agua, como la ferroxiamina.

La concentración de los liposomas, en las formulaciones farmacéuticas pueden variar ampliamente, esto es, desde menos de alrededor del 0,05%, usualmente a o al menos alrededor del 2-5% hasta tanto como del 10 al 30 % en peso y se seleccionarán primeramente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo específico de administración seleccionado. Por ejemplo, la concentración puede aumentarse para reducir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Alternativamente, los liposomas compuestos de lípidos irritantes pueden diluirse para reducir las concentraciones para reducir la inflamación en el punto de administración. Para el diagnóstico, la cantidad de liposomas administrados dependerá del marcador particular utilizado, el estado de la enfermedad que se ha diagnosticado y el criterio del clínico.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran parenteralmente, esto es, intraarterialmente, intravenosamente, intraperitonealmente, subcutáneamente, o intramuscularmente, o vía aerosoles. Los métodos de administración en aerosol incluyen administración intranasal y pulmonar. Más preferiblemente, las administraciones farmacéuticas se administran intravenosamente o intraperitonealmente mediante un bolo inyectable. Por ejemplo, véase Rahman, et al., patente EE.UU. n° 3.993.754; Sears, patente EE.UU. n° 4.145.410; Papahadjopoulos, et al., patente EE.UU. n° 4.235.871; Schneider; patente EE.UU. n° 4.224.179; Lenk, et al., patente EE.UU. n° 4.522.803; y Fountain, et al., patente EE.UU. n° 4.588.578. Las formulaciones particulares que son adecuadas para este uso se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985).

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la invención pero no limitarla.

Preparación A

Métodos para Preparar Liposomas Grandes Unilamelares

5 Los lípidos fueron disueltos en una solución cloroformo y subsecuentemente secados bajo una corriente de nitrógeno gas y colocados en una bomba de vacío para eliminar el disolvente. Se añadieron niveles traza del lípido radiactivo CHE-³H o CHE-¹⁴C para cuantificar el lípido durante el proceso de formulación y la inyección intravenosa siguiente. La lámina de lípido resultante se colocó bajo alto vacío durante un mínimo de 2 horas. La capa de lípido de hidrató en la solución indicada para formar vesículas multilamelares (MLVs). La preparación resultante se extruyó 10 veces sobre filtros de policarbonato apilados con un aparato de extrusión (Lipex Biomembranes, Vancouver, BC) para conseguir un tamaño medio de liposoma entre 80 y 150 nm. Todos los constituyentes lípidos de los liposomas se presentan en % en moles.

Preparación B

Métodos para cuantificar la carga de medicamento

15 En varios puntos temporales después del inicio de la carga de medicamento, se eliminaron alícuotas y se pasaron por una columna de giro Sephadex G-50 para separar la droga libre de la encapsulada. Los niveles de lípido se determinaron por recuento del centelleo en medio líquido. Cuando se emplearon, los niveles de daunorubicina (daunorubicina-³H) y FUDR (FUDR-³H) marcadas radiactivamente presentes en el eluyente se midieron por recuento por centelleo en medio líquido. Los niveles de irinotecan se midieron por absorbancia a 370 nm frente a una curva patrón libre de medicamento. Para un volumen específico de eluyente, se añadió Triton X-100 para solubilizar los liposomas que contienen irinotecan. Siguiendo a una adición de detergente, la mezcla se calentó a 100 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de la medición de la absorbancia.

Ejemplos

Ejemplo 1

La estabilidad en sangre de liposomas DSPC aumenta con el aumento en el contenido en fosfatidilglicerol (PG)

25 Se investigó la capacidad de diferentes niveles de fosfatidilglicerol (PG) para aumentar el tiempo de residencia en sangre e intensificar las propiedades de retención de medicamentos de los liposomas que contienen diesteraofosfatidilcolina (DSPC) como el componente bruto del lípido. Los liposomas DSPC se prepararon con niveles variables de difestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) y se cargaron con daunorubicina en respuesta al CuSO₄ encapsulado. Los niveles de lípido en plasma y las concentraciones de medicamento se determinaron tras la administración a ratones.

30 Los liposomas DSPC que contienen DSPG al 10, 20 y 30 % mol se prepararon como se describe en los métodos disolviendo DSPC en cloroformo y los lípidos DSPG en cloroformo/ metanol/ agua (16:8:1 v/v) y combinando las preparaciones con relaciones molares de 90:10, 80:20 y 70:30 junto con el marcador radiactivo CHE-¹⁴C. Las láminas de lípido se dejaron bajo vacío durante la noche para eliminar cualquier disolvente residual seguido de rehidratación en CuSO₄ 150 mM, histidina 20 mM, pH 7,4. Después los liposomas fueron intercambiados de tampón a suero salino para eliminar el cobre externo y además intercambiados por sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, EDTA 5mM (tampón SHE), pH 7,4 utilizando una columna de diálisis de flujo tangencial de uso manual.

35 La captación de daunorubicina (que contiene niveles traza de daunorubicina-³H) en los liposomas DSPC/DSPG se estableció mediante incubación de los liposomas con medicamento (con una relación en peso medicamento a lípido de 0,1. La carga completa del medicamento, medida por análisis en columna de giro como se describe en los métodos, se consiguió después de la incubación de la solución a 60°C - El tampón externo se intercambió por suero salino usando una columna tangencial de uso manual. Los lipomas DSPC/DSPG resultantes cargados de daunorubicina se inyectaron en ratones Balb/c (3 ratones por punto temporal) con una dosis de lípido de 100 mg/kg y una dosis de medicamento de 10 mg/kg. En los puntos temporales indicados, se recogió sangre mediante punción cardiaca y se colocó en microtubos recubiertos con EDTA. Las muestras se centrifugaron y el plasma se transfirió cuidadosamente a otro tubo. La recuperación de lípido y medicamento se controló mediante recuento por centelleo con doble marcado. Los puntos de datos representan los resultados medios, +/- la desviación estándar (SD).

40 Los resultados demuestran que la residencia óptima en sangre de los liposomas se consiguió mediante la incorporación de DSPG 20 % en moles (Figura 1A). En contraposición, Mehta et al. en el documento WO99/59547 informaron de que los liposomas DPPC/Col preparados con menos de un 15 % en moles de DMPG presentaban vidas medias en sangre aumentadas con respecto a los liposomas preparados con 20 % en moles de DMPG. Los liposomas en estos estudios previos utilizan un lípido bruto (DPPC) que tiene una temperatura de transición de fase por debajo de la empleada en la presente invención y colesterol (Col) como lípido estabilizante. Por tanto, estos resultados demuestran que la naturaleza de los componentes lípidos que constituyen liposomas que contienen fosfatidilglicerol pueden afectar las propiedades de estabilidad en plasma del transportador.

55

Previamente, se ha demostrado que los liposomas preparados con polímeros hidrofílicos tales como polietilenglicol y lípidos tales como GM₁ tienen la capacidad de aumentar el tiempo de vida en circulación de los liposomas. Estos resultados muestran que el polímero, poli (etilenglicol) (PEG), no se requiere para conseguir la estabilidad en plasma y que los grupos de iones zwitteriónicos como el glicerol unidos al grupo de cabeza pueden generar propiedades de circulación de larga duración en los liposomas. Aunque no se esperaba en teoría que estuviesen ligados, la presencia de grupos hidroxilo en el grupo de cabeza del PG puede facilitar la unión del hidrógeno con moléculas de agua en el medio externo creando una cubierta de hidratación que rodea el liposoma.

Los resultados representados en la Figura 1B indican que los niveles de daunorubicina en plasma sanguíneo también aumentaron con niveles crecientes de DSPG. Estos datos demuestran por tanto que como añadidura a una eliminación decreciente de liposomas en el compartimento sanguíneo, los liposomas que contienen DSPG exhiben excelentes propiedades de retención de medicamentos *in vivo*.

Ejemplo 2

La retención de 5-Fluoro-2'-deoxiuridina (FLTDR) es óptima cuando se encapsula en liposomas libres de colesterol que contienen PG.

El efecto de la incorporación de colesterol (Col) en formulaciones liposomales en la retención *in vivo* de 5- fluoro-2' deoxiuridina (FUDR) se examinó y comparó con la retención de FUDR encapsulado en liposomas que contienen fosfatidilglicerol. Esto se llevó a cabo mediante atrapamiento pasivo de FUDR en liposomas que consisten en DSPC/Col (55:45 razón molar) y DSPV/DSPG (80:20 razón molar) y comparando las relaciones medicamento a lípido después de la administración de las formulaciones a ratones. Los liposomas DSPC/Col se seleccionaron como control para estos estudios ya que esta formulación ha sido utilizada históricamente en la técnica debido a su capacidad para retener óptimamente medicamentos en parte debida al efecto estabilizante del colesterol. Se incorporó DSPG a los liposomas DSPC en un 20% mol ya que se encontró que este nivel de PG confiere a los liposomas una longevidad en circulación óptima como se demuestra en el Ejemplo 1.

Las láminas de lípidos DSPC/Col y DSPC/DSPG marcadas con CHE-¹⁴C se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y se hidrataron en una solución que consiste en FUDR en HBS, pH 7,4 que contiene niveles traza de FUDR-³H. Subsecuentemente a la extrusión, los liposomas se intercambiaron de tampón a suero salino normal mediante el uso de diálisis de flujo tangencial. Los liposomas cargados con FUDR se administraron a ratones Balb/c (3 ratones por punto temporal) con una dosis de FUDR de 20 μmol/kg con una dosis resultante de lípidos de 200 μmol/kg. En los puntos temporales indicados, se recogió sangre mediante punción cardiaca y se colocó en microtubos recubiertos con EDTA. Las muestras se centrifugaron y el plasma se transfirió cuidadosamente a otro tubo. La recuperación de lípidos y las concentraciones de medicamentos en plasma se determinaron mediante recuento por centelleo líquido. Los puntos de datos son la media +/- SD procedente de 3 puntos.

Los resultados de la Figura 2 demuestran que el FUDR se retuvo óptimamente en formulaciones DSPC/DSPG (80:20 relación molar) en relación con formulaciones DSPC/Col (55:45 relación molar). Estos resultados sugieren que la retención mejorada de FUDR tiene lugar cuando se emplea PG como lípido estabilizante como un remplazo para el colesterol.

Ejemplo 3

La reducción en el contenido de colesterol da como resultado una retención aumentada de FUDR en liposomas que contienen PG que contienen Irinotecan

Se investigó el efecto del colesterol en la retención de FUDR atrapado en PG que contienen liposomas subsecuentemente cargados con irinotecan para examinar el efecto del colesterol en la retención de FUDR en una formulación que contiene dos medicamentos encapsulados. Los inventores han demostrado previamente que la interacción sinérgica de dos medicamentos *in vivo* ocurre óptimamente si las tasas de liberación de los dos medicamentos son comparables. La retención del medicamento puede ajustarse controlando parámetros como la longitud de la cadena acilo del lípido constituyente, el contenido de colesterol y la osmolaridad del compartimento interno del liposoma. Estos estudios se realizaron para explorar la capacidad del colesterol para modular la tasa de liberación de un medicamento en un liposoma cargado doblemente con el objetivo final de alcanzar una liberación coordinada de ambos medicamentos. Para determinar el efecto de niveles crecientes de colesterol en la retención de FUDR atrapado pasivamente, se prepararon liposomas que contenían DSPG con 5, 10, 15 y 20 % en moles de colesterol y se midieron las relaciones medicamento a lípido en plasma después la administración intravenosa a ratones. Como en el ejemplo previo, se incorporó PG en los liposomas a un 20 % en moles ya que se ha encontrado que este nivel de PG confiere óptimamente propiedades de circulación de larga duración a los liposomas DSPC.

Se prepararon láminas de lípidos que consistían en DSPC/Col/DSPG con el colesterol incorporado en relaciones de 5, 10, 15 y 20 % en moles y con PG mantenido constante al 20 % en moles como se describe en el Ejemplo 1 mediante la disolución de DSPC y colesterol en cloroformo y DSPG en cloroformo/metanol/agua y combinando las preparaciones en relaciones molares adecuadas. Después de la eliminación del disolvente, las láminas de lípidos se redisolviaron en cloroformo y se secaron una vez más, seguido por hidratación en una disolución que consiste en

5 CuSO₄ 250 mM que contiene 25 mg/mL de FUR con niveles traza de FUDR-³H. Después de la extrusión, se hizo un intercambio de tampón en los liposomas por sacarosa 300 mM, HEPES 20, EDTA 30 mM, pH 7,4 usando una columna de diálisis de flujo tangencial de uso manual. Subsecuentemente al intercambio de tampón, las muestras se cargaron con irinotecan a 50 °C en una relación molar medicamento a lípido de 0,1:1 y se intercambiaron a HBS, pH 7,4 utilizando una columna tangencial de uso manual. Los liposomas resultantes cargados doblemente se administraron a ratones Balb/c a 340 μmol lípido/ kg, 34 μmol FUDR/ kg y 34 μmol irinotecan/ kg. Se recogió sangre en los puntos temporales indicados mediante punción cardiaca y se colocaron en microtubos recubiertos de EDTA; se usaron tres ratones para cada punto temporal (como en los ejemplos previos, los puntos de datos son la media +/- SD). Las muestras se centrifugaron y el plasma se transfirió cuidadosamente a otro tubo. Las concentraciones de lípido y FUDR se determinaron mediante recuento por centelleo líquido, y las concentraciones de irinotecan se determinaron por análisis HPLC:

15 Los resultados de la Figura 3 demuestran que el contenido en colesterol en los liposomas de DSPC que contienen 20 % en moles de DSPG está aumentado, hay un descenso concomitante en el porcentaje inicial de la relación FUDR a lípido. Estos resultados demuestran por tanto que el colesterol puede emplearse para controlar la cinética de liberación de medicamentos de liposomas que contienen PG cargados con un segundo medicamento.

Ejemplo 4

La estabilidad en sangre de los liposomas puede mejorarse mediante la Incorporación de Dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) y Fosfatidilinositol (PI).

20 Se examinó el tiempo de residencia en plasma de liposomas DSPC que contienen dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) y fosfatidilinositol (PI) con el fin de determinar si estos lípidos confieren también propiedades de circulación de larga duración a estos liposomas de forma similar a la observada para DSPG. Ambos DSPG y DPPG contienen un grupo glicerol de cabeza, pero difieren en que la cadena acilo de DSPG contiene 18 átomos de carbono saturados mientras que la cadena acilo de DPPG contiene solo 16 átomos de carbono saturados. PG y PI comparten características químicas comunes en tanto que ambos contienen un grupo fosfato cargado negativamente protegido por una fracción hidrofílica neutra.

25 Se prepararon liposomas DPPG que contenían 10, 20 y 30 % mol de DPPG como se describe en el Ejemplo 1, excepto que los lípidos DPPG se disolvieron en cloroformo/ metanol (94:6 v/v) y se empleó como marcador de lípidos CHE-³H. Las láminas de lípido resultante se hidrataron en HBS, pH 7,4 y después de la extrusión los liposomas se inyectaron en ratones Balb/c (3 ratones por punto temporal) con una dosis de lípido de 100 mg/kg. En los puntos temporales indicados, se recogió la sangre por punción cardiaca y se colocó en microtubos recubiertos con EDTA. Las muestras se centrifugaron y el plasma se transfirió cuidadosamente a otro tubo. La recuperación de lípido se controló mediante recuento por centelleo líquido y los puntos de datos representan los resultados promedio +/- SD.

35 Los liposomas DSPC/PI se prepararon disolviendo lípidos DSPC en cloroformo y el PI vegetal hidrogenado disolviendo en cloroformo/ metanol/ agua (8:4:2 v/v). A continuación los lípidos se combinaron juntos a relaciones molares DSPC a PI 90:10, 80:20 y 70:30 con una cantidad apropiada de CHE-H³. El cloroformo se eliminó bajo una corriente de N₂ gas mientras la temperatura se mantenía a 70 °C hasta que se mantuvo una pequeña cantidad de disolvente. Las láminas de lípido resultantes se pusieron bajo vacío para eliminar el grueso del disolvente. Las láminas se redisolvieron en una solución de cloroformo que contenía metanol seguida por una eliminación del disolvente como se indica anteriormente. Las láminas de lípido se colocaron en una bomba a vacío durante la noche para eliminar el disolvente restante seguida por una rehidratación en HBS, pH 7,4. Después de la extrusión, las LUVs resultantes se inyectaron en ratones Balb/c (3 ratones por punto temporal) a una dosis de lípido de 100 mg/kg. En los puntos temporales indicados, se recogió la sangre por punción cardiaca y se colocó en microtubos recubiertos con EDTA. Las muestras se centrifugaron y el plasma se transfirió cuidadosamente a otro tubo. La recuperación de lípidos se controló mediante recuento por centelleo líquido y los puntos de datos representan los resultados promedio +/- la desviación estándar.

50 Los resultados resumidos en la Figura 4 indican que los lípidos DPPG confieren propiedades de circulación de larga duración a los liposomas DSPC. Por tanto reducir la longitud de las cadenas acilo que componen el lípido PG por eliminación de dos grupos metileno no parece que influya sustancialmente la capacidad de los lípidos para conferir propiedades de circulación de larga duración a los liposomas G.

Los resultados que se muestran en la Figura 5 demuestran que de forma similar a los liposomas que contienen PG, las preparaciones con PI presentan tiempos de vida en circulación aumentados. El grupo inositol de cabeza del PI parece por tanto que actúa de la misma forma que el grupo de cabeza glicerol del PG para aumentar la estabilidad en plasma de los liposomas.

55 Ejemplo 5

Los liposomas de fosfatidilglicerol que contienen niveles bajos de colesterol resisten los efectos perjudiciales de la congelación

Es preferible que las preparaciones de liposomas presenten propiedades de estabilidad química y física aumentadas para que estas composiciones tengan aplicación práctica. Esto requiere a menudo del uso de formatos de producto congelados o enfriados-secados (liofilizados) para evitar la ruptura de medicamentos lábiles y/o de los componentes del lípido. Sin el uso de crioprotectores, los liposomas son generalmente propensos a ruptura mecánica, agregación y fusión durante el proceso de descongelación/ rehidratación. Para examinar si los liposomas que contienen fosfatidilglicerol co-cargados con FUDR e irinotecan y preparados con colesterol por debajo del 20 % en moles eran resistentes a los efectos perjudiciales de la congelación, los liposomas DSPC se prepararon con 5, 10, 15 y 20 % en moles de colesterol y se sometieron a temperaturas de -20 °C y -70 °C. El tamaño de los liposomas se midió antes y después de la congelación y antes y después de cargar el medicamento para medir el grado de agregación de liposomas inducido por la carga del medicamento y la descongelación tras la congelación.

Las láminas de lípido con 0-20 % en moles de colesterol, DSPG y DSPC y niveles traza de CHE-¹⁴C se prepararon como se describe en los métodos. Las láminas de lípido se rehidrataron en CuSO₄ 250 mM que contiene FUDR 100 mM con niveles traza de FUDR-³H. Después de la extrusión, los liposomas se intercambiaron de tampón a suero salino y después a sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4 para eliminar cualquier resto de EDTA en el tampón exterior. Los liposomas se cargaron con irinotecan por incubación de los liposomas con el medicamento a 50°C durante 5 minutos en una relación molar medicamento a lípido 0,1:1. El medicamento libre se eliminó de las muestras mediante intercambio del tampón por HBS usando flujo tangencial. Las muestras fueron clasificadas por tamaño antes y después de la carga de medicamentos utilizando un clasificador de tamaños de partícula NICOMP. Para estudios de congelación, las muestras fueron congeladas a -20°C y -70°C durante 24 horas. Después de la congelación, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y después se hizo pasar una alícuota de la muestra a través de una columna Sephadex G-50 girada y después se centrifugaron. La razón molar medicamento a lípido del eluyente de la columna girada se generó utilizando recuento por centelleo líquido para determinar las concentraciones de lípido y 5 FUDR y utilizando la absorbancia a 370 nm frente a una curva patrón para determinar las concentraciones de irinotecan. El tamaño de partículas de los liposomas eluidos se determinó también utilizando dispersión de la luz cuasi-elástica. Los valores de desviación estándar de las medidas del tamaño de los liposomas varían del 24% al 34% para los liposomas previamente a la congelación, del 31% al 61% después de la congelación a -20°C y del 32% al 47% para la congelación a -70 °C. Todos los valores de Chi cuadrado fueron inferiores a 1.

Los resultados resumidos en la Figura 6A muestra que los liposomas co-encapsulados con FUDR e irinotecan muestran una estabilidad óptima tras congelar-descongelar a -70°C como se evidencia por la observación de que el tamaño del liposoma no cambia sustancialmente previamente a y subsecuentemente a la congelación. El examen de la retención de FUDR e irinotecan en los liposomas cargados dualmente antes y después del enfriamiento a -20°C y -70°C reveló que el FUDR era bien retenido durante el proceso de enfriar/descongelar (Figura 6B). Se observaron hallazgos similares para la retención de irinotecan antes y después del enfriamiento a -20°C y -70°C (Figura 6C). Acumulativamente, estos resultados demuestran que los lípidos estabilizantes como fosfatidilglicerol pueden utilizarse para proteger a los liposomas frente a los efectos perjudiciales del enfriamiento sin que se requiera la presencia de crioprotectores.

Ejemplo 6

Liposomas libres de colesterol preparados en ausencia de un gradiente de pH resisten la agregación subsecuente al enfriamiento

Los lípidos fueron preparados en cloroformo y subsecuentemente secados bajo una corriente de nitrógeno gas y colocados en una bomba de vacío durante la noche. Las muestras se hidrataron después con 300 mM de un tampón de citrato pH 4,0, o suero salino tamponado HEPES (HBS) pH 7,4 y se hicieron pasar diez veces a través un equipo de extrusión (Biomembranas Lipex, Vancouver, BC) con filtros de policarbonato de 80 y 100 nm. El tamaño promedio de los liposomas se determinó por dispersión de la luz cuasi-elástica (QELS) utilizando un clasificador de tamaños de partícula submicrónicas NICOMP 370 a una longitud de onda de 632,8 nm. Los liposomas fueron congelados en nitrógeno líquido (-196 °C) durante 24 horas, se dejaron descongelar a temperatura ambiente y se siguió con la determinación de la determinación del tamaño promedio de los liposomas utilizando un clasificador de tamaños de partícula NICOMP.

La Figura 7 muestra que el tamaño de los liposomas (liposomas libres de colesterol) DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles) hidratados en citrato 300 mM no exhibían cambios sustanciales de tamaño previamente a y subsecuentemente a la congelación. En contraposición, los liposomas DPPC/Col (55:45 % mol) y DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles), también hidratados en citrato 300 mM, aumentaron de tamaño aproximadamente diez veces subsecuentemente a la congelación. La misma tendencia presentaron los liposomas DSPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles), DSPC/Col (55:45 % en moles) y DSPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % mol) hidratados en citrato como se ejemplifica en la Figura 8.

El tamaño de los liposomas DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % mol) hidratados en HBS tampoco exhibió grandes cambios de tamaño subsecuentes a la congelación como se muestra en la Figura 9. En contraposición, los liposomas DPPC/Col (55:45 % en moles) y DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles), también hidratados en HBS, presentaron cambios sustanciales de tamaño subsecuentes a la congelación (también Figura 9).

La Figura 10 muestra que el tamaño de los liposomas DSPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles) hidratados en HBS no cambió subsecuentemente a la congelación, mientras que los liposomas hidratados en HBS y que consisten en DSPC/colesterol (55:45 % en moles) y DSPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles) también seguían la misma tendencia que se muestra en la Figura 9.

- 5 La Figura 11 muestra que los liposomas que consisten en DPPC/DSPE-PEG750 (95:5 % mol) y DSPC/DSPE-PEG750 (95:5 % en moles) hidratados en HBS tampoco cambiaron de tamaño subsecuentemente a la congelación demostrando así que los polímeros hidrofílicos de bajo peso molecular también protegen frente a la agregación de liposomas debida a la congelación en sistemas libres de colesterol.

- 10 La Figura 12 muestra que los liposomas que consisten en DAPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % mol) hidratados en HBS tampoco cambiaron de tamaño subsecuentemente a la congelación demostrando así que un aumento en la longitud de cadena del grupo acilo no afecta a las propiedades de crioestabilidad.

Ejemplo 7

Los liposomas unidos a PEG libres de colesterol con gradiente de pH resisten la agregación subsecuente a la congelación.

- 15 Se prepararon liposomas que consisten en DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles) y DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles) de acuerdo con el método del ejemplo 7 (usando citrato como tampón para la hidratación) excepto la extrusión que sigue y la determinación del tamaño, los liposomas se pasaron a través de una columna de Sephadex 50 equilibrada en HBS para generar un gradiente de pH. Los liposomas resultantes fueron congelados en nitrógeno líquido (-196 °C) durante 24 horas, se dejó que se enfriaran a temperatura ambiente y se siguió con una segunda determinación del tamaño promedio de los liposomas.

- 20 La Figura 13 muestra que el tamaño de los liposomas DPPC/DSPE-PEG200 (95:5 % en moles), de gradiente de pH no exhibía cambios sustanciales en el tamaño subsecuentes a la congelación. En contraposición, los liposomas DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles) de gradiente de pH, también hidratados en citrato 300 mM, aumentaron de tamaño aproximadamente tres veces subsecuentemente a la congelación. Del mismo modo, como se ejemplifica en la Figura 14, los liposomas de gradiente de pH que consisten en DSPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles) no demostraron cambios de tamaño subsecuentes a la congelación mientras que los liposomas DSPC/colesterol/DSPE-PEG 2000) sí lo hicieron.

Ejemplo 8

- 30 Crioestabilidad de liposomas libres de colesterol y liposomas que contienen colesterol que comprenden glucosa encapsulada

- 35 Los liposomas se prepararon de acuerdo con el ejemplo 7 excepto la hidratación que se llevó a cabo en una disolución HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, glucosa 50 mM pH 7,4 con trazas de glucosa- 14C . Se determinó el tamaño de los liposomas resultantes que contienen glucosa encapsulada pasivamente y después se hicieron pasar a través de una columna Sephadex G50 de 10 mL en HBS para eliminar la glucosa del medio exterior. El porcentaje de atrapamiento de la glucosa se midió mediante recuento por centelleo líquido. Los liposomas se congelaron a -196°C, se dejó que se descongelaran a temperatura ambiente y se siguió con la determinación de tamaño usando análisis QELS. El porcentaje de encapsulación de la glucosa se midió después de la congelación haciendo pasar los liposomas a través de una columna de giro Sephadex G50 de 1mL equilibrada con HBS, seguido de un recuento por centelleo líquido del eluyente.

- 40 La Figura 15 muestra que los liposomas DPPC/DSPE-PEG2000 (95-5 % en moles) que contienen glucosa atrapada son resistentes a la agregación inducida por congelación. DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles), por otro lado, aumentan de tamaño subsecuentemente al paso de congelación. Los métodos convencionales requieren la presencia de crioprotectores en ambas superficies interior y exterior del liposoma. Estos resultados muestran que la presencia de crioprotectores en el interior del liposomas es suficiente para la protección frente a la congelación/descongelación.

45 El porcentaje de encapsulación de la glucosa antes y después de la congelación se representa en la Figura 16. Los liposomas que consisten en DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles) no exhibían pérdida de glucosa después de la congelación. En contraposición, la fuga de glucosa después de la congelación ocurría en liposomas que consisten en DPPC/colesterol/DSPE-PEG2000 (50:45:5 % en moles).

- 50 Ejemplo 9

Crioestabilidad de liposomas libres de colesterol que comprenden doxorubicina encapsulada

Se prepararon liposomas con gradiente de pH transmembrana como en el ejemplo 8. Se añadió doxorubicina a la mezcla de liposoma a una relación doxorubicina: lípido 0,2 :1 y se incubó durante 2 h a 37 °C para los liposomas DPPC/DSPE-PEG2000. Después de la incubación, la mezcla se pasó a través de una columna de giro Sephadex

5 G50 de 1 mL equilibrada con HBS. La concentración de lípido en el eluyente se midió mediante recuento por centelleo líquido. Para medir los niveles de doxorubicina, un volumen definido del eluyente se ajustó a 100 μ L seguido de la adición de 900 μ L de Triton -100 al 1% para disolver la membrana liposomal. La muestra se calentó hasta que presentó una apariencia turbia y la Ab_{S480} se midió después de que se equilibrase a temperatura ambiente. Las concentraciones de doxorubicina se calcularon mediante la preparación de una curva patrón.

Los liposomas encapsulados con doxorubicina se pasaron a través de una columna Sephadex de 10 mL en HBS (pH 7,4) para intercambiar el tampón externo por HBS. Los niveles de lípido y doxorubicina se determinaron como se describe anteriormente. Los liposomas se pasaron después por una columna de giro Sephadex G50 equilibrada con HBS y las concentraciones de lípidos y doxorubicina se midieron como se describe anteriormente.

10 Como se representa en la Figura 17, los liposomas DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles) que encapsulan doxorubicina no aumentaron de tamaño subsecuentemente a la congelación. La doxorubicina también fue retenida en esta formulación después de la congelación.

Ejemplo 10

Liposomas libres de colesterol crioestables cargados con medicamentos subsecuentemente a la congelación

15 Los liposomas se prepararon como en el ejemplo 6 y se congelaron durante 24 horas a -196 °C. Un subconjunto de las muestras se cargó con doxorubicina previamente a la congelación ("cargadas en fresco") y otro subconjunto subsecuentemente a la congelación. La carga de DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles) se llevó a cabo durante 2 horas a 60 °C durante 15 minutos para liposomas DSPC/DSPE-PEG2000. La determinación del porcentaje de encapsulación de doxorubicina se llevó a cabo como en el Ejemplo 10. Los liposomas que contenían colesterol no
20 pudieron cargarse debido a la agregación. Los liposomas que consistían en DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles) se cargaron por incubación a 37 °C mientras que los liposomas que consistían en DSPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles) se cargaron por incubación a 60 °C.

25 Las Figuras 18 y 19 muestran que los liposomas DPPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles) y los liposomas DSPC/DSPE-PEG2000 (95:5 % en moles) cargados previamente a y subsecuentemente a la congelación muestran perfiles de carga similares.

Estos resultados demuestran que los liposomas libres de colesterol pueden cargarse activamente con un agente subsecuentemente a la congelación. Esto permite que se provean liposomas congelados en una forma encapsulada para su carga posterior con un agente.

30 Se pueden hacer numerosas modificaciones a los sistemas precedentes sin apartarse de las instrucciones básicas de los mismos. Aunque la presente invención se ha descrito con abundantes detalles en referencia a una o varias realizaciones específicas, los expertos en la técnica reconocerán que pueden hacerse cambios en las realizaciones reveladas específicamente en esta solicitud, sin embargo estas modificaciones y mejoras están dentro del alcance y espíritu de la invención, como se describe en las reivindicaciones que siguen. Todas las publicaciones o documentos de patentes citados en esta especificación se incorporan en la presente memoria por referencia como si cada una de
35 las publicaciones o documentos fuese específica e individualmente indicado para ser incorporado en la presente memoria por referencia.

La citación de las publicaciones o documentos anteriores no se entiende como una admisión de que cualquiera de las precedentes es una técnica previa, ni constituye una admisión de los contenidos o fechas de estas publicaciones o documentos.

40

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende liposomas que contienen al menos un agente biológicamente activo en el que dichos liposomas tienen un diámetro medio entre 80 -200 nm +/- 25 nm; y tienen una temperatura de transición (T_c) de al menos 38 °C,
- 5 (a) en la que la(s) bicapa(s) ordenada(s) de dichos liposomas consiste(n) esencialmente en:
- (i) uno o más lípidos formadores de vesículas, que son fosfolípidos o esfingolípidos;
- (ii) al menos 1 % en moles de uno o varios ácidos fosfatídicos cada uno acoplado a una fracción no zwitteriónica que es un alcohol, un ácido una cetona, un éster, un éter, una amida, un aldehído, un ciclitol o un sacárido.
- 10 (iii) de un 5 % en moles a un 20 % en moles de colesterol; o
- (b) en la que la(s) bicapa(s) ordenada(s) de dichos liposomas consiste(n) esencialmente en:
- (i) uno o más lípidos formadores de vesículas, que son fosfolípidos o esfingolípidos;
- (ii) al menos 1 % en moles de uno o varios ácidos fosfatídicos cada uno acoplado a una fracción no zwitteriónica
- 15 (iii) de un 5 % en moles a un 20 % en moles de colesterol; y
- en el que el agente activo mencionado en 1(a) y 1(b) está asociado con la(s) bicapa(s) ordenada(s) o está encapsulado en el interior del espacio acuoso definido por la(s) mencionada(s) bicapa(s) ordenada(s).
2. La composición de la reivindicación 1(a), en la que cada uno de los ácidos fosfatídicos mencionados acoplado a una fracción no zwitteriónica es un fosfatidilglicerol (PG) o un fosfatidilinositol (PI).
- 20 3. La composición de la reivindicación 1(b), en la dicho ácido fosfatídico acoplado a una fracción no zwitteriónica es un ácido fosfatídico acoplado a un polímero hidrofílico.
4. La composición de la reivindicación 3, en la que el polímero hidrofílico mencionado es polietilenglicol (PEG).
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que los liposomas mencionados comprenden al menos un 10% de dicho ácido fosfatídico acoplado a una fracción no zwitteriónica.
- 25 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el lípido formador de vesículas mencionado es diestearoilfosfatidilcolina,
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el agente biológicamente activo mencionado comprende FUDR y/o CPT-11 y/o carboplatino.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que es crioestable en ausencia de un crioprotector.
- 30 9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en forma congelada o liofilizada.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que además contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable.
11. El uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para preparar un medicamento para su uso en un método para administrar un agente biológico a un sujeto con necesidad de dicho agente.
- 35 12. Un método para conservar una composición de liposomas que comprende congelar o liofilizar la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

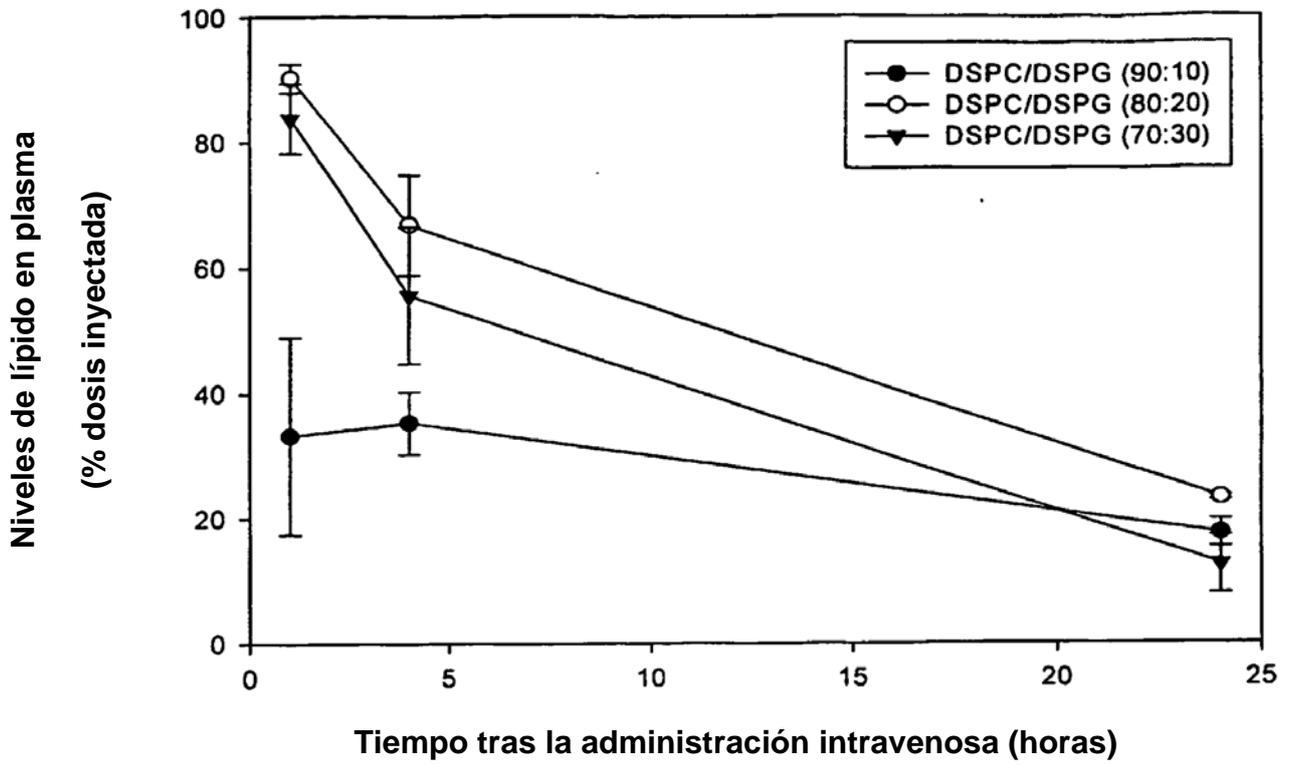


Figura 1A

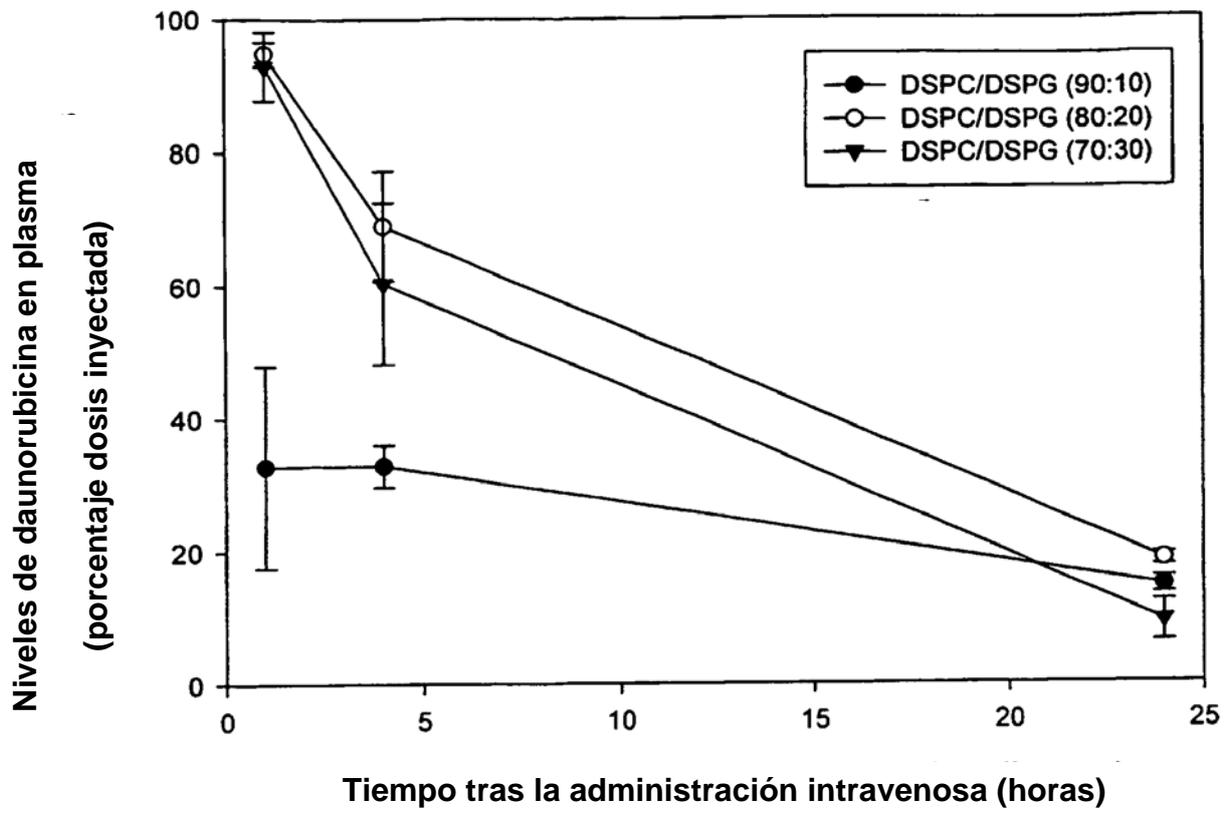


Figura 1B

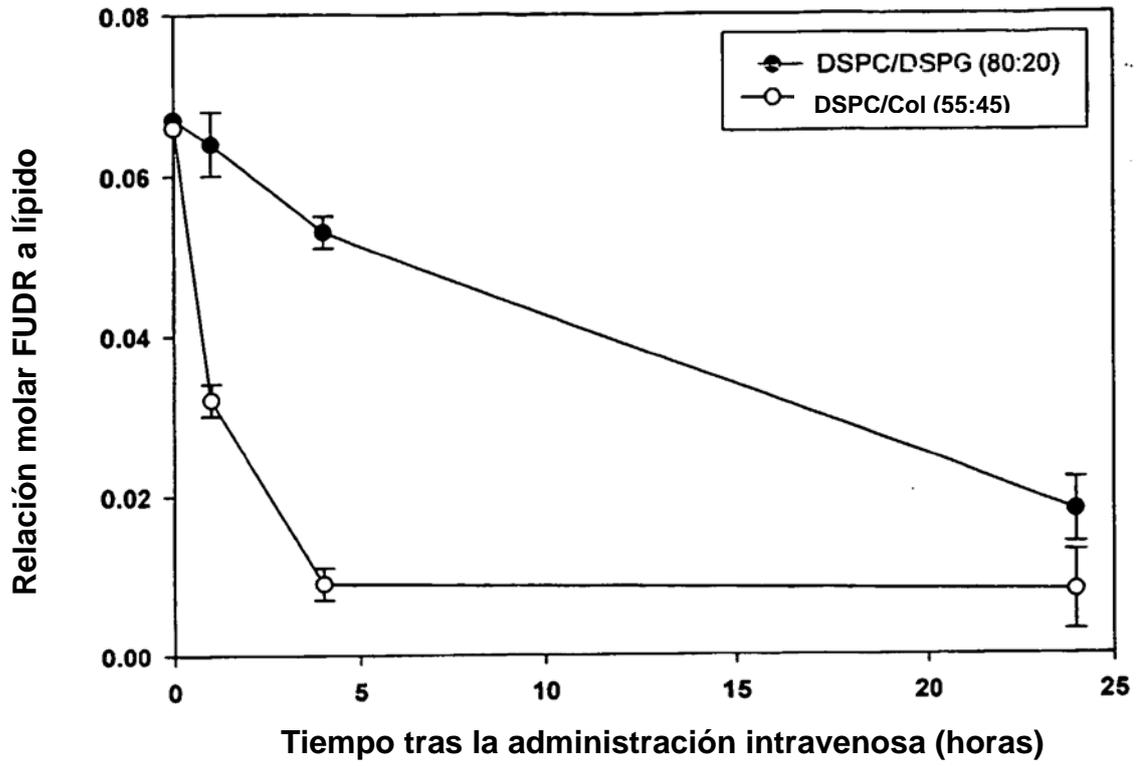


Figura 2

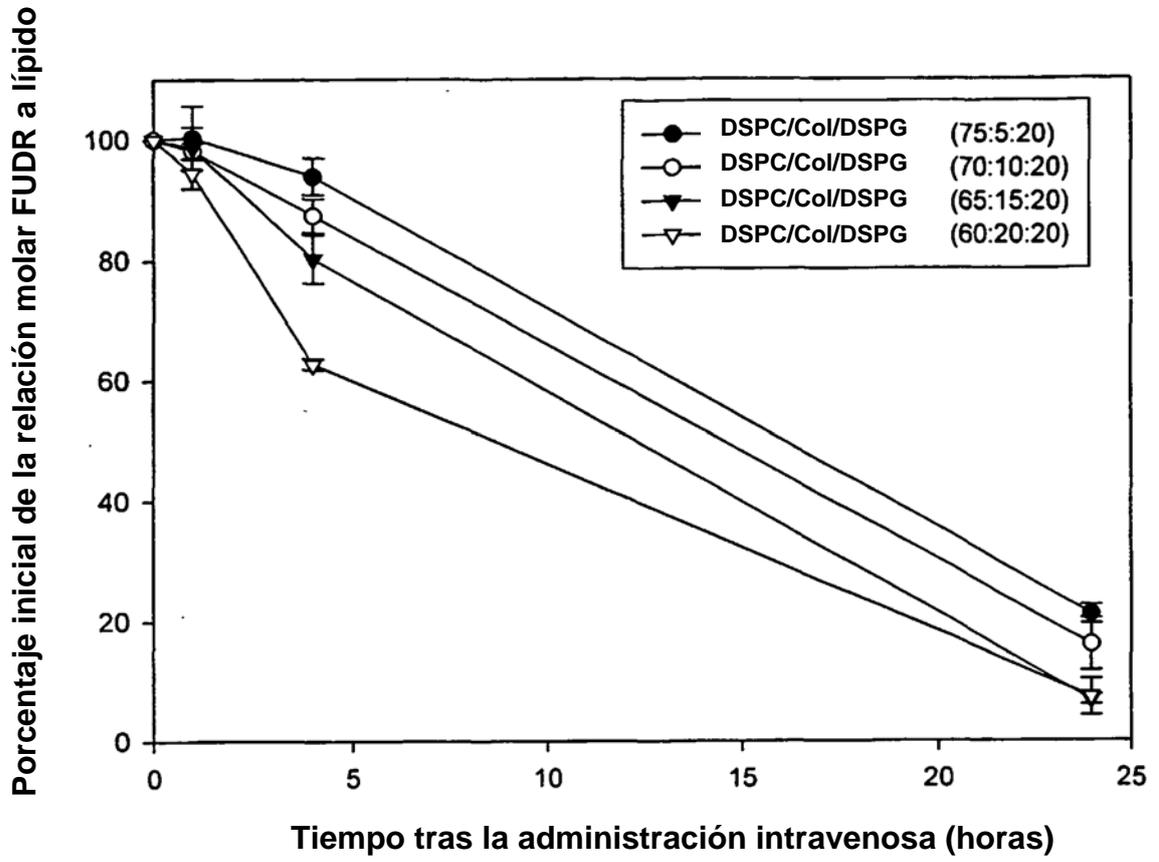


Figura 3

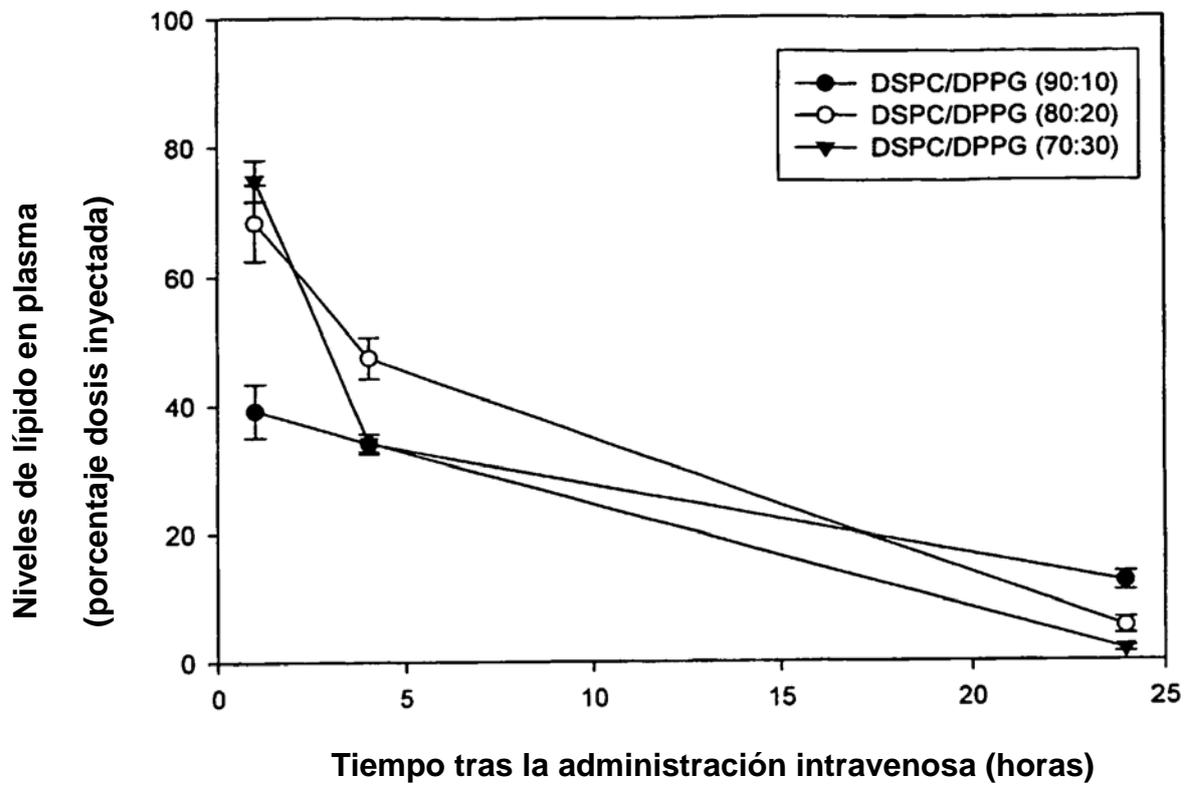


Figura 4

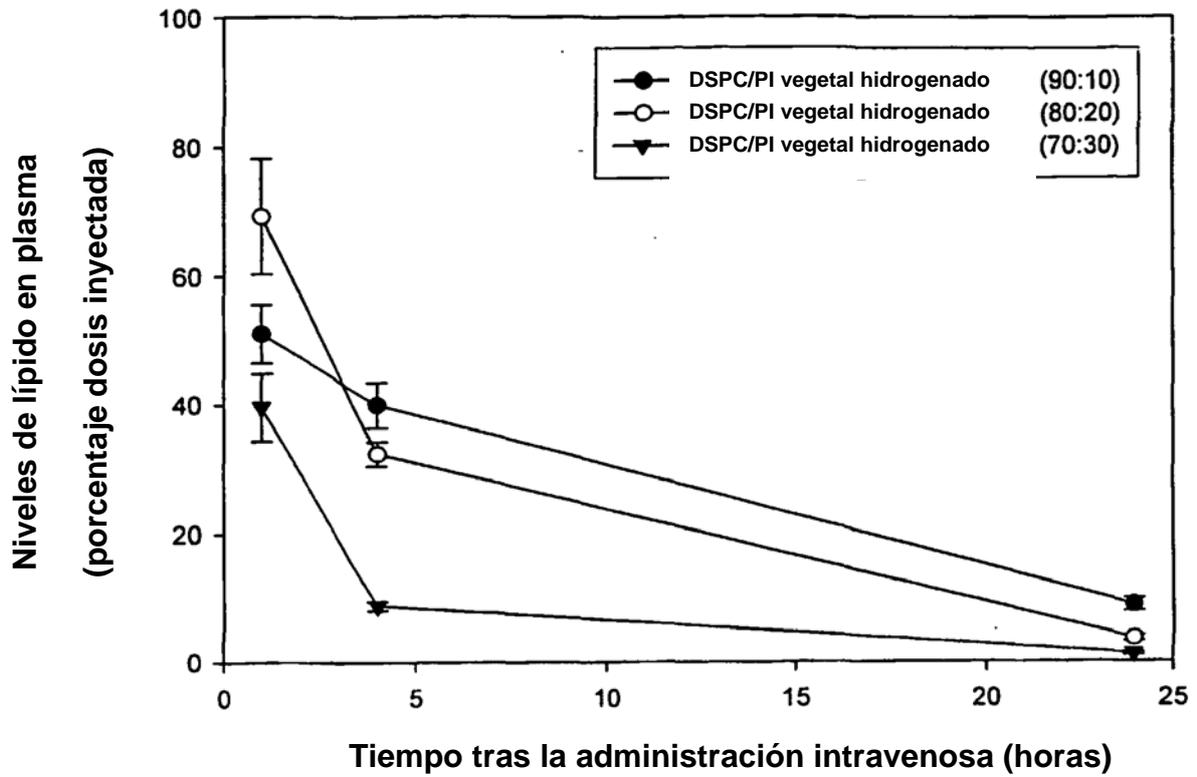


Figura 5

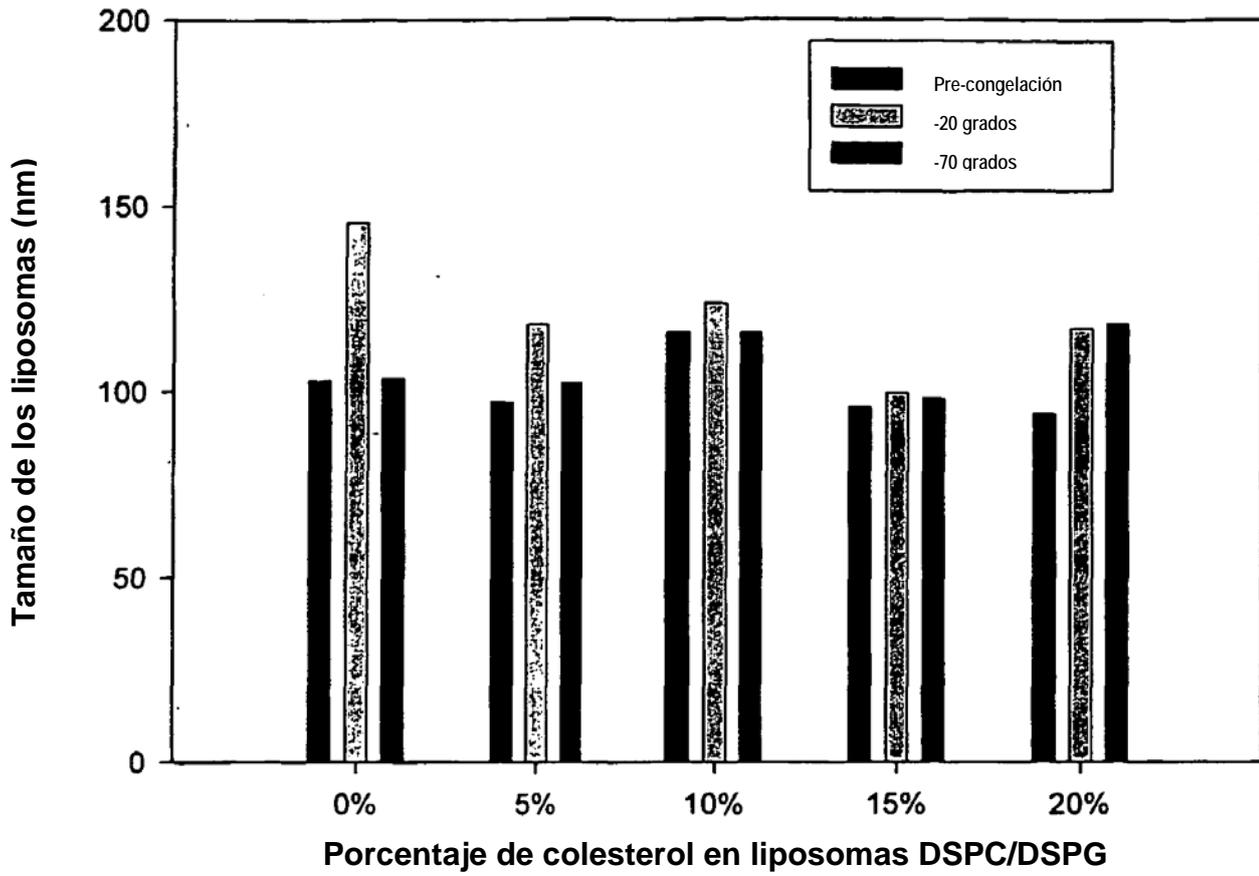


Figura 6A

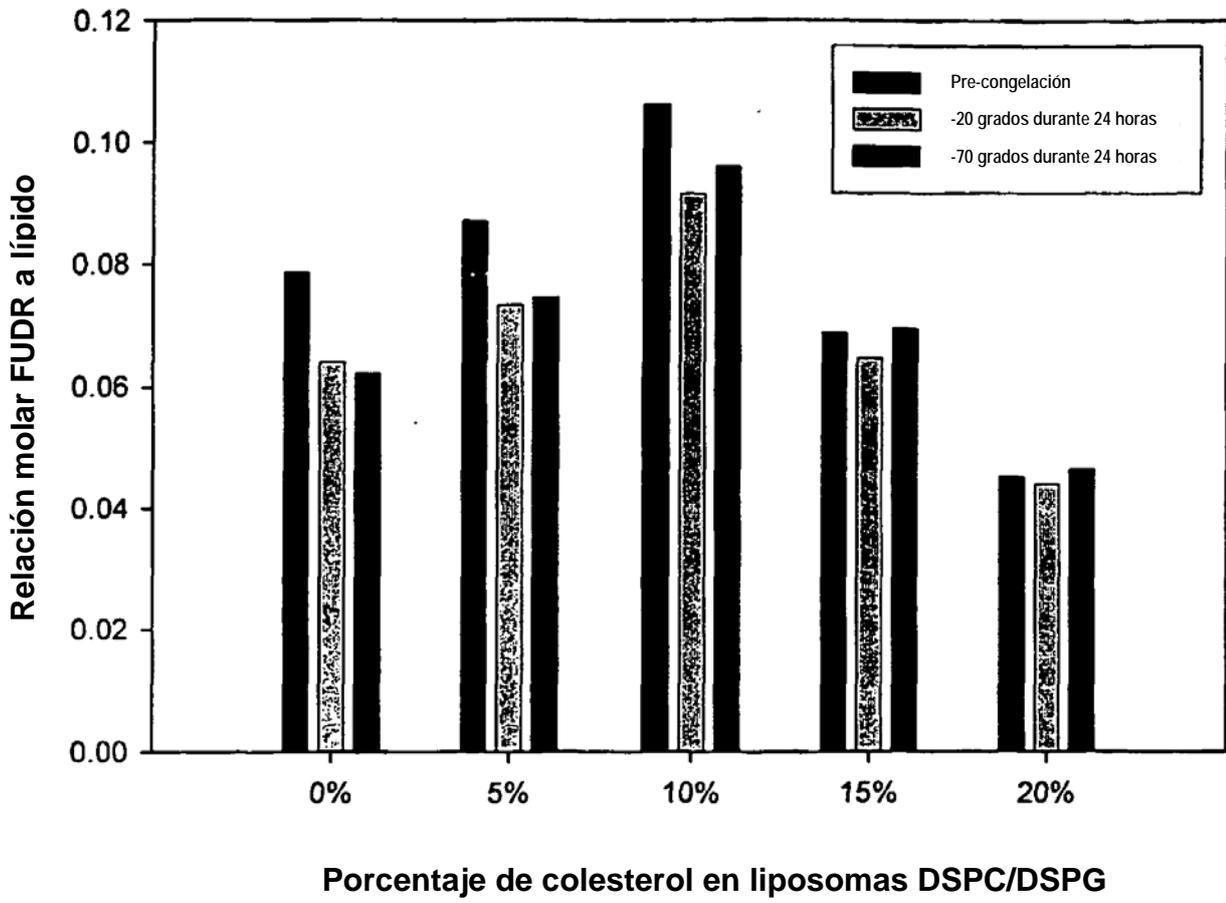


Figura 6B

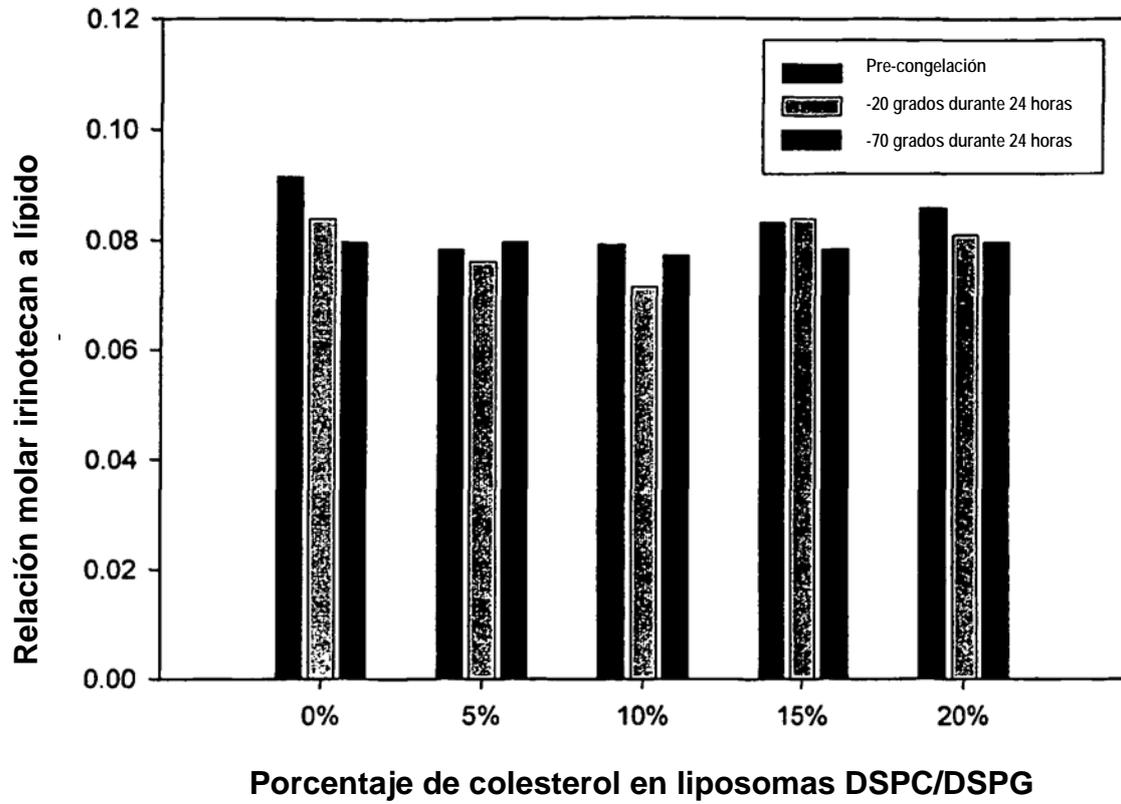


Figura 6C

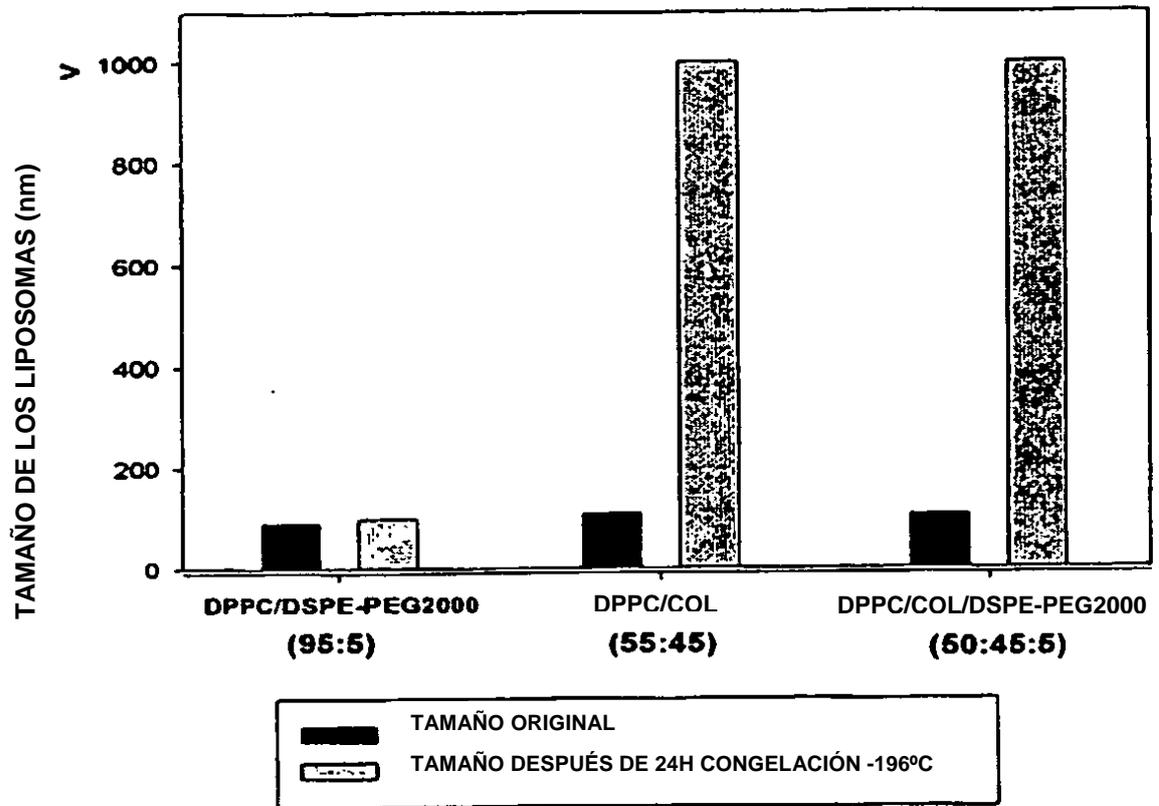


Figura 7

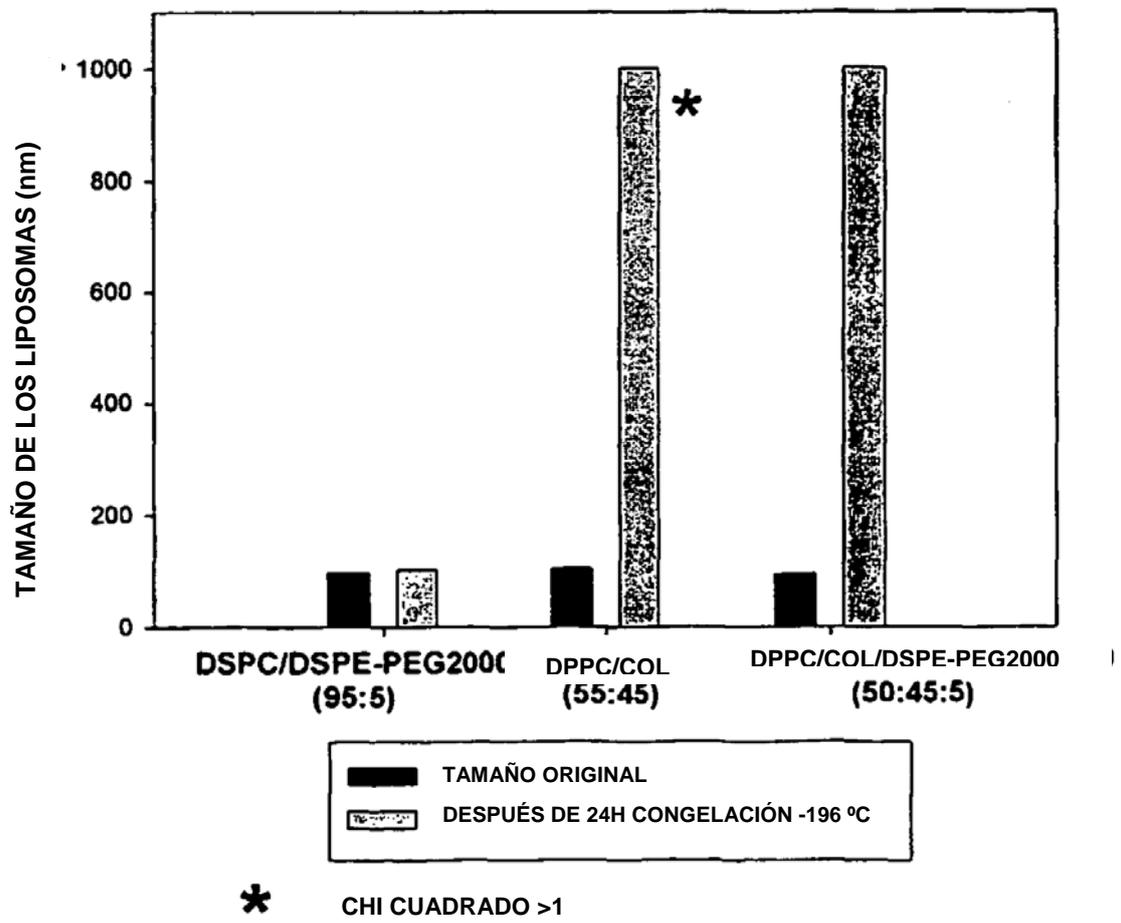
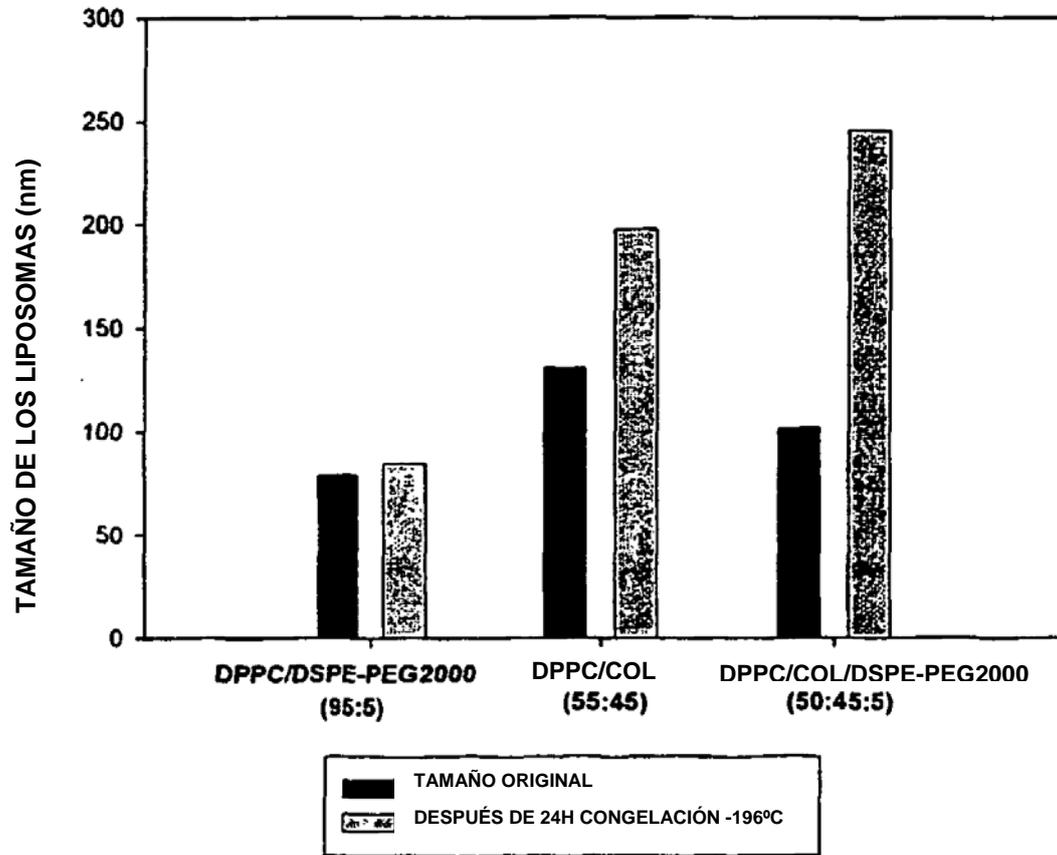
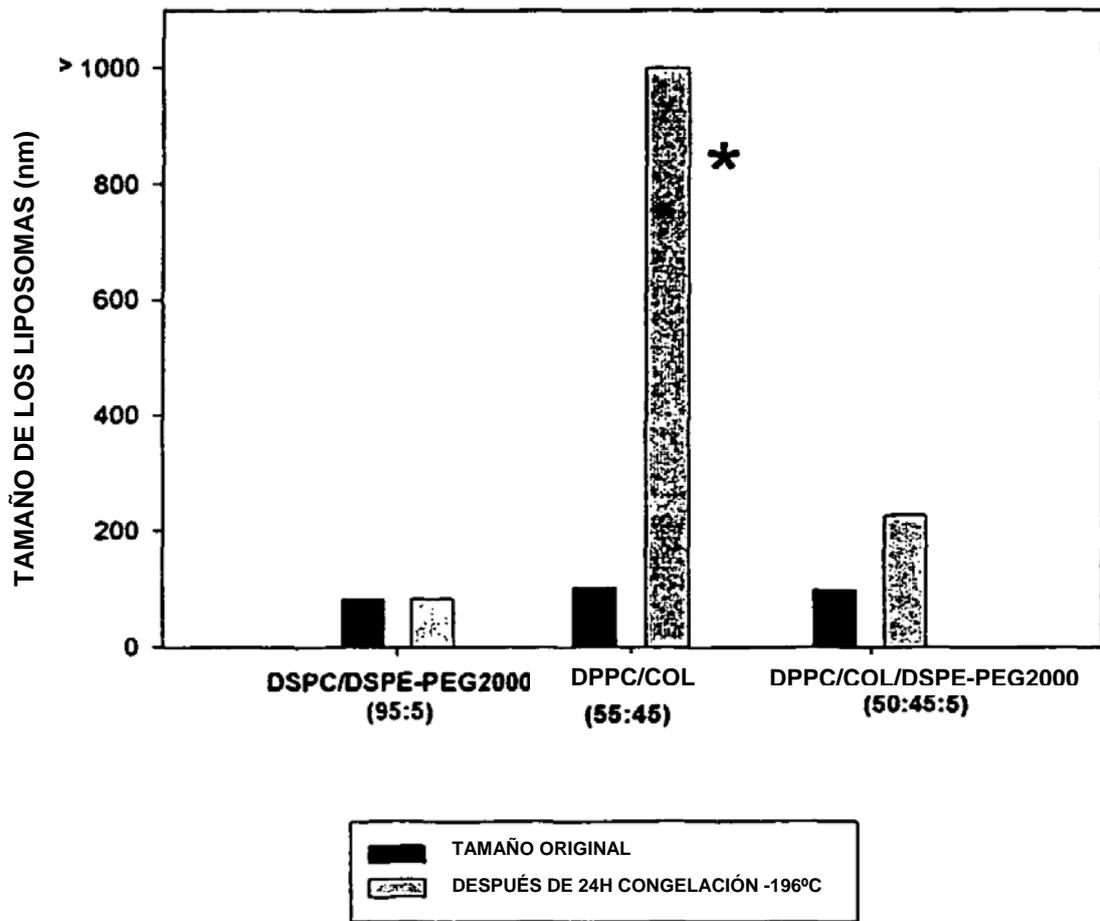


Figura 8



* CHI CUADRADO >1

Figura 9



* CHI CUADRADO >1

Figura 10

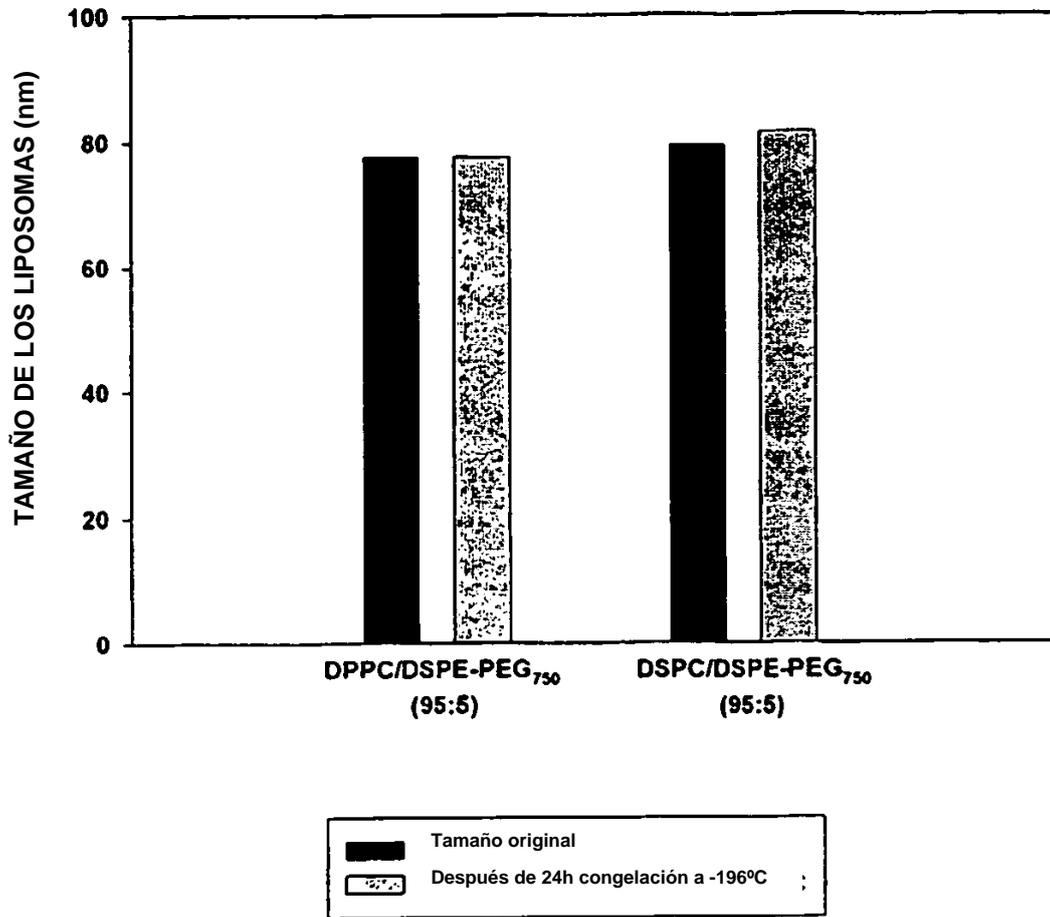


Figura 11

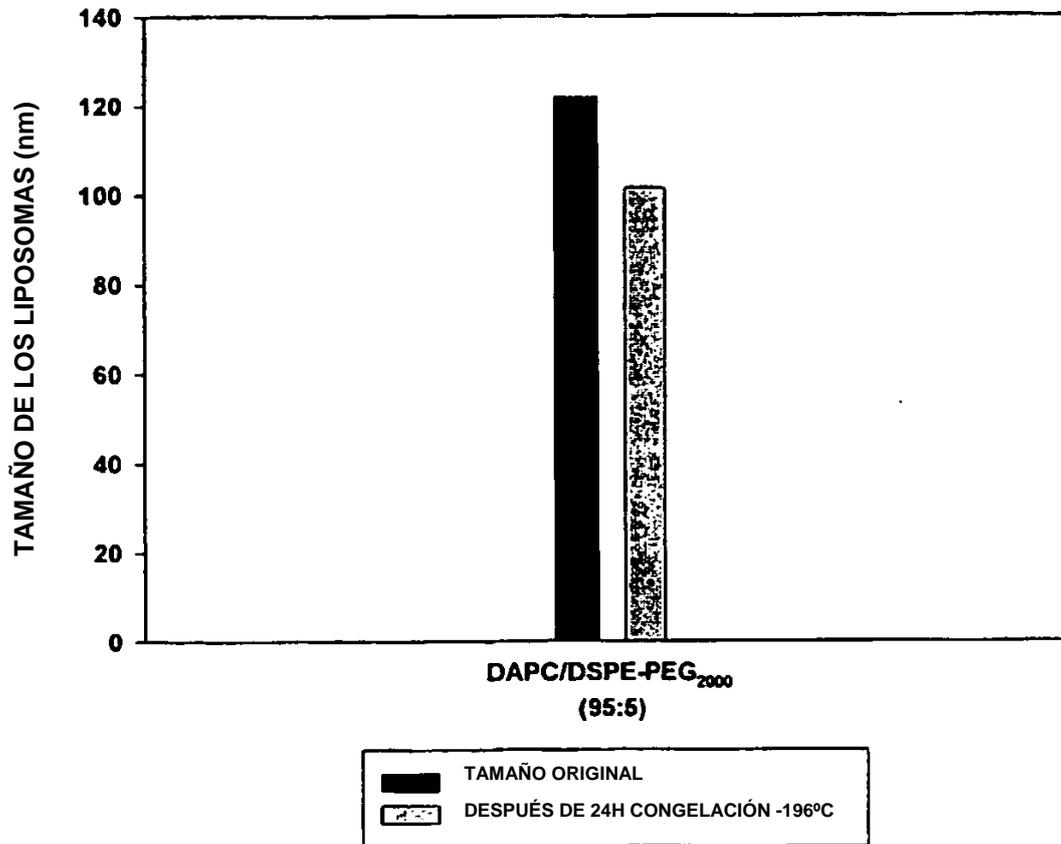


Figura 12

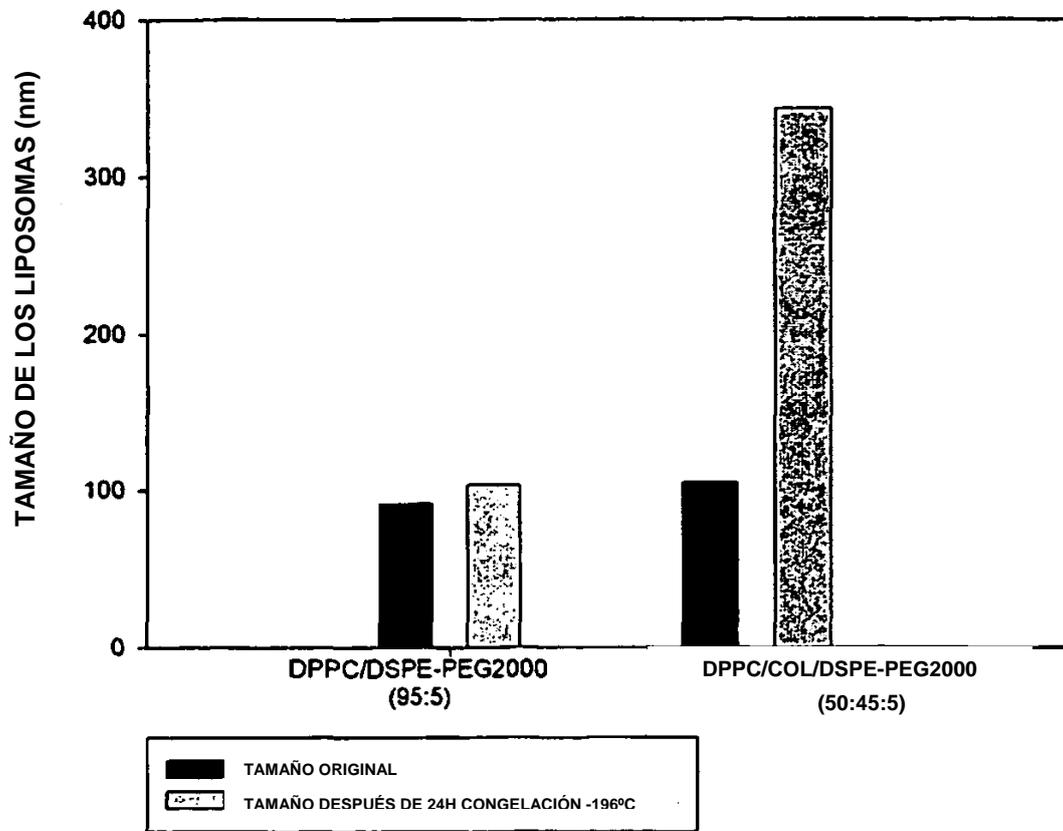


Figura 13

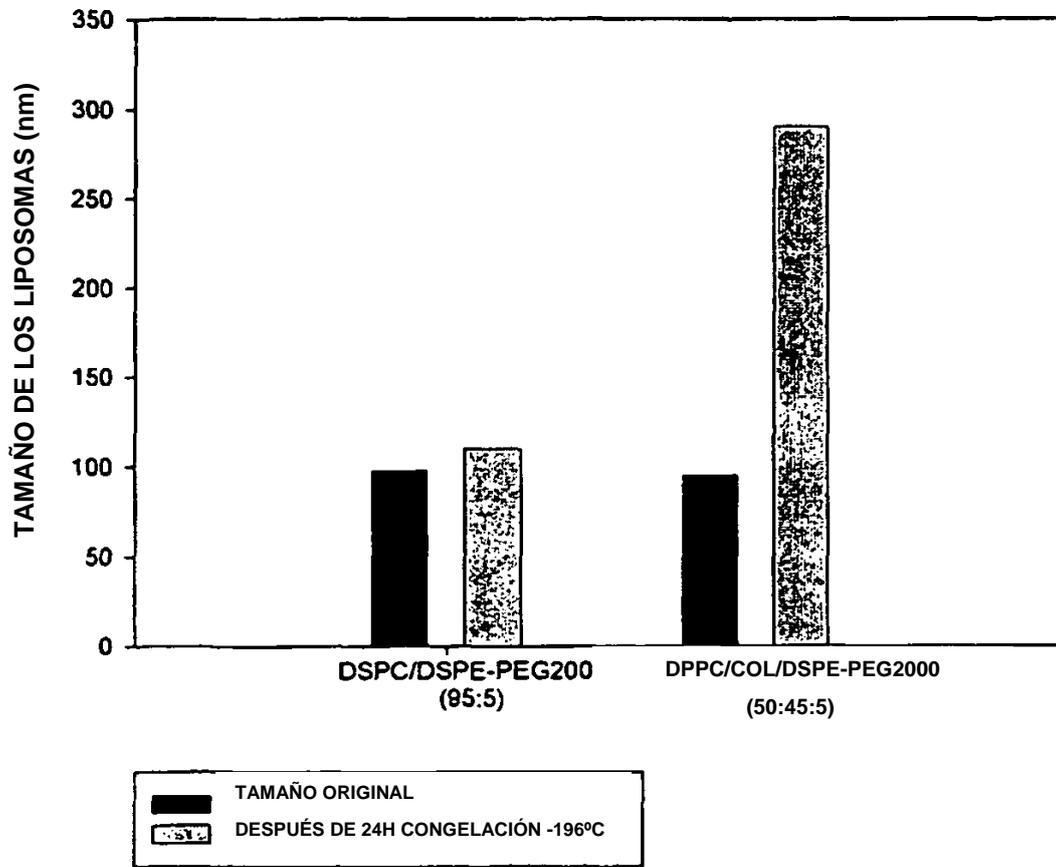


Figura 14

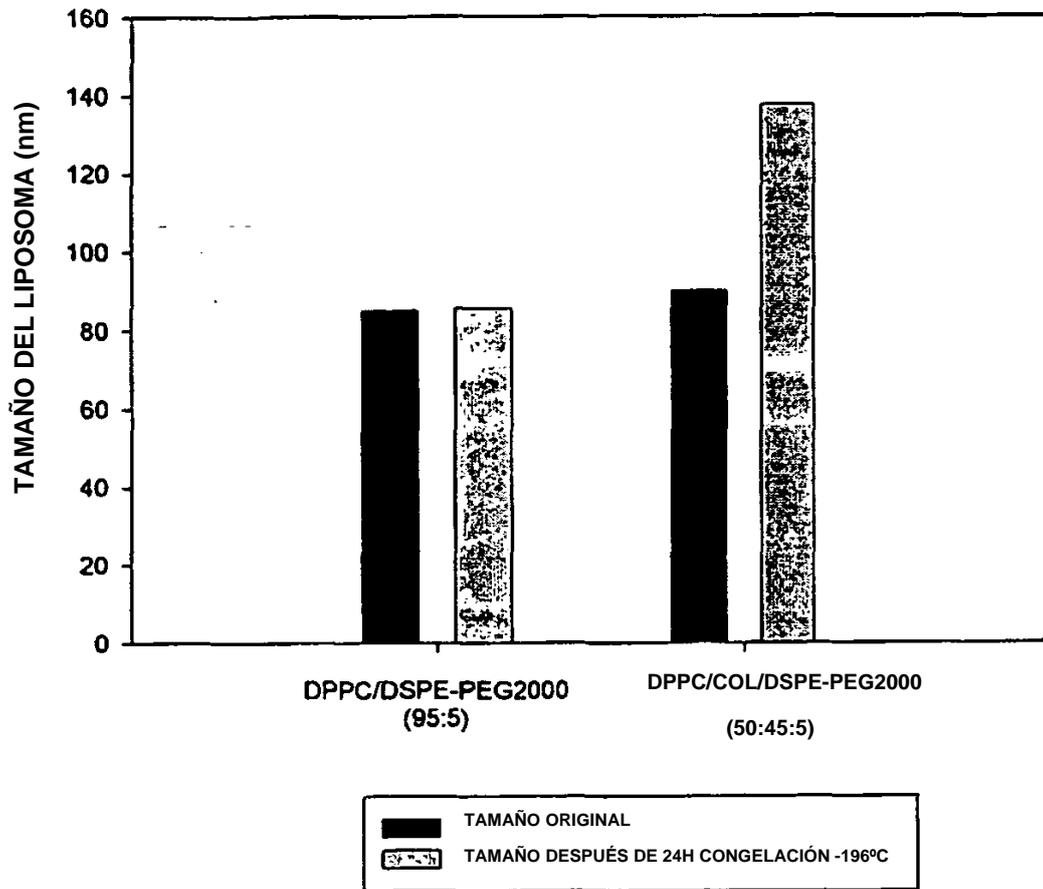


Figura 15

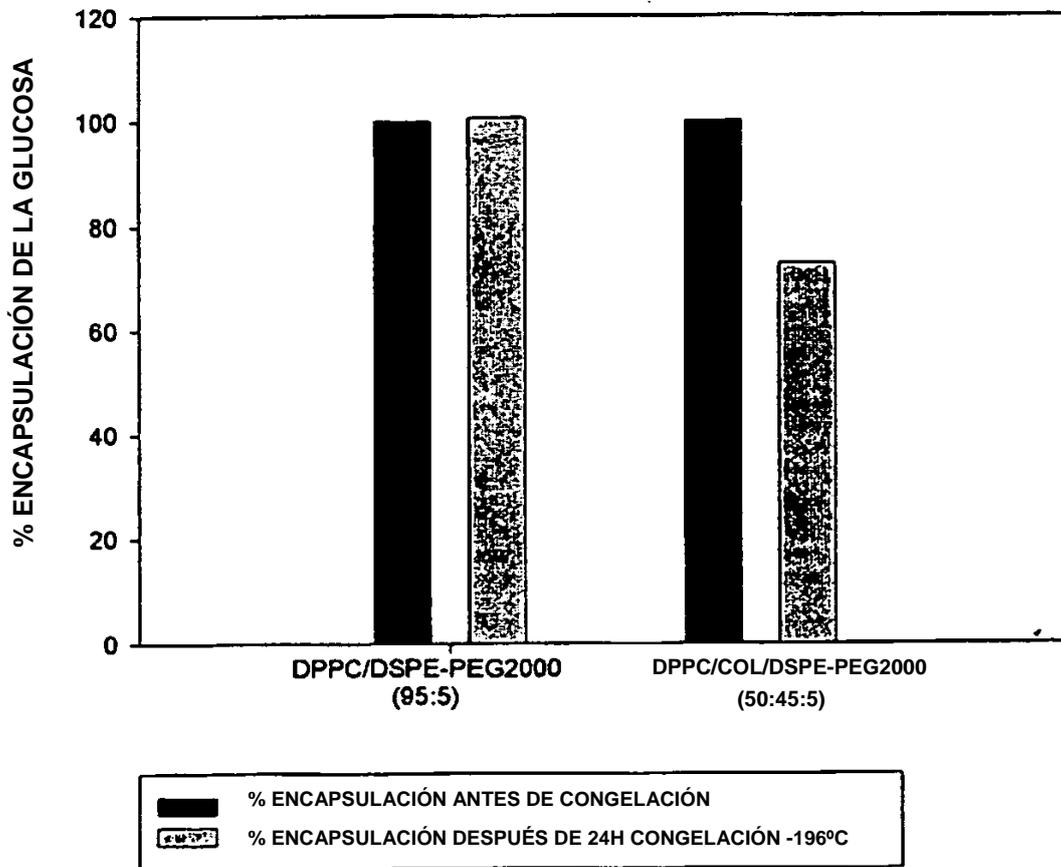


Figura 16

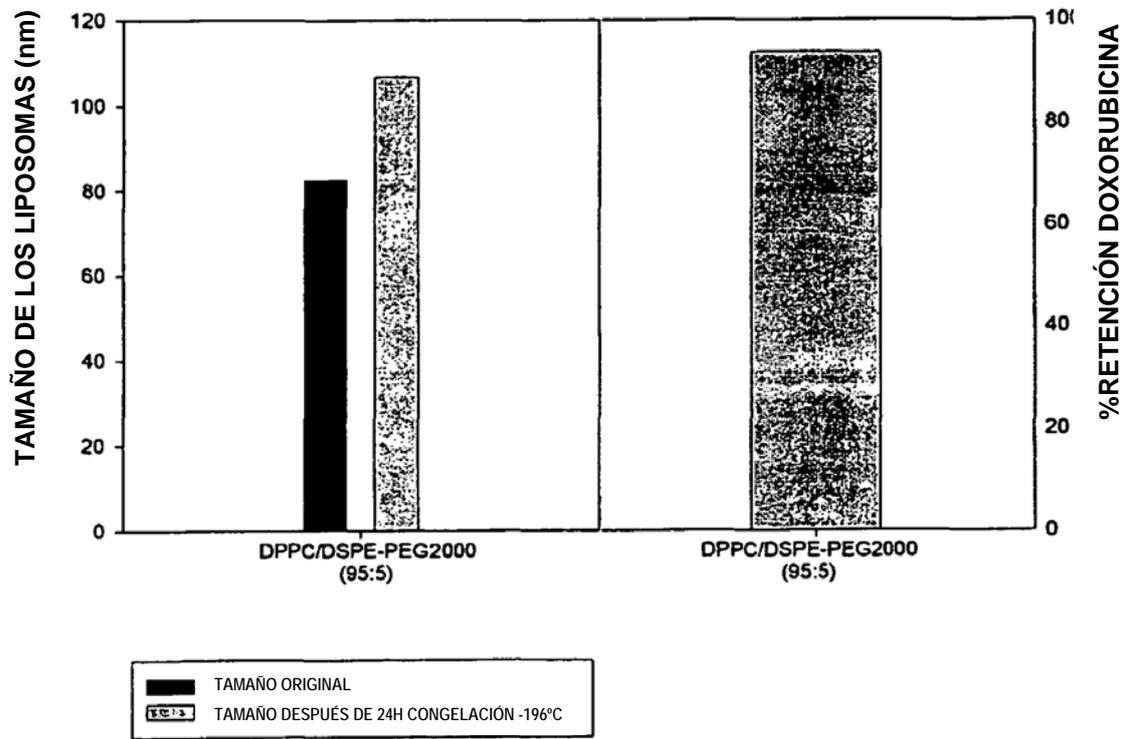


Figura 17

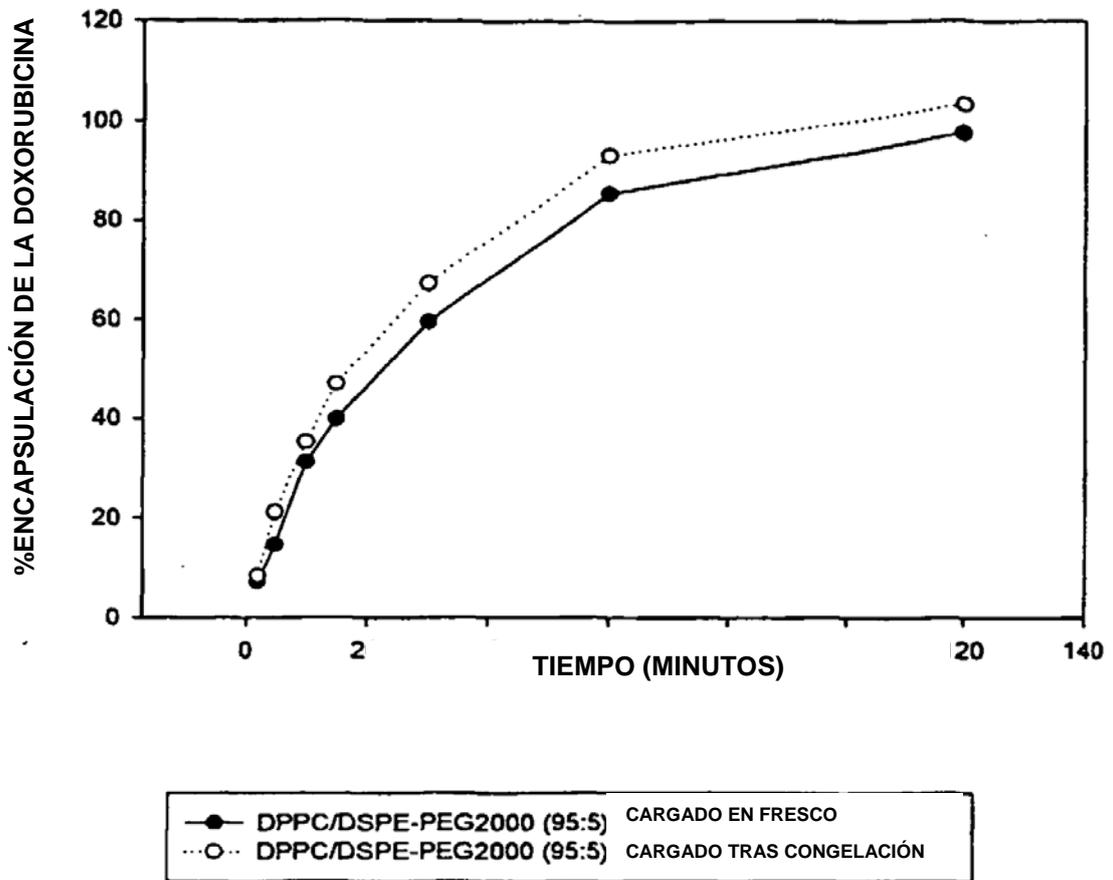


Figura 18

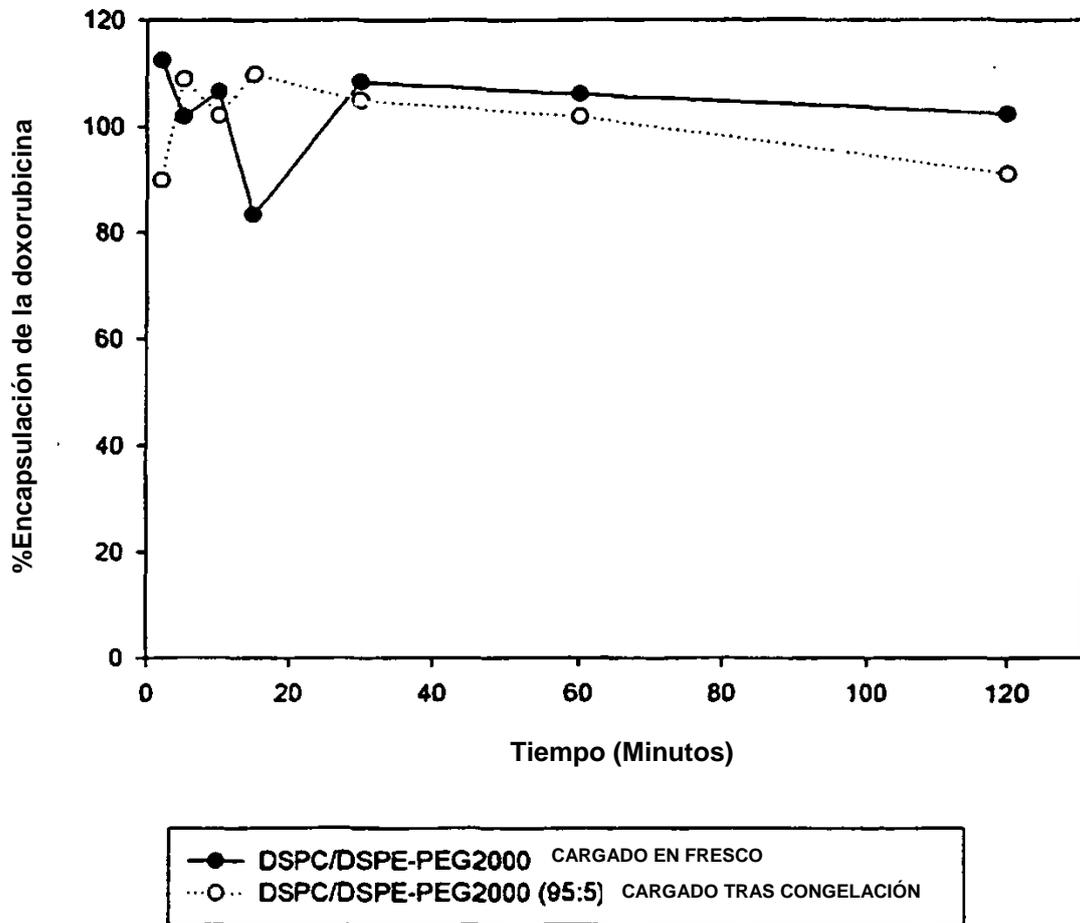


Figura 19