

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 170**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01) **A61K 31/555** (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01) **A61K 31/704** (2006.01)

A61K 31/282 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 31/203 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/475 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09749940 .4**

96 Fecha de presentación: **25.05.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2299977**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2011**

54 Título: **Liposomas para la administración de fármacos y procedimientos para su preparación**

30 Prioridad:
23.05.2008 DK 200800717
20.08.2008 EP 08014793

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.12.2012

73 Titular/es:
LIPLASOME PHARMA APS (100.0%)
Dandyvej 19
7100 Vejle, DK

72 Inventor/es:
VIKBJERG, ANDERS FALK;
PETERSEN, SUNE ALLAN;
MELANDER, FREDRIK;
HENRIKSEN, JONAS ROSAGER y
JØRGENSEN, KENT

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 170 T3

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

DESCRIPCIÓN

Liposomas para la administración de fármacos y procedimientos para su preparación

Antecedentes de la invención

5 Los liposomas son esferas microscópicas que se desarrollaron como vehículos/sistemas de administración de fármacos en los años 1980. Los primeros productos farmacéuticos basados en liposomas se aprobaron para uso comercial en los años 1990.

10 Los liposomas tienen tres compartimientos distintos que se pueden usar para transportar varios compuestos tales como, por ej., fármacos: El compartimiento acuoso interior, la bicapa hidrófoba, y la interfase polar del estrato interno y externo. Dependiendo de la naturaleza química del compuesto a ser encapsulado, éste estará localizado en cualquiera de los compartimientos. Actualmente, hay varias formulaciones parenterales liposoma-fármaco disponibles en el mercado. Los fármacos hidrosolubles tienden a estar localizados en el compartimiento acuoso de los liposomas, y los ejemplos de fármacos encapsulados en los liposomas son, por ej., doxorubicin ((Doxil), doxorubicin (Myocet) y daunorubicin (DaunoXone). Ejemplos de fármacos intercalados en la membrana liposomal son, por ej., amfotericina B (AmBisome), amfotericina (Albelcet B), benzoporfirin (Visudyne) y muramiltripéptido-fosfatidiletanolamina (Junovan).

15 De este modo, la tecnología liposomal ha proporcionado soluciones inteligentes para resolver los desafíos en la farmacología tales como por ej., aumentar la solubilidad del fármaco, reducir la toxicidad del fármaco, mejorar la liberación del fármaco focalizado, etc.

20 La propiedad de los liposomas como vehículos de administración del fármaco depende de forma crucial de su carga superficial, permeabilidad, solubilidad, estabilidad, etc. la cual está influenciada significativamente por los lípidos comprendidos en la composición liposomal. Además, el fármaco a ser encapsulado en el liposoma puede necesitar otros requerimientos a ser considerados para preparar una formulación liposomal estable.

25 Las consideraciones con respecto a la seguridad y eficacia del fármaco requieren que las formulaciones liposomales mantengan sus propiedades, es decir, permanezcan estables, desde el momento de la preparación hasta su administración. Además, es deseable que estas formulaciones estén intactas durante el transporte en el interior del sujeto tratado hasta que alcancen el sitio diana donde el fármaco es específicamente liberado. De este modo, existe la necesidad de obtener formulaciones liposomales mejoradas.

30 El documento WO 90/11781 describe los liposomas que comprenden fosfatidilcolina (50% en moles), fosfatidilglicerol (30% en moles) y colesterol (20% en moles). Los agentes terapéuticos que se pueden administrar comprenden factores de crecimiento, esteroides, antioxidantes, agentes no esteroideos antiinflamatorios y antibióticos. Los liposomas se preparan mediante el procedimiento de película y se pueden hidratar con tampón (que contiene fosfato, 0,9 mM de calcio y 0,49 mM de magnesio) después de la eliminación del solvente orgánico.

35 En el documento WO 2004/087105 se describen liposomas que comprenden distearoilfosfatidilcolina (DSPC) y distearoilfosfatidilglicerol (DSPG) en los cuales el carboplatino está inmovilizado.

Resumen de la invención

40 En un primer aspecto, la presente invención proporciona liposomas que son útiles para la administración de agentes bioactivos tales como los agentes terapéuticos de acuerdo con la reivindicación 1. Entre otros, los liposomas de la invención son capaces de administrar su carga útil en los sitios de actividad de la fosfolipasa secretora A₂ (sPLA₂) aumentada, porque la fosfolipasa A₂ (PLA₂) hidrolizará los lípidos del liposoma. De este modo, los liposomas de la invención se pueden usar, por ej., con relación a la terapia del cáncer. Un segundo aspecto de la invención es una formulación liposomal que comprende el liposoma de la invención. Otro aspecto más es un procedimiento para producir una formulación liposomal de la invención.

Divulgación de la invención

Breve descripción de los dibujos

45 La invención se explica en detalle a continuación con referencia a los dibujos, en los cuales

La figura 1 ilustra los espectros UV de oxaliplatino almacenado en la solución que contiene el 10% de sacarosa y 1 mM de gluconato de calcio durante el almacenamiento a temperatura ambiente.

50 La figura 2 ilustra la absorbancia relativa (día/día 0) a 254 nm para el oxaliplatino almacenado en una solución que contiene el 10% de sacarosa y 1 mM de gluconato de calcio durante el almacenamiento a temperatura ambiente (figura 1).

La figura 3 ilustra el efecto de las concentraciones variables de gluconato de calcio sobre la filtración de los liposomas (70/25/51% en moles DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) que contienen cisplatino (A) u oxaliplatino (B) después de 24 horas de almacenamiento en medios celulares (McCoy) a 37°C (eje primario). El grado inicial de encapsulación (DOE) se marca sobre el eje secundario.

5 La figura 4 ilustra la citotoxicidad del liposoma (70/25/5% en moles DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) de cisplatino encapsulado que contiene 1 mM de gluconato de calcio. Las células de carcinoma de colon HT-29 se trataron durante 6 horas (37°C) con cisplatino o cisplatino encapsulado en el liposoma en presencia o ausencia de la sPLA₂.

10 La figura 5 ilustra la citotoxicidad del liposoma (70/25/5% en moles DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) de oxaliplatino encapsulado que contiene concentraciones variables de gluconato de calcio, (A) 5 mM de gluconato de calcio, (B) 1 mM de gluconato de calcio, (C) 0,1 mM de gluconato de calcio, (D) 0,01 mM de gluconato de calcio, y (E) 0 mM de gluconato de calcio. Las células de carcinoma de colon HT-29 se trataron durante 6 horas (37°C) con oxaliplatino u oxaliplatino encapsulado en el liposoma en presencia o ausencia de la sPLA₂.

15 La figura 6 ilustra la citotoxicidad del liposoma (70/25/5% en moles DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) de cisplatino encapsulado que contiene concentraciones variables de gluconato de calcio. Las células de carcinoma de colon HT-29 se trataron durante 24 horas (37°C) con cisplatino en presencia o ausencia de la sPLA₂.

Figura 7. Cambios en el tamaño de partícula como función de la concentración de calcio para los liposomas encapsulados de oxaliplatino (70/25/5% en moles DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) que no contienen calcio después de 24 horas a temperatura ambiente. La concentración lipídica se mantiene a 0,84 mM.

20 Figura 8. Filtración de la formulación de de oxaliplatino encapsulado en el liposoma (70/25/5% en moles DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) que no contienen calcio después de 24 horas a temperatura ambiente como una función de la concentración del calcio. La concentración lipídica se mantiene a 0,84 mM.

Figura 9. La dependencia del tiempo de la intensidad de la fluorescencia de DSPC/DSPG/DSPE-PEG LUV que contiene 0,5% en moles de NBD-PE a 25°C. La flecha indica la adición de ditionita, calcio y tritón-X100.

25 Figura 10. Cambios en el tamaño de la partícula desde la etapa de sonicación hasta después de la primera etapa de diálisis (10% de sacarosa) como una función de DSPG en las formulaciones de oxaliplatino liposomal que contiene 5% en moles de DSPE-PEG2000 y DSPC.

Figura 11. Cambios en el tamaño de la partícula desde la primera etapa de diálisis (10% de sacarosa) hasta después de la segunda etapa de diálisis (10% de sacarosa + gluconato de calcio) como una función de DSPG en las formulaciones de oxaliplatino liposomal que contiene 5% en moles de DSPE-PEG2000 y DSPC.

30 Figura 12. Cambios en el tamaño de la partícula desde la sonicación hasta después de la segunda etapa de diálisis (10% de sacarosa +/- gluconato de calcio) como una función de DSPG en las formulaciones de oxaliplatino liposomal que contiene DSPC y 5% en moles de DSPE-PEG2000.

35 Figura 13. Relación de recuento iónico (Pt^{195}/P^{31}) para las formulaciones de oxaliplatino liposomal que contiene 5% en moles de DSPE-PEG2000 y cantidades variables de DSPC y DSPG después de la primera etapa de diálisis (10% de solución de sacarosa).

Figura 14. Relación de recuento iónico (Pt^{195}/P^{31}) para las formulaciones de oxaliplatino liposomal que contienen 5% en moles de DSPE-PEG2000 y cantidades variables de DSPC y DSPG después de la segunda etapa de diálisis (10% de solución de sacarosa +/- 1mM de gluconato de calcio).

40 Figura 15. % de diferencia en la relación de recuento iónico (Pt^{195}/P^{31}) para las formulaciones dializadas en solución sin calcio en comparación con las formulaciones dializadas con calcio (véase la figura 14).

Figura 16. Concentración de Pt en el dializado después de la segunda diálisis (10% de solución de sacarosa +/- 1 mM de gluconato de calcio) de las formulaciones de oxaliplatino liposomal que contienen 5% en moles de DSPE-PEG2000 y cantidades variables de DSPC y DSPG.

45 Figura 17. Correlación entre el tamaño final del liposoma y la concentración de oxaliplatino en las formulaciones. Las formulaciones de oxaliplatino liposomal (5% en moles de DSPE-PEG2000, y las cantidades variables de DSPC y DSPG) se prepararon con o sin 1 mM de gluconato de calcio durante la diálisis (véase la figura 14).

Figura 18. Estabilidad de las formulaciones de oxaliplatino liposomal (5% en moles de DSPE-PEG2000, y las concentraciones variables de DSPC y DSPG) en medios celulares McCoy (24 horas de incubación a 37°C).

50 Figura 19. 1.-6. Barridos de DSC de la formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma (60/35/5% en moles de DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) sin la presencia de gluconato de calcio. Velocidad de barrido: 20°C/h.

Figura 20. Barrido de DSC (1º barrido) de las formulaciones de oxaliplatino encapsulado en el liposoma que contienen 5% en moles de DSPE/PEG2000 y concentraciones variables de DSPC y DSPG y sin la presencia de gluconato de calcio. Velocidad de barrido: 20°C/h.

5 Figura 21. 1.-6. Barridos de DSC de la formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma (60/35/5% en moles de DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) con 1 mM de gluconato de calcio en el exterior. Velocidad de barrido: 20°C/h.

Figura 22. Barrido de DSC (1º barrido) de las formulaciones de oxaliplatino encapsulado en el liposoma que contienen 5% en moles de DSPE/PEG2000 y concentración de DSPG con 1 mM de gluconato de calcio en el exterior. Velocidad de barrido: 20°C/h.

10 Figura 23. Concentración de Pt en dializado después de a) 1º etapa de diálisis y b) 2º etapa de diálisis (10% de solución de sacarosa que contiene 1 mM de gluconato de calcio) de liposomas encapsulados de oxaliplatino.

Figura 24. 1.-6. Barridos de DSC de la formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma (60/35/5% en moles de DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) con 1 mM de gluconato de calcio tanto en el interior como en el exterior. Velocidad de barrido: 20°C/h.

15 Figura 25. Barrido de DSC (1º barrido) de las formulaciones de oxaliplatino encapsulado en el liposoma que contienen 5% en moles de DSPE/PEG2000 y concentraciones variables de DSPC y DSPG con 1 mM de gluconato de calcio tanto en el interior como en el exterior. Velocidad de barrido: 20°C/h.

Liposoma de la invención

20 Un enfoque para obtener la liberación desencadenadora del fármaco, por ej., en enfermedades cancerosas es utilizar niveles elevados de fosfolipasa secretora A₂ (sPLA₂) en la proximidad de los tejidos cancerosos. De este modo, al diseñar cuidadosamente la composición lipídica de los liposomas, se pueden tornar degradables por la sPLA₂ una vez acumulados en el tumor para dar la liberación desencadenada.

25 Un objetivo de la presente invención es proporcionar liposomas y formulaciones liposomales de estabilidad mejorada que puedan proporcionar su carga (por ej., un fármaco) en el sitio diana con la administración no controlada reducida y/o liberación demasiado temprana debido a la permeabilidad de la membrana liposomal. Otro objetivo es proporcionar liposomas y formulaciones liposomales con una estabilidad aumentada durante el almacenamiento.

Lípidos aniónicos del liposoma

30 En un primer aspecto, el liposoma comprende entre el 25% y el 45% (mol/mol) de un lípido aniónico. Los actuales inventores han tomado en cuenta que el contenido de lípido aniónico afecta importantes características del liposoma, tal como la velocidad de la hidrólisis lipídica del liposoma mediada por la sPLA₂ y además la respuesta inmune hacia el liposoma.

35 A medida que el contenido de lípido aniónico aumenta, también aumenta la velocidad de la hidrólisis lipídica por la sPLA₂ (y la liberación del fármaco). Se ha demostrado que se puede obtener una velocidad razonable de hidrólisis por el contenido lipídico aniónico entre el 25% y el 45%. De este modo, en una realización, el contenido de lípido aniónico es al menos del 25%. En otra realización, el contenido de lípido aniónico no es más del 45%. En otra realización más, el contenido lipídico aniónico del liposoma se selecciona del grupo que consiste entre 25% y 45%, 25-42%, 28% y 42%, 30% y 40%, 32% y 38% y 34% y 36%. Cuando se hace referencia al porcentaje de contenido, se hace referencia al % en moles/mol, a menos que se mencione específicamente lo contrario.

40 Como se mencionó, también la respuesta inmune hacia los liposomas se ve afectada por el contenido de lípido aniónico. De este modo, la velocidad de depuración del liposoma en el cuerpo se redujo al mantener el contenido de lípido aniónico en el liposoma por debajo de un cierto nivel y los actuales inventores han reconocido que el contenido de lípido aniónico en el liposoma puede ser utilizado para lograr un equilibrio entre la velocidad de hidrólisis de la sPLA₂ y la depuración por parte del sistema reticuloendotelial.

45 Preferentemente el lípido aniónico es un fosfolípido y preferentemente, el fosfolípido se selecciona del grupo que consiste en PI (fosfatidilinositol), PS (fosfatidil serina), DPG (bisfosfatidilglicerol), PA (ácido fosfatídico), PEOH (fosfatidil alcohol), y PG (fosfatidil glicerol). Más preferentemente, el fosfolípido aniónico es PG.

Polímeros hidrófilos

50 En una realización preferida, el liposoma además comprende un polímero hidrófilo seleccionado del grupo que consiste en PEG [poli(etilenglicol)], PAcM [poli(N-acriloilmorfolina)], PVP [poli(vinilpirrolidona)], PLA [poli(láctido)], PG [poli(glicólido)], POZO [poli(2-metil-2-oxazolona)], PVA [poli(vinil alcohol)], HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa), PED [poli(etilen óxido)], quitosán [poli(D-glucosamina)], PAA [poli(aminoácido)], poliHEMA [poli(2-hidroxietilmetacrilato)] y copolímeros de los mismos.

Con máxima preferencia, el polímero es PEG con un peso molecular entre 100 Da y 10 kDa. Particularmente preferidos son los tamaños de PEG de 2-5 kDa (PEG2000 a PEG5000), y el más preferido es PEG2000.

5 La inclusión de los polímeros sobre los liposomas es bien conocida por el experto en la técnica y se pueden usar para incrementar la vida media de los liposomas en el torrente sanguíneo, presumiblemente al reducir la depuración por el sistema reticuloendotelial.

Preferentemente, el polímero es conjugado al grupo principal de fosfatidil etanolamina. Otra opción es la ceramida (aunque este lípido no es hidrolizable proa la PLA₂).

10 El lípido conjugado por el polímero está preferentemente presente en una cantidad al menos del 2%. Más preferentemente, la cantidad es al menos del 5% y no más del 15%. Aún más preferentemente, la cantidad de lípido conjugado por el polímero es al menos del 3% y no más del 6%. Los liposomas que contienen los fosfolípidos aniónicos y ≤ 2,5% de DSPE-PEG2000 han incrementado la tendencia de agregarse en presencia de calcio. Esto se puede observar usualmente por la formación de gel de alta viscosidad. Los liposomas que contienen fosfolípidos aniónicos y > 7,5% hacen que los liposomas sedimenten o que se separe la fase. De este modo, otra ventana preferida es entre el 2,5% y el 7,5%.

15 Componentes lipídicos cargados de forma neutral en el liposoma

Preferentemente, el liposoma además comprende un fosfolípido no cargado seleccionado del grupo que consiste de fosfolípidos zwitteriónicos que comprenden PC (fosfatidil colina) y PE (fosfatidiletanolamina). Con máxima preferencia, el fosfolípido zwitteriónico es PC.

20 A diferencia del fosfolípido aniónico, el fosfolípido zwitteriónico es útil en la forma de un componente sPLA₂-lipídico hidrolizable de carga neutral en el liposoma. Al combinar el fosfolípido zwitteriónico y el fosfolípido aniónico en el mismo liposoma, es posible ajustar hasta una densidad de carga superficial deseada que cumpla tanto con la hidrólisis de la sPLA₂ suficientemente alta como con una velocidad de depuración baja en la sangre.

La cantidad de fosfolípido zwitteriónico en el liposoma es preferentemente entre el 40% y el 75% y más preferentemente entre el 50% y el 70%.

25 Fosfolípidos de éter

Algunos o todos los fosfolípidos pueden ser fosfolípidos de éter.

30 De este modo, pueden albergar un enlace de éter en lugar de un enlace de éster en la posición sn-1 del esqueleto de glicerol del fosfolípido. Cuando la sPLA₂ hidroliza este tipo particular de fosfolípidos, se producen los lisofosfolípidos de monoéter y estos son tóxicos, por ej., para las células cancerosas. Es decir, los fosfolípidos de éter pueden ser vistos como profármacos de lisofosfolípidos de mono-éter y los liposomas de la invención se pueden usar para proporcionar tales profármacos al ambiente mejorado de la sPLA₂ de las células cancerosas, donde los profármacos son activados por la hidrólisis de la sPLA₂. Los fosfolípidos de éter han sido descritos en los documentos EP 1254143 y WO 2006/048017.

Otros profármacos

35 El resto liberado del lípido por la sPLA₂ para crear un lisolípido también puede ser un fármaco. De este modo, un liposoma puede comprender profármacos de lisolípidos de monoéter, profármacos liberados del lípido por la sPLA₂ y otros agentes terapéuticos, como se indica a continuación.

Agente estabilizante

40 El liposoma además puede ser estabilizado por la inclusión de colesterol como componente membranoso en el liposoma. Sin embargo, altas cantidades de colesterol en el liposoma tienen un efecto negativo sobre la hidrólisis de la PLA₂ y por lo tanto el liposoma comprende no más del 10% de colesterol. Preferentemente, el liposoma comprende menos del 1% de colesterol, menos del 0,1 % o no comprende colesterol en absoluto.

45 La longitud de la cadena alquilo de los lípidos que comprende el liposoma se puede ajustar para la óptima velocidad de hidrólisis de la PLA₂ y una mínima filtración del compuesto inmovilizado fuera del liposoma. Preferentemente, las cadenas alquilo son cadenas saturadas C18 o C16.

Los liposomas de la invención se preparan mediante el procedimiento del tercer aspecto, en el cual los liposomas se estabilizan por la exposición a cationes divalentes.

Como se describió anteriormente, los liposomas pueden comprender profármacos de lisolípidos de monoéter y/o del resto liberado del lípido por la sPLA₂ para crear el lisolípido.

Los liposomas comprenden un compuesto bioactivo tal como un agente terapéutico (fármaco), el cual no es un profármaco del lisofosfolípido de monoéter o un lisofosfolípido de monoéter. El liposoma además puede comprender profármacos de lisofosfolípido de monoéter y un agente terapéutico. Los compuestos bioactivos son pequeñas moléculas. Una clase de compuestos de interés particular es los agentes antitumorales de pequeñas moléculas tales como los derivados de antraciclina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, doxorubicin, paclitaxel, 5-fluoruracilo, exisulind, ácido cis-retinoico, suldinac sulfuro, metotrexato, bleomicina y vincristina. Otra clase de interés particular es la de antibióticos y antifúngicos y aún otra clase es la de los agentes antiinflamatorios tales como esteroides y no esteroides. El liposoma puede comprender 1, 2, 3 o más de compuestos bioactivos diferentes. En una realización preferida, el liposoma comprende sólo 1 componente bioactivo. El liposoma puede comprender un agente de diagnóstico. Por "agente de diagnóstico" se entiende un agente que soporta la localización del tejido diana y/o el diagnóstico de la enfermedad y/o la afección. Ejemplos no limitantes podrían ser agentes de contraste, micropartículas, agentes radiactivos, agentes específicos diana tales como, por ej., agentes que se unen específicamente a los marcadores asociados con la enfermedad y/u otra afección, etc. Es claro para un experto que en algunas realizaciones la invención se refiere a una formulación liposomal en la cual el liposoma comprende al menos un fármaco como también un agente de diagnóstico.

Características físico-químicas de los liposomas

El liposoma puede ser unilamelar o multilamelar. Con máxima preferencia, el liposoma es unilamelar. El diámetro del liposoma debe ser entre 50 y 400 nm, preferentemente entre 80 y 160 nm y de máxima preferencia entre 90 y 120 nm.

Preferentemente, el Índice de Polidispersión (PDI) de la formulación liposomal del segundo aspecto de la invención no debe exceder 0,2 y más preferentemente debe ser 0,15 o menos o aún más preferentemente 0,10 o menos. Un valor de PDI en este intervalo expresa una distribución-tamaño de partícula relativamente reducido en la formulación

Como quedará claro a partir de lo anterior, se prefiere que al menos uno de los lípidos que comprende el liposoma sea un sustrato para la sPLA₂ cuando está presente en el liposoma.

En una realización, el liposoma comprende lípidos que son hidrolizados por la sPLA₂ en la posición sn-3 en lugar de hacerlo en la posición sn-2. Tales lípidos y liposomas no naturales que comprende lípidos no naturales han sido divulgados en el documento WO 2006/048017.

Los liposomas están presentes en la formulación liposomal del segundo aspecto. De este modo, han sido estabilizados por la exposición a cationes divalentes como se describe en el segundo aspecto. En una realización, los liposomas han sido expuestos únicamente a cationes divalentes después de la formación, es decir el interior de los liposomas no contienen cationes divalentes. En otra realización, solo el interior de los liposomas comprende cationes divalentes.

La presencia de cationes divalentes asociados a los liposomas de la invención no es verificable de forma directa. Sin embargo, los actuales inventores han descrito parámetros que son indicativos de si los liposomas han sido estabilizados por cationes divalentes.

Un barrido de DSC del oxaliplatino liposomal (70/25/5% en moles de DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) en ausencia de un catión divalente da una única temperatura de transición observada en forma de un pico. Si el barrido se repite, la temperatura de transición se modifica hacia temperaturas más altas, que podrían deberse a la liberación de oxaliplatino al exterior de los liposomas cuando pasan la temperatura de transición (figura 19). Los barridos de DSC repetidos de los liposomas que han sido expuestos a un catión divalente tienen una temperatura de transición más constante. De este modo, en una realización, los liposomas de la invención son característicos en el sentido de que los barridos de DSC repetidos del liposoma dan una temperatura de transición que difiere en no más de 2°C entre el primero y el segundo barrido. En otra realización, los liposomas de la invención son característicos en el sentido de que los barridos de DSC repetidos del liposoma dan una temperatura de transición que difiere menos entre el primero y el segundo barrido que la temperatura de transición de los liposomas de control de la misma composición.

Un barrido de DSC del oxaliplatino liposomal (70/25/5% en moles de DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) estabilizado por la exposición a un catión divalente da una temperatura de transición separada de la fase (dos picos en el barrido, véase, por ej., la figura 22). De este modo, en una realización de los liposomas de la invención, los liposomas son característicos en el sentido de que un barrido de DSC de los liposomas de una temperatura de transición separada de la fase.

Además, la temperatura de transición de los liposomas cambia hacia temperaturas más altas por la exposición a cationes divalentes y un procedimiento para determinar si los liposomas (ensayo) han sido expuestos a un catión divalente tal como calcio es determinar la temperatura de transición de los liposomas de control de la misma composición que los liposomas de ensayo, en el cual dichos liposomas de control no han sido expuestos a un catión divalente. De este modo, en una realización, los liposomas de la invención son característicos en el sentido de que tienen una temperatura de transición más alta que los liposomas de control de la misma composición los cuales no han sido expuestos a cationes divalentes.

En otra realización, los liposomas de la invención son característicos en el sentido de que el tamaño medio del liposoma no disminuye más del 10% y más preferentemente no más del 5%, cuando están expuestos a 1 mM de calcio. Si no han sido expuestos previamente al calcio, se reducirán cuando sean expuestos al calcio. Una forma de probar si los liposomas de ensayo han sido expuestos al calcio es por comparación con los liposomas de control de la misma composición, donde se sabe que éstos no han sido expuestos al calcio. De este modo, en una realización, los liposomas de la invención son característicos en el sentido de que manifiestan un grado de reducción cuando se exponen a 1 mM de calcio que es más pequeño que el grado de reducción para los liposomas de control de la misma composición, los cuales no han sido previamente expuestos a cationes divalentes.

Formulación liposomal

Un segundo aspecto de la invención es una formulación liposomal que comprende los liposomas de la invención. Preferentemente, la formulación también comprende un catión divalente a una concentración de al menos 0,1 mM. Los actuales inventores han descubierto que la presencia de un catión divalente (o la exposición previa a) estabiliza los liposomas de la formulación que conducen a la filtración reducida del compuesto bioactivo fuera de los liposomas. Sin embargo, se experimenta que la concentración del catión divalente no debe exceder 10 mM y no exceder 5 mM ya que tales concentraciones pueden conducir a la agregación de los liposomas y a indeseables elevadas viscosidades. La concentración del catión divalente no está por encima de 1 mM y preferentemente la concentración del catión divalente es entre 0,1 mM y 1 mM (figura 3). Un catión divalente preferido es el calcio.

En una realización preferida, el catión divalente se selecciona del grupo que consiste de magnesio (Mg^{2+}), hierro (Fe^{2+}), calcio (Ca^{2+}), berilio (Be^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), estroncio (Sr^{2+}), bario (Ba^{2+}), y radón (Ra^{2+}).

Se han ensayado varios cationes divalentes (no se muestran los datos) y los mejores efectos se observan con el Ca^{2+} , por lo que el Ca^{2+} es el preferido en la formulación.

Además, se experimenta que también el contraión de Ca^{2+} es importante en algunos casos. Por lo tanto, en una realización, el contraión se selecciona del grupo que consiste de aniones en masa tales como una sal orgánica, preferentemente seleccionada del grupo que consiste de gluconato, propionato o lactato. Más preferentemente el contraión es gluconato.

El catión divalente puede ser distribuido en el interior del liposoma, en el exterior del liposoma o en ambos el interior y el exterior del liposoma. El catión divalente, por lo tanto, puede estar presente en la solución de hidratación y/o en la solución en la cual la formulación liposomal es purificada, suspendida y/o almacenada. En una realización preferida, el catión divalente es distribuido en el exterior del liposoma, pero no en el interior del mismo. En esta realización, el catión divalente puede ser agregado después de la formación del liposoma.

La concentración de la sal de calcio a ser empleada puede depender de la formulación liposomal individual y del fármaco. Las sales tales como por ej., $CaCl_2$ o $NaCl$ a menudo son necesarias a ciertas concentraciones para estabilizar los liposomas. Sin embargo, el oxaliplatino es inestable en presencia de algunas sales, tales como por ej., $NaCl$, y el cisplatino es inestable en presencia de sales de fosfato o en agua pura. De este modo, el tipo de sal seleccionada y su concentración tendrá un impacto significativo en las propiedades formadoras de vesículas, y en consecuencia, dependiendo del fármaco a ser encapsulado se deben seleccionar varias sales y diferentes concentraciones de sal deben usarse para la preparación de una formulación liposomal.

Preferentemente, el Índice de Polidispersión (PDI) de la formulación liposomal no debe exceder 0,2 y con preferencia debe ser 0,10 o menos. Un valor de PDI en este intervalo expresa una distribución-tamaño de partícula relativamente reducido en la formulación

Conservación de la formulación liposomal

En una realización preferida, la formulación liposomal además comprende un agente cryo y/o lio protector.

Durante el almacenamiento de los liposomas los fosfolípidos pueden experimentar la hidrólisis. Una forma simple de prevenir la descomposición de los fosfolípidos en la formulación liposomal es mediante la congelación o la liofilización.

Sin embargo la congelación puede inducir a la filtración de la formulación liposomal y dar por resultado la liberación del fármaco encapsulado. La adición de un agente cryo protector puede ser necesaria para prevenir o reducir la filtración de la preparación liposomal después de la congelación. De este modo, la formulación liposomal puede comprender además un agente cryo protector. Ejemplos de agentes que se pueden usar como agentes cryo protectores pueden ser sin limitación los disacáridos, tales como sacarosa, maltosa y/o trehalosa. Tales agentes se pueden usar a varias concentraciones dependiendo de la preparación y del agente seleccionado como para obtener una solución isotónica.

El liposoma además se puede liofilizar, almacenar y reconstituir de tal forma que se retiene una porción sustancial de su contenido interno. La deshidratación del liposoma requiere en general el uso de un agente lio protector tal

5 como un disacárido (sacarosa, maltosa o trehalosa) tanto en la interfase interior como exterior de la bicapa liposomal. Se cree en general que este compuesto hidrófilo previene la redistribución de los lípidos en la formulación liposomal, de modo que el tamaño y el contenido se mantienen durante el procedimiento de secado y a través de la posterior reconstitución. Las cualidades apropiadas para tales agentes protectores del secado son que poseen características químicas que preservan el espaciado intermolecular de los componentes de la bicapa liposomal.

Procedimiento para preparar una formulación liposomal

Un tercer aspecto de la invención es un procedimiento para preparar una formulación liposomal que comprende las etapas:

- a) preparar una mezcla lipídica disolviendo los lípidos seleccionados en un solvente orgánico.
- 10 b) hidratar el producto de la etapa a) con un solvente de hidratación acuoso para formar los liposomas
- c) eliminar el solvente orgánico del paso a) o bien antes de la adición del solvente de hidratación acuosa o después de la adición del solvente de hidratación acuosa.

Preferentemente, el solvente orgánico se elimina antes de la adición del solvente de hidratación.

El procedimiento además comprende el mezclado de alta velocidad para reducir el tamaño de los liposomas.

15 El procedimiento además puede comprender la etapa de extrusión de los liposomas producidos en la etapa c) a través de un filtro para producir los liposomas de un cierto tamaño medio.

El procedimiento además puede comprender una etapa de sonicación de la formulación liposomal para producir los liposomas de un cierto tamaño.

20 Los liposomas se pueden cargar con al menos un agente terapéutico solubilizando el fármaco en el solvente orgánico o el solvente de hidratación usado para preparar los liposomas.

De forma alternativa, el agente terapéutico ionizable se puede cargar en los liposomas primero formando los liposomas, estableciendo un potencial electroquímico, por ej., por medio de un gradiente del pH, a través de la capa liposomal externa, y posteriormente agregando el agente terapéutico ionizable al medio acuoso externo al liposoma.

25 En una realización preferida, el solvente de hidratación comprende un catión divalente a una concentración de al menos 0,1 mM y más preferentemente a una concentración entre 0,1 mM y 5 mM y con máxima preferencia entre 0,1 mM y 1 mM. Preferentemente, el catión divalente es Ca^{2+} . En otra realización, el solvente de hidratación no comprende un catión divalente. En esta realización, se prefiere que la fase acuosa externa sea cambiada a otra fase acuosa externa que comprenda un catión divalente como se describe a continuación.

30 En otra realización, el procedimiento además comprende una etapa de cambiar la fase acuosa externa de la formulación. Inicialmente, la fase acuosa comprenderá el solvente de hidratación. La fase acuosa externa puede ser cambiada por centrifugación, ultrafiltración, diálisis o similar a fin de preparar una formulación liposomal que comprende los liposomas en una solución de composición definida de la fase acuosa externa. Preferentemente, los compuestos bioactivos (agentes terapéuticos) están sólo presentes dentro o unidos a los liposomas y no como compuestos libres en solución. Preferentemente, la encapsulación del fármaco en los liposomas debe ser >70%, más preferentemente >95% y con máxima preferencia >99%. El grado de encapsulación del fármaco es la relación del fármaco encapsulado y la cantidad total del fármaco en la formulación.

35 En una realización preferida, la fase acuosa externa se cambia a otra fase acuosa externa que comprende un catión divalente a una concentración de al menos 0,1 mM y más preferentemente a una concentración entre 0,1 mM y 5 mM y con máxima preferencia entre 0,1 mM y 1 mM. Preferentemente, el catión divalente es Ca^{2+} .

40 Los actuales inventores han descubierto que los liposomas pierden inicialmente el compuesto inmovilizado cuando se exponen al calcio. Además, los liposomas se condensan para dar diámetros de partículas más pequeños. Sin embargo, después de la filtración inicial los liposomas expuestos al Ca^{2+} manifiestan una filtración reducida como se observa por ej. en el caso de la incubación en los medios celulares (por ej. medio McCoy; figura 3). Debido a la filtración inicial, la diálisis y/o la centrifugación se realiza normalmente para separar los liposomas del material perdido. Además se puede realizar la filtración.

45 En una realización preferida del Segundo aspecto, la formulación liposomal se produce mediante el procedimiento del tercer aspecto.

Medicamentos

50 Un quinto aspecto de la invención es el liposoma del primer aspecto o la formulación liposomal del segundo aspecto para su uso como medicamento.

Un sexto aspecto de la invención es el liposoma del primer aspecto o la formulación liposomal del segundo aspecto para su uso para el tratamiento de afecciones, donde se incrementa la actividad de la PLA₂. Tales afecciones son por ej. el cáncer y las enfermedades inflamatorias.

Ejemplos

5 **Ejemplo 1: Preparación del cisplatino encapsulado en el liposoma y el oxaliplatino encapsulado en el liposoma.**

10 El cisplatino encapsulado en el liposoma y el oxaliplatino encapsulado en el liposoma son formulaciones liposoma-fármaco en las cuales el cisplatino o el oxaliplatino del fármaco está encapsulado en el compartimiento acuoso del liposoma. Las formulaciones liposoma-fármaco están compuestas del fármaco encapsulado en una mezcla lipídica producida de 5% en moles de mPEG2000-diteoril-fosfatidiletanolamina (DSPE-PEG2000); 25% en moles de disteroílfosfatidilglicerol (DSPG); y 70% en moles de disteroílfosfatidilcolina (DSPC). El procedimiento específico para cada formulación se indica a continuación.

Cisplatino encapsulado en el liposoma

15 Se disolvieron fosfolípidos en 9:1 (v/v) de cloroformo/metanol. El solvente de las mezclas lipídicas disueltas se evaporó a continuación en un baño de agua caliente a 65°C hasta sequedad visual, en una corriente de gas nitrógeno. Las muestras se secaron adicionalmente al vacío durante toda la noche.

20 El líquido de hidratación (solución de cloruro de sodio y gluconato de calcio, ambos de concentraciones variables) que contienen cisplatino se agregaron a la mezcla lipídica seca a una temperatura de 65°C-70°C para la preparación de vesículas multilamelares (MLV). Las suspensiones lipídicas se mantuvieron a 65-70°C durante al menos 30 min a fin de asegurar la hidratación completa. Durante este periodo, las suspensiones lipídicas se mezclaron en vórtex durante 5 min. Las vesículas unilamelares grandes (LUV) se prepararon por sonicación de 5 min a 65°C de la MLV seguido de la extrusión a través de filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm a 65-70°C. Las LUV se transfirieron posteriormente a los casetes de diálisis (MWCO: 10 kDa) para eliminar el cisplatino transferido.

Oxaliplatino encapsulado en el liposoma

25 Se disolvieron fosfolípidos en 9:1 de cloroformo/metanol. Las mezclas lipídicas disueltas se evaporaron a continuación en un baño acuoso a 65°C hasta sequedad visual, en una corriente de nitrógeno. Las muestras se secaron adicionalmente al vacío durante toda la noche.

30 El tampón de hidratación (10% de solución de sacarosa con concentraciones variables de diferentes sales de calcio) que contienen oxaliplatino se agregaron a la mezcla lipídica seca para la preparación de vesículas multilamelares (MLV). Las suspensiones lipídicas se mantuvieron a 65-70°C durante al menos 30 min a fin de asegurar la hidratación completa. Durante este periodo, las suspensiones lipídicas se mezclaron en vórtex cada 5 min. Posteriormente las vesículas unilamelares grandes (LUV) se prepararon por sonicación de 5 min a 65-70°C de la MLV seguido de la extrusión a través de filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 100 nm a 65-70°C. Las LUV se transfirieron posteriormente a los casetes de diálisis (MWCO: 10 kDa) para eliminar el oxaliplatino transferido.

35 Los estimados para el contenido de Pt externo al cisplatino encapsulado en el liposoma o el oxaliplatino encapsulado en el liposoma se basa en el equilibrio de la muestra seguido de un paso de separación por filtración centrífuga. El contenido de Pt se cuantifica por el uso de ICP-MS

40 **Tabla 1:** Contenido de cisplatino en la formulación de cisplatino liposomal con contenido variable de gluconato de calcio.

Gluconato de calcio (mM)	Contenido de cisplatino (mg/ml)
0	1,10
0,10	0,49
1,00	0,77

Tabla 2: Contenido de oxaliplatino en la formulación de oxaliplatino liposomal con contenido variable de gluconato de calcio.

Gluconato de calcio (mM)	Contenido de oxaliplatino (mg/ml)
0	0,40
0,01	0,45
0,10	0,82
1,00	1,24
5,00	1,01

Ejemplo 2: Estabilidad del oxaliplatino en solución de hidratación.

5 Se disolvió oxaliplatino en una solución de hidratación que contienen 10% de sacarosa y 1 mM de gluconato de calcio (10 mg/ml). Se agregó sacarosa para obtener una osmolaridad que corresponde aproximadamente a la concentración de sal fisiológica. La estabilidad del oxaliplatino en la solución de hidratación fue seguida de la medición UV. Las muestras se tomaron continuamente durante el almacenamiento a temperatura ambiente. La concentración de la muestra medida fue de 0,1 mg/ml de oxaliplatino. A fin de seguir la estabilidad del oxaliplatino se realizó un barrido desde 200-350 nm (figura 1) y la absorbancia a 254 nm se comparó durante el almacenamiento (figura 2). Los principales cambios en la absorbancia a 254 nm se relacionan usualmente con la descomposición de oxaliplatino, lo cual se puede observar fácilmente disolviendo el oxaliplatino en soluciones que contienen hidróxido y/o iones de cloruro. Además se ensayaron varios componentes tampónes comunes tales como fosfato, citrato, acetato, etanolamina, sin embargo se observó que disminuyen la absorbancia a 254 nm (no se muestran datos). El oxaliplatino disuelto en 10% de solución de sacarosa que contiene 1 mM de gluconato de calcio mostró que prácticamente no tiene descomposición durante el almacenamiento a temperatura ambiente durante al menos 35 días.

Ejemplo 3: Estabilidad del oxaliplatino encapsulado en el liposoma.

20 La estabilidad de las formulaciones de oxaliplatino encapsulado en el liposoma (70/25/5% en moles de DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) se examinó midiendo la filtración pasiva de las especies de platino de la formulación almacenada en el medio celular (McCoy, figura 5A) a 37°C. Las muestras se tomaron a t = 0 y t = 24 horas. La filtración de los liposomas se informó como la diferencia entre el contenido de platino en la fase acuosa externa inmediatamente después de la adición a los medios celulares y después de 24 horas de incubación a 37°C.

Determinación del grado de encapsulación:

- 25 1. 50 µl de formulación liposomal se diluye en McCoy hasta un volumen total de 5 ml.
2. El tubo que contiene la formulación diluida se almacena a 37°C durante 24 horas.
3. 2 ml de muestra diluida (0 hora y 24 horas) se carga sobre filtros Millipore centricon YM-30, los cuales se hacen girar durante 20 min a 15°C y 2500g.
4. 200 µl de filtrado se recolectan y se diluyen hasta un volumen total de 2 ml usando McCoy.
- 30 5. 200 µl de muestra diluida se diluyen posteriormente en un volumen total de 2 ml.
6. El contenido de Pt de las muestras se mide por ICP-MS. La curva estándar se prepara en los medios McCoy.

35 Este medio celular se usó para la subsiguiente evaluación del efecto citotóxico del oxaliplatino encapsulado en el liposoma sobre las células del carcinoma de colon HT-29. La filtración incrementada de los liposomas al cabo del almacenamiento en el medio celular da por resultado la citotoxicidad inespecífica. La formulación debe tener citotoxicidad mínima cuando no se ha sometido a la hidrólisis de la sPLA₂. Concentraciones variables de gluconato de calcio (0-5 nM) en la formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma se examinaron por su capacidad de estabilizar los liposomas (figura 5).

40 Se demostró claramente que las formulaciones preparadas con una concentración creciente de gluconato de calcio hasta 5 mM incrementaron la estabilidad del oxaliplatino encapsulado en el liposoma en los medios McCoy a medida que la filtración de los liposomas disminuía (figura 3). El grado inicial de encapsulación (medido inmediatamente después de la adición del medio celular) también se incrementó con las concentraciones crecientes de gluconato de

5 calcio. A fin de examinar si el efecto estabilizante que se observó a partir del gluconato de calcio sobre la formulación liposomal se relacionaba con el calcio o el gluconato, se examinó posteriormente si otros compuestos que contienen calcio o gluconato pudieron estabilizar la formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma. Como se demostró en la tabla a continuación fue evidente que otros compuestos de calcio también fueron capaces de estabilizar la formulación liposomal, mientras que el gluconato de sodio no pudo. El lactato de calcio y el propionato de calcio tienen un efecto estabilizante sobre la formulación en comparación con el gluconato de calcio. Estos resultados sugieren que el calcio es responsable por el efecto estabilizante sobre las formulaciones liposomales.

Tabla 3: Ensayo de diferentes sales

Formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma (70/25/5 mol% DSPD/DSPG/DSPE-PEG2000)	Oxaliplatino (mg/ml)	DOE t=0h (%)	DOE t=24 h (%)	Filtración (%)
1 mM de gluconato de sodio	0,64	68	55	13
1 mM de lactato de calcio	0,80	99	98	1
1 mM de propionato de calcio	1,22	99	98	1

10

Además se examinó de qué manera la formulación liposomal se vio afectada por la presencia de gluconato de calcio en el interior o exterior únicamente. Como se demostró en la tabla a continuación, fue bastante evidente que la formulación liposomal que contiene calcio en el interior únicamente no es muy buena para estabilizar la formulación de oxaliplatino liposomal. Al haber calcio en el exterior únicamente se demostró la formulación liposomal se estabiliza bastante bien.

15

Tabla 4: Ensayo de localización del gluconato de calcio

Formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma (70/25/5 mol% DSPD/DSPG/DSPE-PEG2000)	Oxaliplatino (mg/ml)	DOE t=0h (%)	DOE t=24 h (%)	Filtración (%)
1 mM de gluconato de calcio, interior	0,61	68	46	22
1 mM de gluconato de calcio, externo	0,64	96	92	4
1 mM de gluconato de calcio, interior + exterior	1,51	100	99	1

Ejemplo 4: Lípidos de éter anticancerosos

Se usaron fosfolípidos de éter para preparar una formulación liposomal de oxaliplatino encapsulado en una mezcla lipídica (25% en moles 1-O-octadecil-2-octadecanoil-sn-glicer-3-fosfoglicerol (1-O-DSPG), 70% en moles de 1-O-octadecil-2-octadecanoil-sn-glicer-3-fosfocolina (1-O-DSPC) y 5% en moles de dioctadecanoil-sn-glicer-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi-(polietilenglicol)2000](DSPE-PEG2000) en una solución que contiene 10% de sacarosa y 1 mM de gluconato de calcio.

Después del almacenamiento en medio McCoy a 37°C durante 24 horas, únicamente se observó el 4% de filtración de oxaliplatino.

Ejemplo 5: Citotoxicidad del oxaliplatino encapsulado en el liposoma.

La actividad citotóxica del oxaliplatino encapsulado en el liposoma se evaluó en células de carcinoma de colon (HT-29) (figura 5). La línea celular HT-29 no tiene la capacidad de secretar la PLA₂. Se usó oxaliplatino libre como referencia. Las células HT-29 se trataron durante 6 horas con oxaliplatino u oxaliplatino encapsulado en el liposoma en presencia o ausencia de la PLA₂. Se agregó PLA₂ de una fuente externa tal como fluido lagrimal para mostrar que se había producido la liberación completa del oxaliplatino. Con la formulación liposomal estable la HT-29 no debe verse afectada por una presencia tal. A fin de liberar el oxaliplatino del liposoma es necesaria la presencia de una fuente de PLA₂. Sin embargo con formulaciones liposomales inestables se puede producir filtración, y de este modo afectar las células HT-29 a pesar de la ausencia de PLA₂. Es evidente que cuando la concentración de gluconato de calcio en la formulación se incrementa la filtración del liposoma disminuye. Los resultados se correlacionan bien con el estudio de estabilidad in vitro (figura 3B) si se observara que la filtración de los liposomas se puede disminuir aumentando la concentración de gluconato de calcio.

Ejemplo 6. Estabilidad de las formulaciones de cisplatino liposomal que contienen gluconato de calcio

Objetivo:

Examinar la estabilidad de las formulaciones de cisplatino liposomal (70/25/5% en moles de DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) que contiene gluconato de calcio en medio McCoy. El objetivo es hallar una formulación que tengan un mínimo de filtración en el medio McCoy.

Protocolo:

Las formulaciones liposomales (50 µl) se mezclaron con medio 4950 µl McCoy y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las muestras se tomaron a t = 0 y t = 24 horas. La formulación de cisplatino se prepara con concentraciones variables de gluconato de calcio.

Grado de encapsulación:

1. 50 µl de formulación liposomal se diluye en McCoy hasta un volumen total de 5 ml.
2. El tubo que contiene la formulación diluida se almacena a 37°C durante 24 horas.
3. 2 ml de muestra diluida (0 hora y 24 horas) se carga sobre filtros Millipore centricon YM-30, los cuales se hacen girar durante 20 min a 15°C y 2500g.
4. 200 µl de filtrado se recolectan y se diluyen hasta un volumen total de 2 ml usando McCoy.
5. 200 µl de muestra diluida se diluyen posteriormente en un volumen total de 2 ml.
6. El contenido de Pt de las muestras se mide por ICP-MS. La curva estándar se prepara en los medios McCoy.

Resultados:

Formulación		Externo t=0 (ppm)	DOE t=0h (%)	Externo ppm 24	DOE t=24 h (%)	Total (ppm)	Filtración (%)
Cisplatino liposomal	100 uM de gluconato de calcio	9	98	30	92	390	5
Cisplatino liposomal	1 mM de gluconato de calcio	2	99	12	96	338	3

Las formulaciones de cisplatino encapsulado en el liposoma que contienen 100 μM y 1 mM de gluconato de calcio tuvieron un grado reducido de filtración en comparación con las observaciones previas realizadas con formulaciones preparadas sin la presencia de gluconato de calcio.

5 Este medio celular se usó para la subsiguiente evaluación del efecto citotóxico del cisplatino encapsulado en el liposoma sobre las células de carcinoma de colon HT-29 (figura 4 y figura 6).

Es evidente que cuando la concentración de gluconato de calcio en la formulación se incrementa la filtración del liposoma disminuye. Los resultados se correlacionan bien con el estudio de estabilidad in vitro (figura 3A) si se observara que la filtración de los liposomas se puede disminuir aumentando la concentración de gluconato de calcio.

Ejemplo 7. Efecto del calcio sobre la formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma

10 **Objetivo:** Examinar el efecto de adicionar o diluir la formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma con una solución de gluconato de calcio.

15 La formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma se preparó sin calcio (10% de sacarosa en el interior y exterior). La formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma se diluyó en concentraciones variables de calcio (concentración lipídica mantenida a 0,84 mM). Las muestras se equilibraron 24 horas, y el grado de encapsulación (DOE; %) y se midieron los tamaños de las partículas.

20 Una suspensión de liposomas (70/25/5% en moles, PC/PG/PE-PEG) que contiene 0,5% en moles de 1,2-dipalmitoil-fosfatidiletanolamina con la sonda fluorescente 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ilo enlazado covalentemente al grupo principal (NBDPE) (Fluka, Buchs, Suiza) se preparó en sacarosa al 10%. Las moléculas de la sonda NBD se excitaron a 465 nm y el pico de la longitud de onda de emisión se observó a 535 nm usando un espectrofluorómetro SLM DMX-1000. Una alícuota de 2,5 ml de 0,1 mM de suspensión lipídica recién preparada se colocó en una cubeta a temperatura constante (25°C), y se equilibró durante 5 min antes de la adición del extintor de ditionita irreversible a la fase acuosa externa. El mezclado rápido de muestras se obtuvo en las cubetas con una barra de agitación magnética. La decadencia dependiente del tiempo de la intensidad de la fluorescencia se controló después de la adición de 30 μl de ditionita de sodio recién preparada (1M de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ en solución 1M de reserva de tampón Trizma. Después de 300 segundos se adicionan 30 μl de gluconato de calcio. La adición subsiguiente de 10 μl de Triton al 10% X-100 al 100% a las preparaciones liposomales dio por resultado la extinción completa de fluorescencia NBD-PE en segundos.

Resultados

30 **Tabla 1.** Análisis del tamaño de la partícula de la formulación de oxaliplatino liposomal ((70/25/5% en moles de DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) almacenada en varias concentraciones de gluconato de calcio (24 horas a temperatura ambiente). El contenido de lípidos se mantiene a 0,84 mM.

Ca ²⁺ [μM]	conc.	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Media	SD
0		115,9	111,4	111	112,7667	2,720907
1		114,3	113,1	113,1	113,5	0,69282
5		109,7	110,2	110,1	110	0,264575
10		108,5	107,5	107,5	107,8333	0,57735
50		103,8	101,5	101,9	102,4	1,228821
100		101,2	102,9	100,5	101,5333	1,234234
500		97,2	98,48	99,05	98,24333	0,947435
1000		101,8	103,5	101,9	102,4	0,953939
5000		109,4	107,4	106,5	107,7667	1,484363

35 **Tabla 2.** Análisis del Pt del oxaliplatino encapsulado en el liposoma (70/25/5% en moles de DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000) almacenado en varias concentraciones de gluconato de calcio (24 horas a temperatura ambiente). El contenido de lípidos se mantiene a 0,84 mM.

Ca ²⁺ conc. [μ M]	Externo [ppm]	Total [ppm]	Filtración (%)
0	1,41	61,06	2,32
1	1,42	64,87	2,19
5	1,59	62,41	2,55
10	1,90	62,20	3,06
50	7,60	61,83	12,29
100	12,73	100,49	12,67
500	22,41	68,89	32,53
1000	21,67	67,89	31,91
5000	22,03	67,67	32,55

Se podría observar que el tamaño de las partículas de los liposomas disminuyó al cabo del almacenamiento en una solución que contiene concentraciones variables de calcio (figura 7). La filtración de la formulación aumentó con un incremento del calcio en el exterior (figura 8). La adición de calcio a la formulación que contiene la sonda NBD-PE, la cual había sido extinguida no indujo una extinción posterior (figura 9). Los resultados indican que la adición de calcio no induce la permeabilidad transitoria. Estos datos indican que el calcio condensa la membrana liposomal, lo cual hace que el tamaño de la partícula disminuya y libere el fármaco.

Ejemplo 8. Efecto del Ca²⁺ sobre la formulación de oxaliplatino liposomal; parte I

Objetivo:

Examinar el efecto de tener sólo calcio en la fase acuosa externa de varias formulaciones liposomales que contienen DSPC, DSPG y DSPE-PEG2000 en términos de tamaño de partícula, Pt total, DOE, y estabilidad. Seguir la posible interacción entre Ca²⁺ y oxaliplatino con las membranas, se condujo DSC sobre las diferentes formulaciones.

Protocolo

Se prepararon cinco formulaciones liposomales diferentes de oxaliplatino sin calcio en el interior. El contenido de DSPG y de DSPC varió en las formulaciones liposomales de la siguiente manera:

1. 80:15:5 % en moles de PC/PG/PE-PEG

2. 70:25:5 % en moles de PC/PG/PE-PEG

3. 60:35:5 % en moles de PC/PG/PE-PEG

4. 50:45:5 % en moles de PC/PG/PE-PEG

5. 40:55:5 % en moles de PC/PG/PE-PEG

Se sonicaron 4 ml de oxaliplatino encapsulado en el liposoma (1 min/ml) a 75°C, seguido del enfriamiento para precipitar el exceso de oxaliplatino. El sobrenadante se transfirió a cámaras de diálisis (MWCO: 10 kDa), y se dializó contra el 10% de solución de sacarosa. Se colocaron 1,75 ml en cada cámara. La muestra dializada se separó en dos porciones y una se dializó además en un vaso de precipitados que contiene soluciones de sacarosa al 10%, y la otra se dializó en un vaso de precipitados que contiene soluciones de sacarosa al 10% que contienen 1 mM de gluconato de calcio.

- Los tamaños de partículas continuaron después de la sonicación, y después de cada etapa de diálisis.
- Los termogramas de las formulaciones liposomales (+/- de gluconato de calcio) se compararon.
- La filtración durante la primera y la segunda etapa de diálisis se controló para las formulaciones liposomales.
- La estabilidad de las formulaciones de oxaliplatino liposomales se ensayaron en medios McCoy (24 horas, 37°C).

Resultados

Véase las figuras 10 a 22.

ES 2 393 170 T3

Análisis del tamaño de la partícula (tamaño dado en nm).

% de PG	Después de la sonicación	1º etapa de diálisis (-calcio)	2º etapa de diálisis (-calcio)	2º etapa de diálisis (+calcio)
15	100,2 ±1,6	98,5 ±1,5	102,8 ±1,5	94,8 ±1,4
25	97,4 ± 0,6	98,5 ± 0,5	112,6 ± 1,3	94,8 ± 0,5
35	105,7 ± 0,7	112,6 ±1,7	122,5 ± 0,8	103,5 ± 1,1
45	80,8 ± 0,9	87,7±0,5	98,3 ± 0,6	80,5 ± 0,8
55	82,5 ±0,5	89,0 ± 0,6	104,4 ±1,9	81,4 ±1,3

Análisis de Pt

1º etapa de diálisis (-calcio)				
% de PG	Externo (ppm)	DOE (%)	Total (ppm)	Relación recuento iónico (pt ¹⁹⁵ /p ³¹)
15	25,24	96,3	674,1	10,55
25	31,673	96,6	941,9	12,18
35	39,472	96,6	1178,1	14,54
45	54,115	94,2	927,4	11,07
55	43,60	95,1	898,0	10,93
2º etapa de diálisis (-calcio)				
% de PG	Externo (ppm)	DOE (%)	Total (ppm)	Relación recuento iónico (pt ¹⁹⁵ /p ³¹)
15	16,046	97,6	680	10,46
25	21,027	97,1	733	11,52
35	24,574	97,0	815	13,58
45	24,478	95,0	485	10,85
55	28,71	96,1	743	11,06
2º etapa de diálisis (+calcio)				
% de PG	Externo (ppm)	DOE (%)	Total (ppm)	Relación recuento iónico (pt ¹⁹⁵ /p ³¹)
15	9,919	98,0	495	8,49
25	14,137	97,3	517	7,18
35	11,258	98,1	599	7,91
45	18,464	94,3	324	4,45
55	17,036	94,0	285	4,09

5 Estabilidad en el medio celular McCoy

Sin calcio en solución de diálisis					
% de PG	Externo t=0 (ppm)	DOE t=0h (%)	Externo t=24 horas (ppm)	DOE t= 24h (%)	Total (ppm)
15	95,5	84,70	149,3	76,08	624,2
25	214,7	27,37	166,3	43,74	295,7
35	184,1	55,77	271,6	34,74	416,2
45	168,3	58,73	242,0	40,65	407,7
55	320,5	47,51	356,2	41,65	610,5
Con calcio en solución de diálisis					
% de PG	Externo t=0 (ppm)	DOE t=0h (%)	Externo t=24 horas (ppm)	DOE t= 24h (%)	Total (ppm)
15	2,8	99,44	13,2	97 ,36	498 ,8
25	2,5	99,35	12,1	96 ,80	37 7,2
35	6,4	98,07	13,4	95 ,94	33 0,9
45	9,8	96,33	46 ,7	82 ,58	26 8,0
55	19,3	90,73	23 ,0	88 ,95	20 7,6

Discusión

Se prepararon formulaciones sin calcio en el interior, y con o sin calcio en el exterior.

5 Se observaron tamaños de partículas para aumentar mediante el contenido de PG aumentado hasta un 45% de PG en soluciones que sólo contienen sacarosa (figura 10). Contrario a esto, al agregar 1 mM de gluconato de calcio en el exterior, se observaron que los tamaños de partículas disminuían (figura 11). se observe que la formulación que tiene el contenido más alto de PG tiene la variación más grande en los tamaños de las partículas en ausencia de Ca^{2+} (figuras 11 + 12).

10 Prácticamente no hay pérdida de oxaliplatino entre la primera y la segunda diálisis si la solución de diálisis es el 10% de sacarosa en ambas etapas de diálisis (basado en la relación de recuento iónico (Pt^{195}/P^{31})). En comparación con los niveles de Pt/P de la figura 14 para las formulaciones que contienen calcio se observa una disminución entre la primera y la segunda etapa de diálisis.

15 Si el calcio está presente durante la diálisis se observa una pérdida de oxaliplatino en comparación con la formulación dializada en la solución de sacarosa al 10%. Con el incremento del contenido de PG en la formulación se observa una disminución en el oxaliplatino.

Usualmente el DOE (%) es más alto para la formulación con contenido más bajo de PG cuando se dializa la misma cantidad de tiempo.

20 Al graficar el tamaño de la partícula y la concentración total de Pt (figura 17) parece haber una correlación. Con el incremento del tamaño de la partícula se observa un contenido de Pt más alto sin considerar la composición lipídica (contenido de DSPC y DSPG variable).

Los liposomas dializados en la solución que contiene gluconato de calcio son estables en el medio McCoy, mientras que la formulación dializada en sacarosa al 10% tuvo una mayor filtración de oxaliplatino cuando se expone al medio McCoy (figura 18).

25 El barrido de DSC de una formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma de 35% de PG mostró que no fue posible repetir el barrido de la formulación cuando no estaba presente el calcio (figura 19). Para cada nuevo barrido la temperatura de transición aumentó continuamente. Cuando el calcio estuvo presente en el exterior de la formulación, la temperatura de transición permaneció constante para cada nuevo barrido (figura 21). Además, con un contenido más alto de PG hubo un incremento en la temperatura de transición (figura 20).

La temperatura de transición para la formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma está en el intervalo de 60 a 70°C. Por lo tanto se recomienda que la temperatura de extrusión se mantenga a 70°C.

Ejemplo 9. Efecto del Ca²⁺ sobre la formulación de oxaliplatino liposomal; parte II

Objetivos:

- 5 Examinar el efecto de tener calcio tanto en el interior como en el exterior de varias formulaciones liposomales que contienen DSPC, DSPG y DSPE-PEG2000 en términos de tamaño de partícula, Pt total, DOE, y estabilidad. Seguir la posible interacción entre Ca²⁺ y oxaliplatino con las membranas, se condujo DSC sobre las diferentes formulaciones.

Protocolo:

- 10 Se prepararon cuatro formulaciones liposomales diferentes de oxaliplatino con gluconato de calcio en el interior. El contenido de DSPC y de DSPG varió en la formulación liposomal de la siguiente manera:

6. 70:25:5 % en moles de PC/PG/PE-PEG

7. 60:35:5 % en moles de PC/PG/PE-PEG

8. 50:45:5 % en moles de PC/PG/PE-PEG

- 15 9. 40:55:5 % en moles de PC/PG/PE-PEG

Se sonicaron 4 ml de oxaliplatino encapsulado en el liposoma (1 min/ml) a 75°C, seguido del enfriamiento para precipitar el exceso de oxaliplatino. El sobrenadante se transfirió a cámaras de diálisis (MWCO 3,500), y se dializó contra solución de sacarosa al 10% que contiene 1 mM de gluconato de calcio. Se colocaron 3ml en cada cámara. Después de 24 horas la cámara de diálisis se transfirió a un nuevo vaso de precipitados que contiene 10% de sacarosa y 1 mM de gluconato de calcio.

- 20
- El tamaño de la partícula continuó después de la sonicación, y después de cada etapa de diálisis.
 - Los termogramas de las formulaciones liposomales se compararon.
 - La filtración durante la primera y la segunda etapa de diálisis se controló para las formulaciones liposomales.
- 25
- La estabilidad de las formulaciones de oxaliplatino liposomales se ensayaron en medios McCoy (24 horas, 37°C).

Resultados

Véase las figuras 23 a 25.

Análisis del tamaño de la partícula (tamaño dado en nm).

% de PG	Después de la sonicación	1º etapa de diálisis (+calcio)	2º etapa de diálisis (+calcio)
25	102,8±1,18	95,5±0,81	96,2 ± 0,91
35	143,1±3,78	123,9±1,52	127,7 ±0,70
45	95,5±0,48	87,5±0,49	89,9 ± 0,75
55	93,9±0,99	93,9±0,50	99,9 ± 0,62

- 30 Análisis de Pt

1º diálisis				
% de PG	Externo (ppm)	DOE (%)	Total (ppm)	Relación recuento iónico (pt ¹⁹⁵ /p ³¹)
25	3,5002	91,6	418,549	11,05
35	3,2822	96,8	1010,823	13,95
(continuación)				

ES 2 393 170 T3

45	4,8387	88,6	423,221	6,40
55	4,957	84,6	322,473	6,19
2º diálisis				
% de PG	Externo (ppm)	DOE (%)	Total (ppm)	Relación recuento iónico (pt ¹⁹⁵ /p ³¹)
25	5,499	99,3	762,9	8,49
35	7,103	99,5	1346,8	13,84
45	8,057	98,5	526,62	6,36
55	16,29	97,2	579,596	5,98

Pt en dialisado

% de PG	1º diálisis (ppm)	2º diálisis (ppm)
25	34,63	0,45
35	30,2	0,46
45	37,6	0,64
55	39,1	0,9

Estabilidad del McCoy

% DSPG	Externo (ppm) t=0	DOE (%) t=0h	Externo t= 24 h (ppm)	DOE t= 24h (%)	Total (ppm)
25	16,02	98,4	13,02	97,1	442,1
35	8,39	99,1	16,70	98,4	1024,2
45	9,23	97,8	16,56	95,6	377,6
55	16,02	94,9	23,25	92,7	316,4

5 Conclusión general:

Las formulaciones se prepararon con calcio tanto en el interior como en el exterior.

Después de la primera etapa de diálisis los tamaños de las partículas de los liposomas disminuyeron para todas las formulaciones. A partir de la primera a la segunda etapa de diálisis se observó un incremento en el tamaño de la partícula. Aparentemente, no existe correlación entre la composición lipídica y los cambios en los tamaños de las partículas.

10 Para todas las formulaciones preparadas se observó una relación Pt/P más alta cuando se incluyó gluconato de calcio en el interior.

15 El barrido de DSC de una formulación de oxaliplatino encapsulado en el liposoma de DSPG al 35% mostró que la temperatura de transición permaneció constante para cada nuevo barrido (figura 24). Además, con el contenido más alto de PG parece haber un incremento en la temperatura de transición (figura 25).

Usualmente el DOE (%) es más alto para la formulación con contenido más bajo de DSPG cuando se dializa la misma cantidad de tiempo.

REIVINDICACIONES

1. Un liposoma que comprende
 - entre 25% y 45% (mol/mol) de un lípido aniónico,
 - menos del 10% de colesterol (mol/mol) y
 - un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste de agentes antitumorales de pequeñas molécula, antibióticos, antifúngicos, y agentes antiinflamatorios, donde el liposoma ha sido expuesto a un catión divalente a una concentración entre 0,1 mM y 1 mM.
2. El liposoma de la reivindicación 1 que comprende menos del 1% de colesterol (mol/mol).
3. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el lípido aniónico se selecciona de un grupo que consiste de fosfatidil inositol, fosfatidil serina, bisfosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidil alcohol, y (fosfatidil glicerol).
4. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el lípido aniónico es fosfatidilglicerol.
5. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende un polímero hidrófilo seleccionado del grupo que consiste de poli(etilenglicol), poli(N-acrilóilmorfolina), poli(vinilpirrolidona), poli(láctido), poli(glicólido), poli(2-metil-2-oxazolona), poli(vinil alcohol), hidroxipropilmetilcelulosa, poli(etilen óxido), quitosán poli(D-glucosamina), poli(aminoácido), poli(2-hidroxietilmetacrilato) y copolímeros de los mismos.
6. El liposoma de la reivindicación 5, en el cual el polímero es PEG con un peso molecular entre 100 Da y 10 kDa.
7. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en el cual el polímero es conjugado al grupo principal de fosfatidil etanolamina.
8. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones 7, en el cual la cantidad de polímero-lípido conjugado es entre 2,5% y 7,5% (mol/mol).
9. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además un fosfolípido no cargado seleccionado del grupo que consiste de fosfatidil colina y fosfatidiletanolamina.
10. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones precedentes que no comprende colesterol.
11. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual las cadenas alquilo de los lípidos son cadenas C18 saturadas.
12. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el agente terapéutico es un agente antitumoral de pequeñas moléculas seleccionado del grupo que consiste de derivados de antraciclina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, doxorubicin, paclitaxel, 5-fluoruracilo, exisulind, ácido cis-retinoico, suldinac sulfuro, metotrexato, bleomicina y vincristina.
13. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el agente terapéutico es oxaliplatino o cisplatino.
14. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el liposoma es una vesícula unilamelar grande.
15. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el liposoma tiene un diámetro entre 80 y 120 nm.
16. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual al menos uno de los lípidos en el liposoma es un sustrato para la sPLA₂.
17. El liposoma de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el catión divalente es Ca²⁺.
18. Una formulación liposomal que comprende los liposomas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y entre 0,1 mM y 1 mM de un catión divalente.
19. La formulación liposomal de la reivindicación 18, en la cual el catión divalente es Ca²⁺.
20. La formulación liposomal de cualquiera de las reivindicaciones 18-19, en la cual el Índice de Polidispersión es 0,20 o menor.

21. Un procedimiento para la preparación de una formulación liposomal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 que comprende las etapas de:
- a. preparar una mezcla lipídica disolviendo los lípidos seleccionados en un solvente orgánico.
 - b. hidratar el producto de la etapa a) con un solvente de hidratación acuoso para formar los liposomas
 - 5 c. eliminar el solvente orgánico del paso a) o bien antes de la adición del solvente de hidratación acuosa o después de la adición del solvente de hidratación acuosa.
22. El procedimiento de la reivindicación 21, en la cual el solvente orgánico se elimina antes de la adición del solvente de hidratación.
23. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 21-22 que comprende además una etapa de sonicar la formulación liposomal para producir los liposomas de un cierto tamaño.
- 10 24. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 21-23, en la cual el solvente de hidratación comprende un catión divalente a una concentración entre 0,1 mM y 1 mM.
25. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 21-24 que además comprende una etapa de cambiar la fase acuosa externa a otra fase acuosa externa que comprende un catión divalente a una concentración de 0,1 mM y 1 mM.
- 15 26. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 21-25, en el cual el catión divalente es Ca²⁺.

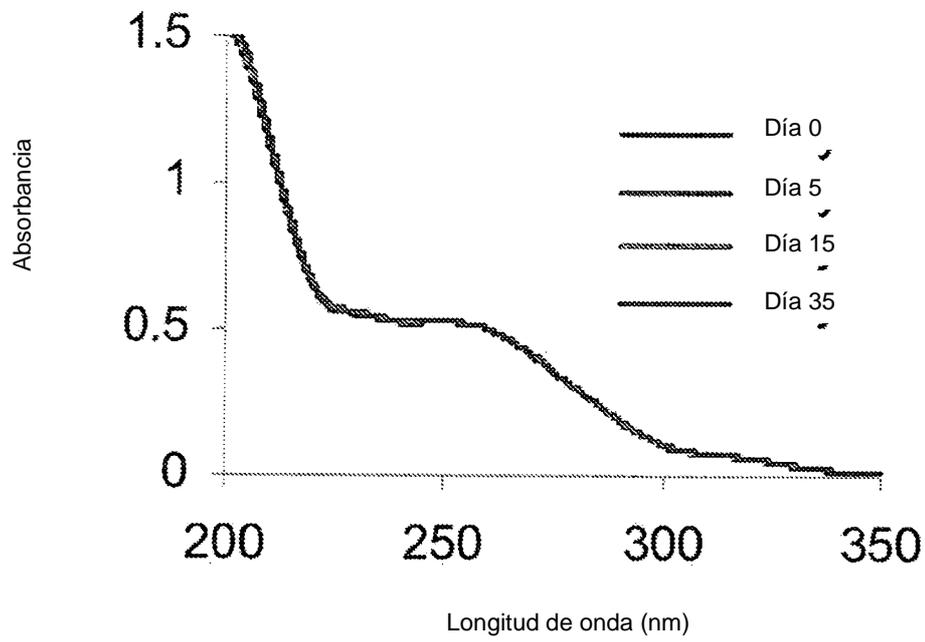


Figura 1

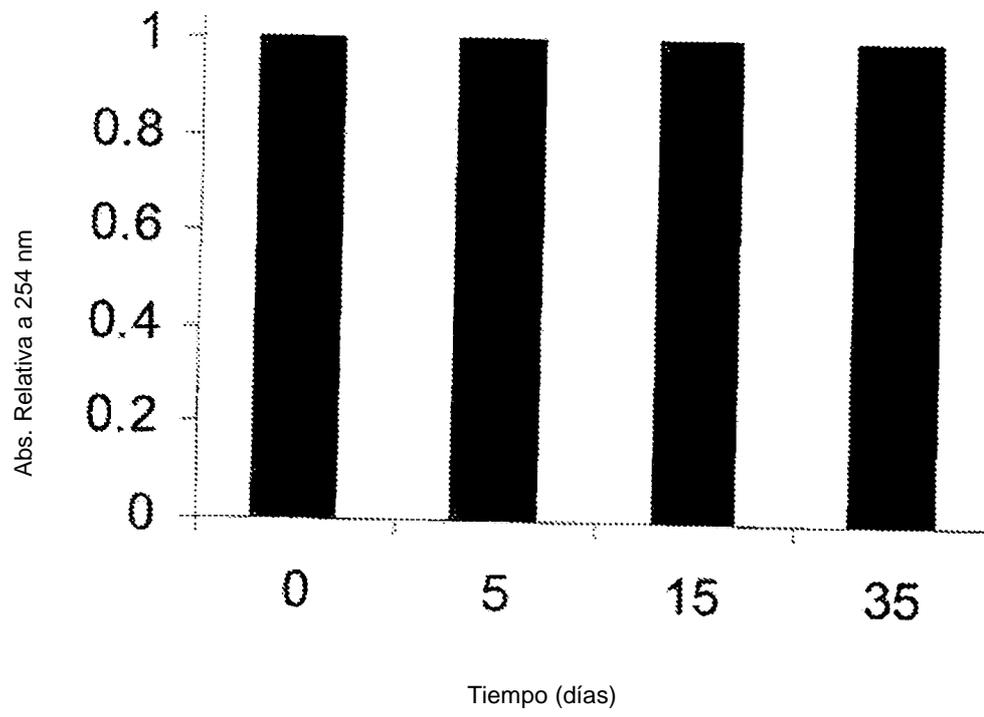


Figura 2

Figura 3A

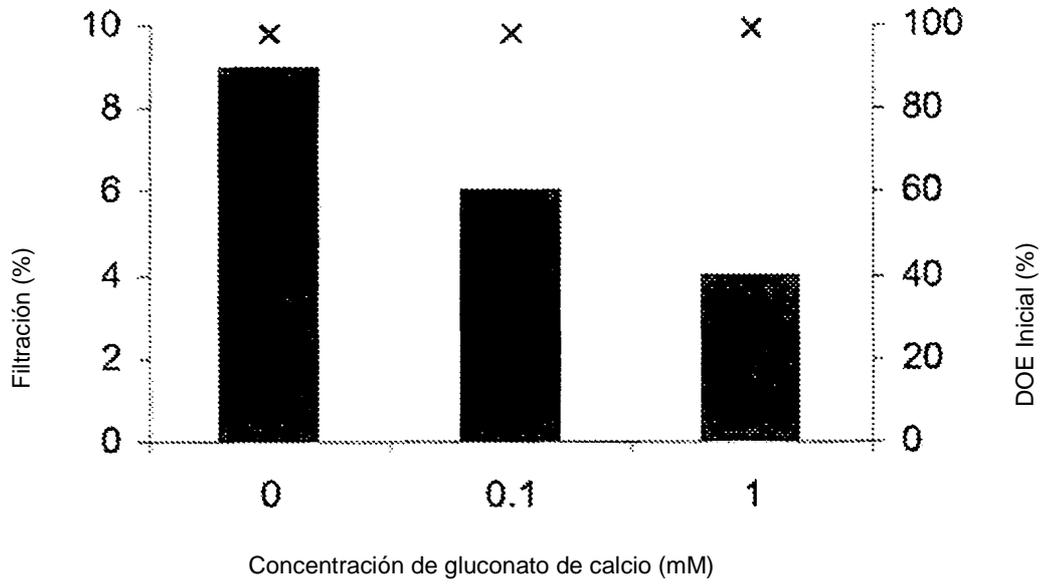


Figura 3B

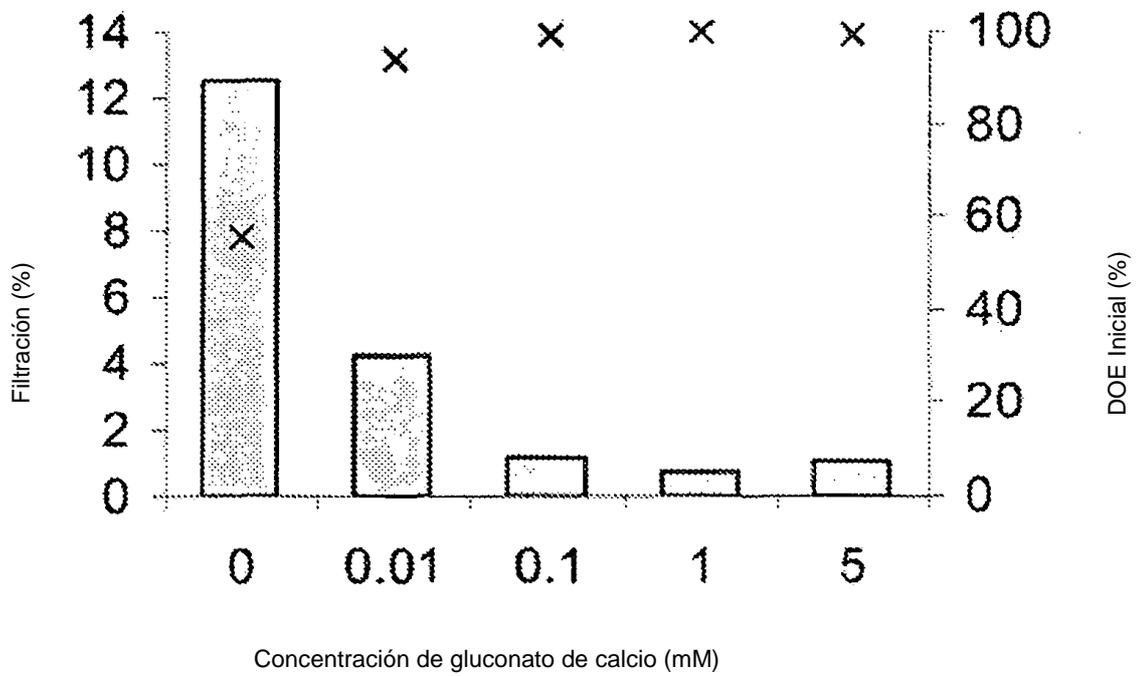


Figura 3

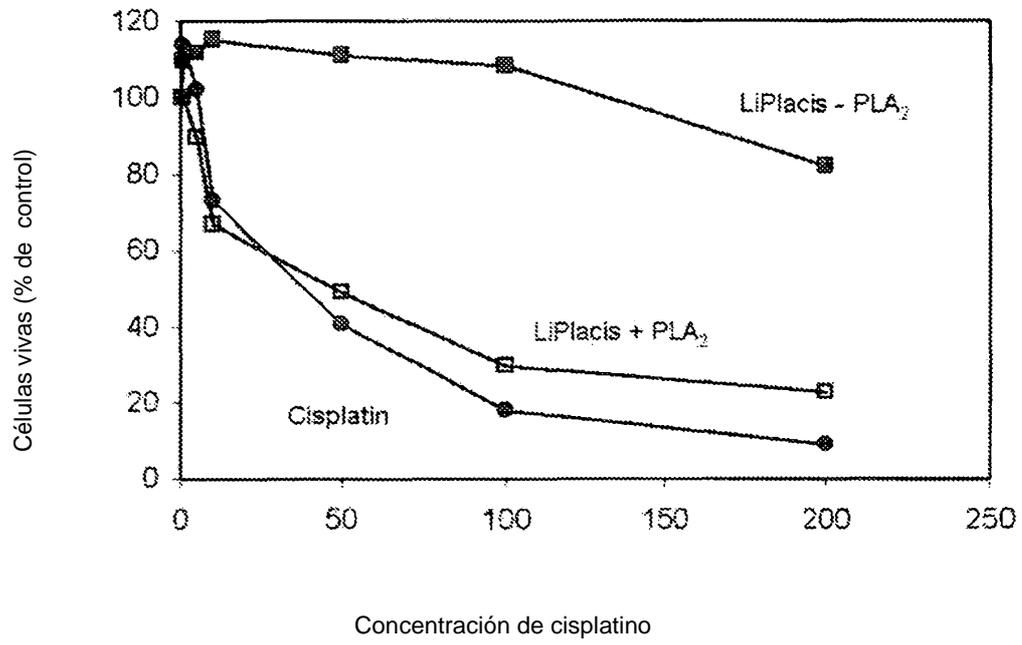


Figura 4

Figura 5A

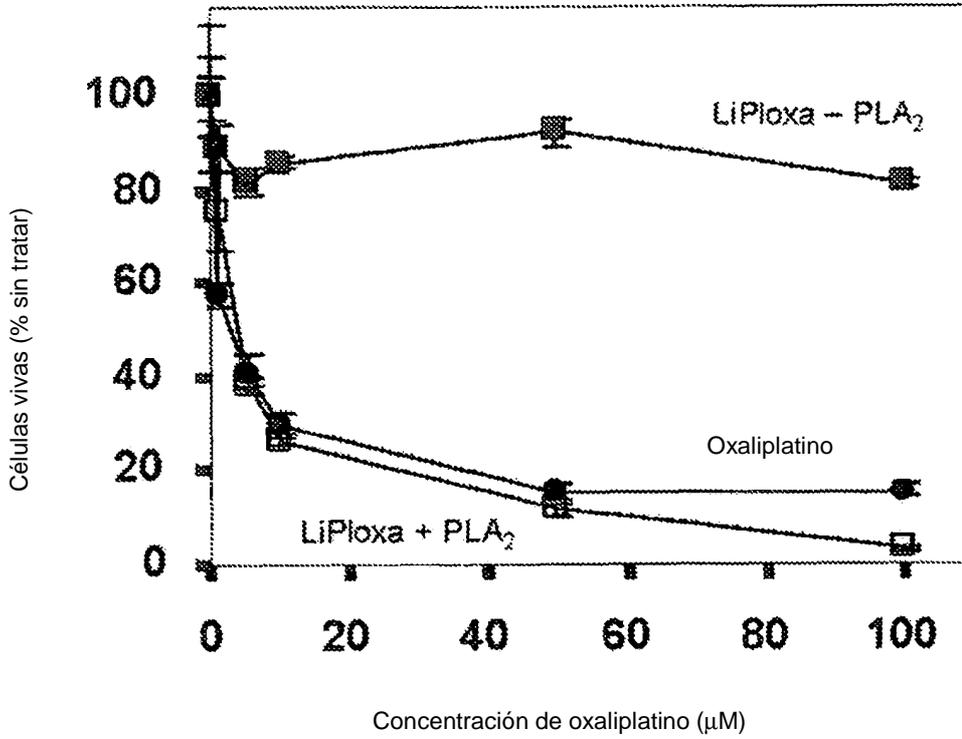


Figura 5B

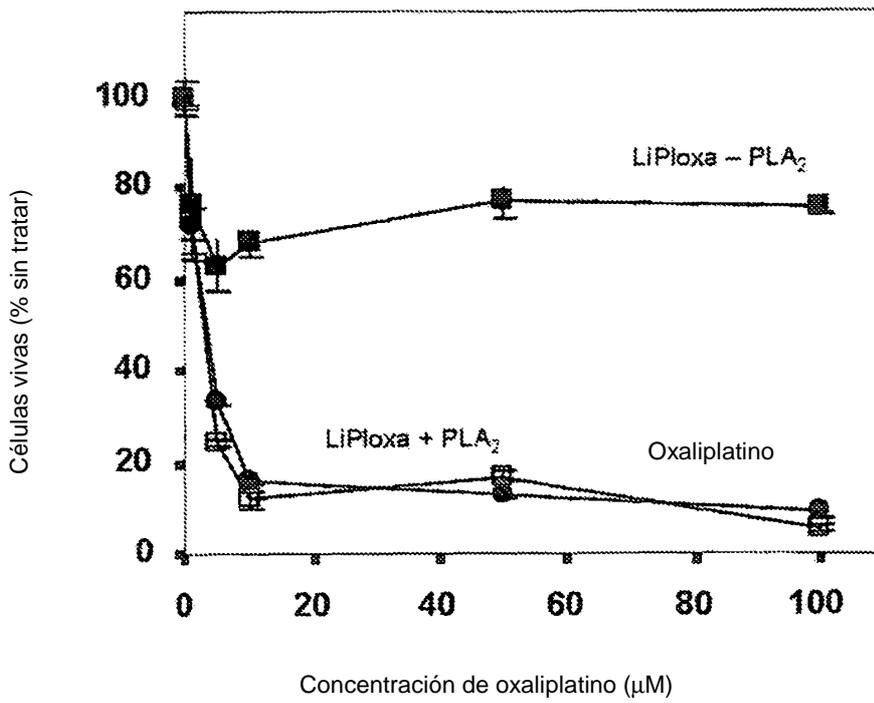


Figura 5

Figura 5C

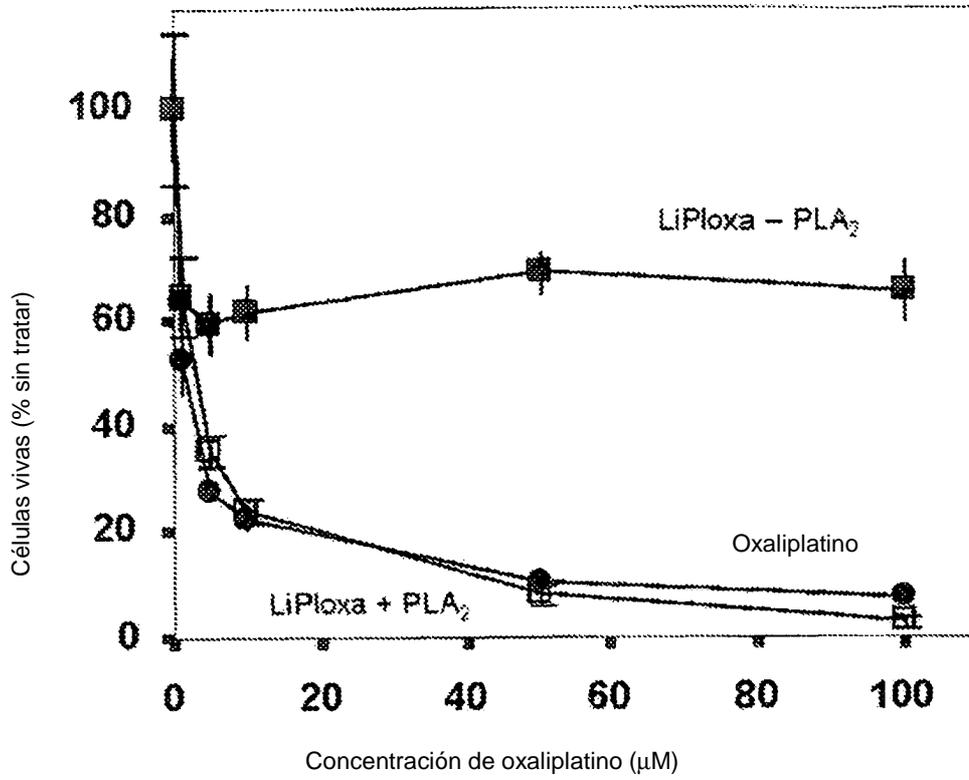


Figura 5D

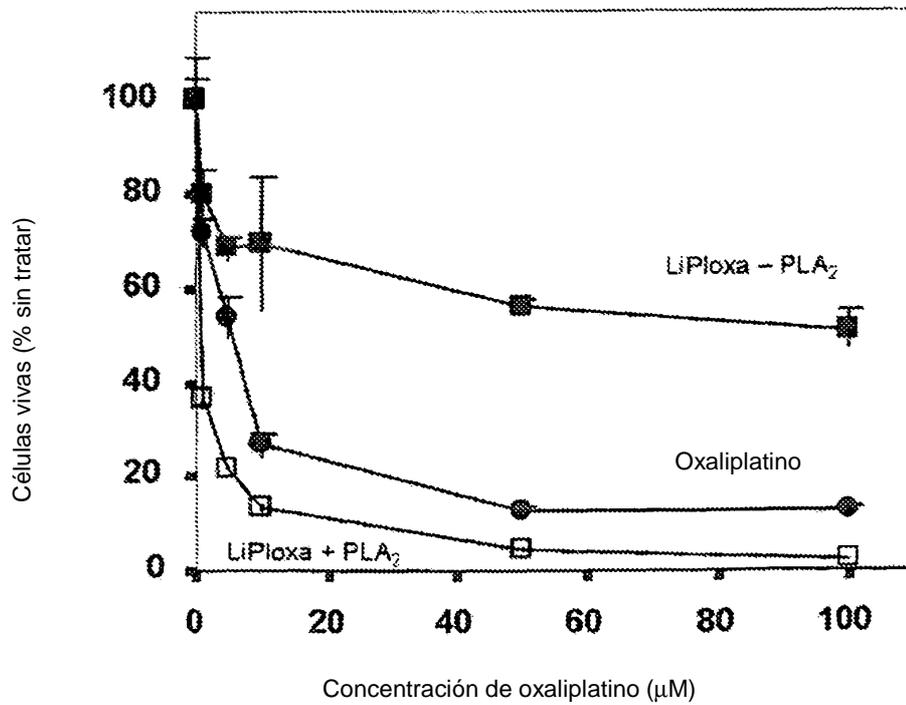


Figura 5

Figura 5E

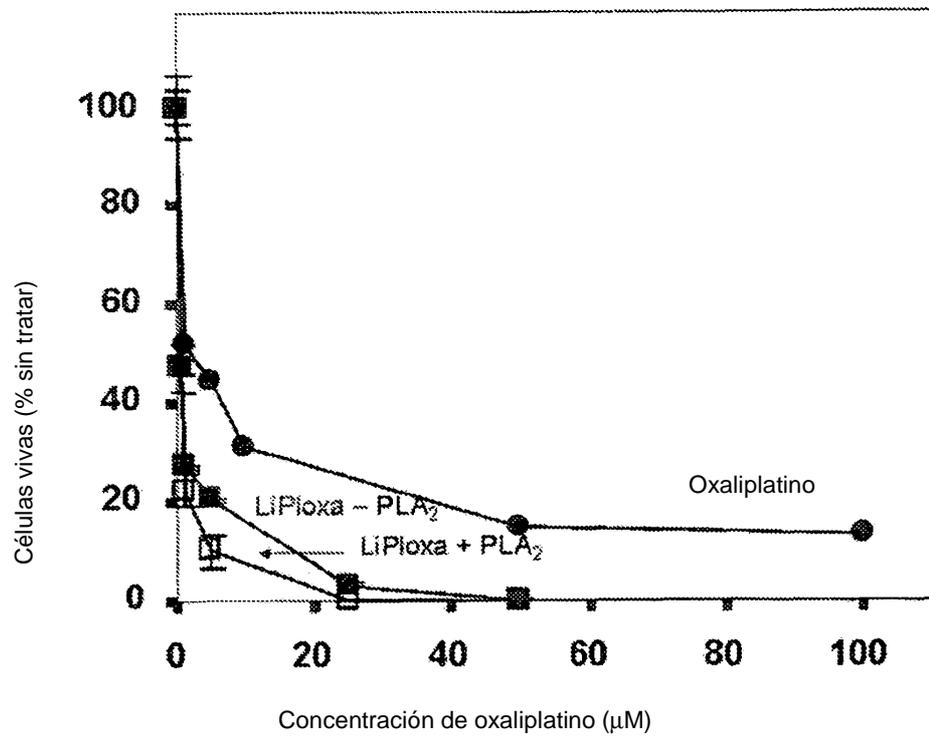


Figura 5

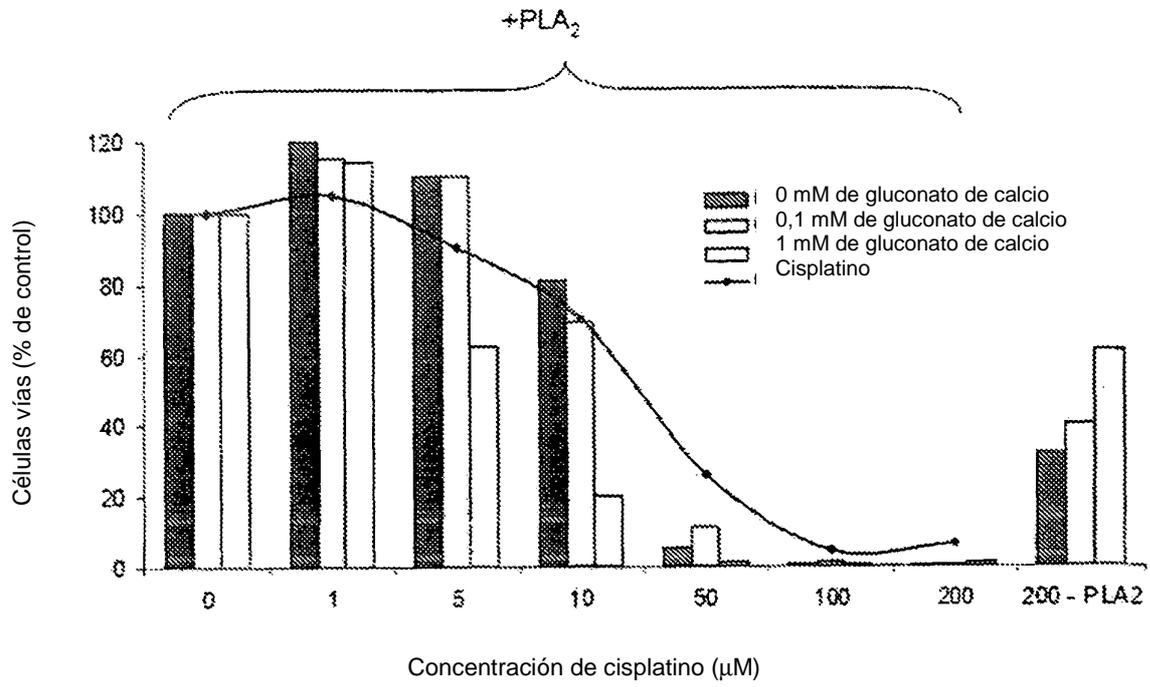


Figura 6

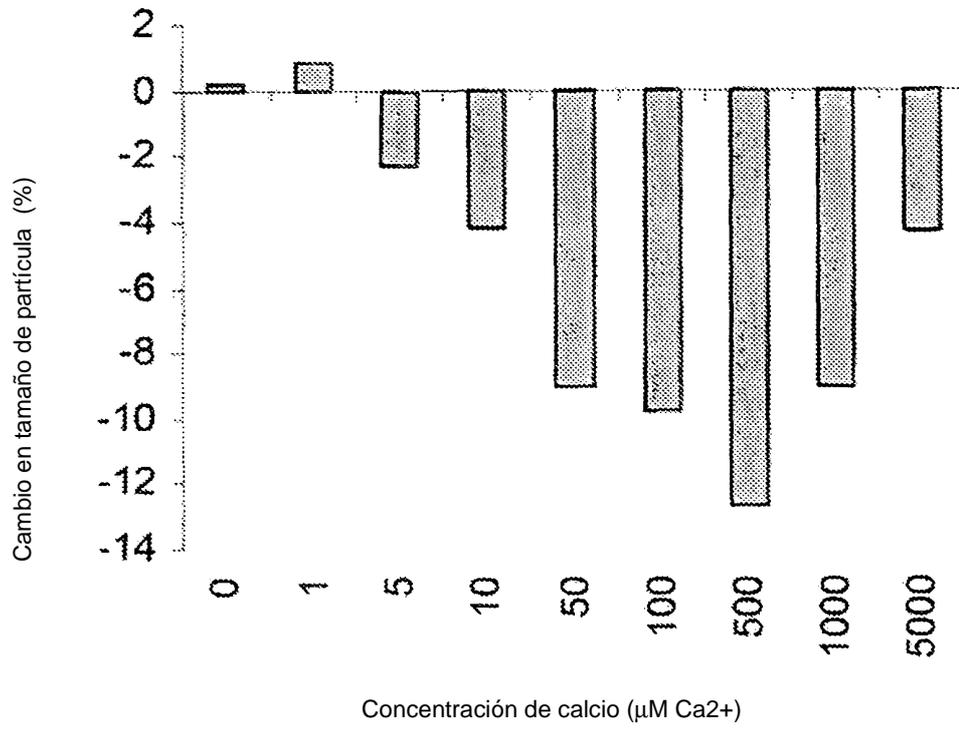


Figura 7

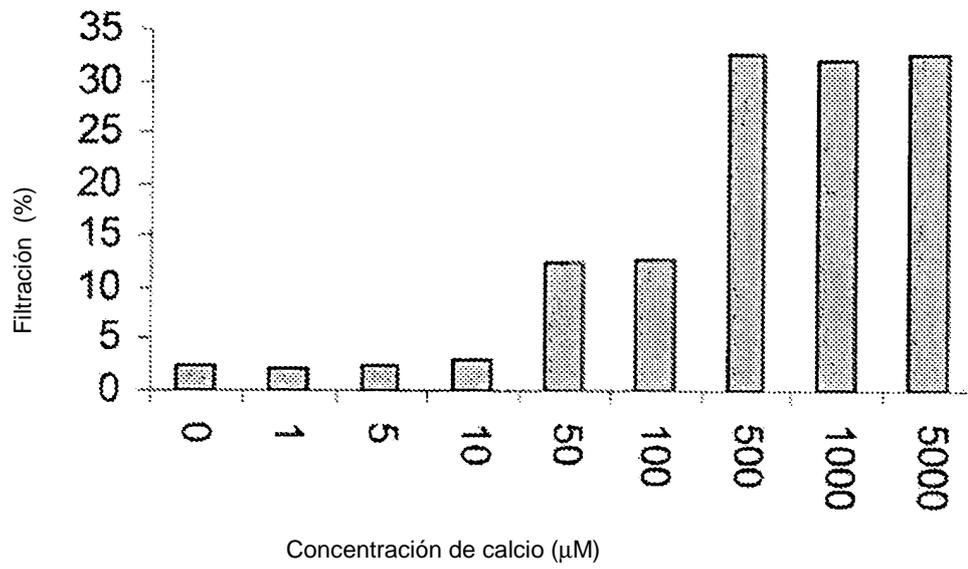


Figura 8

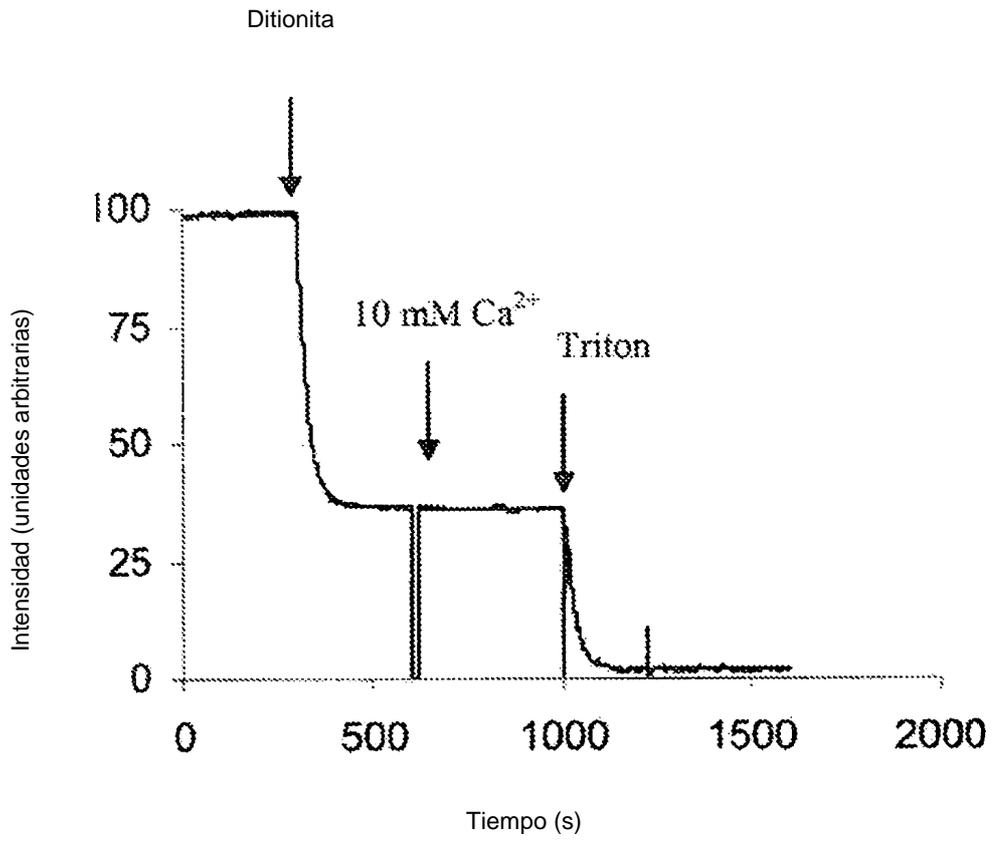


Figura 9

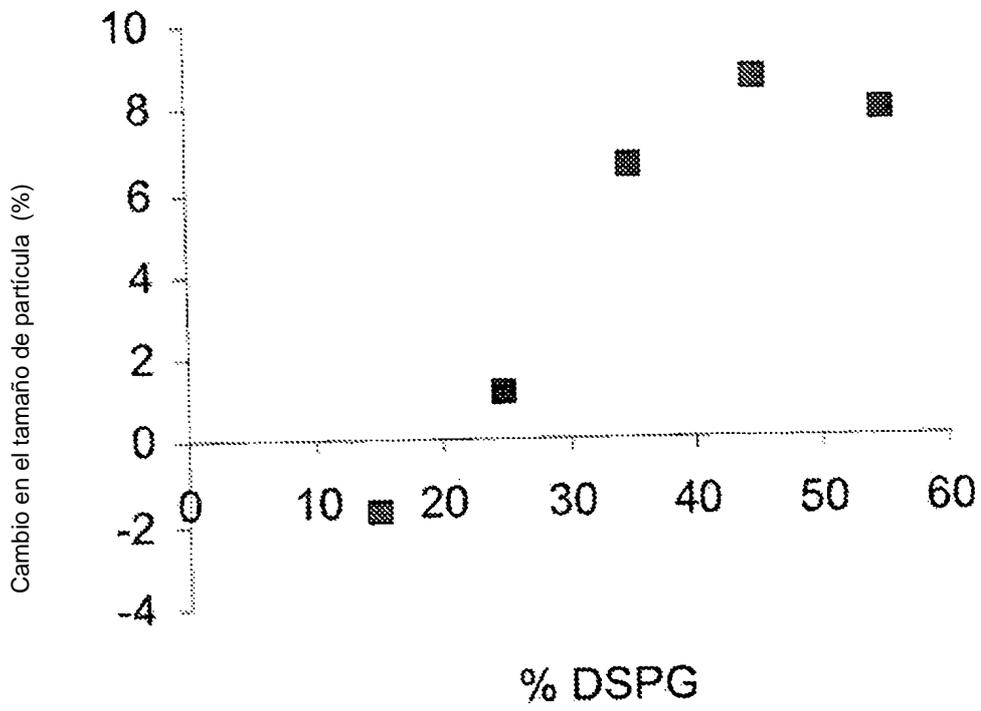


Figura 10

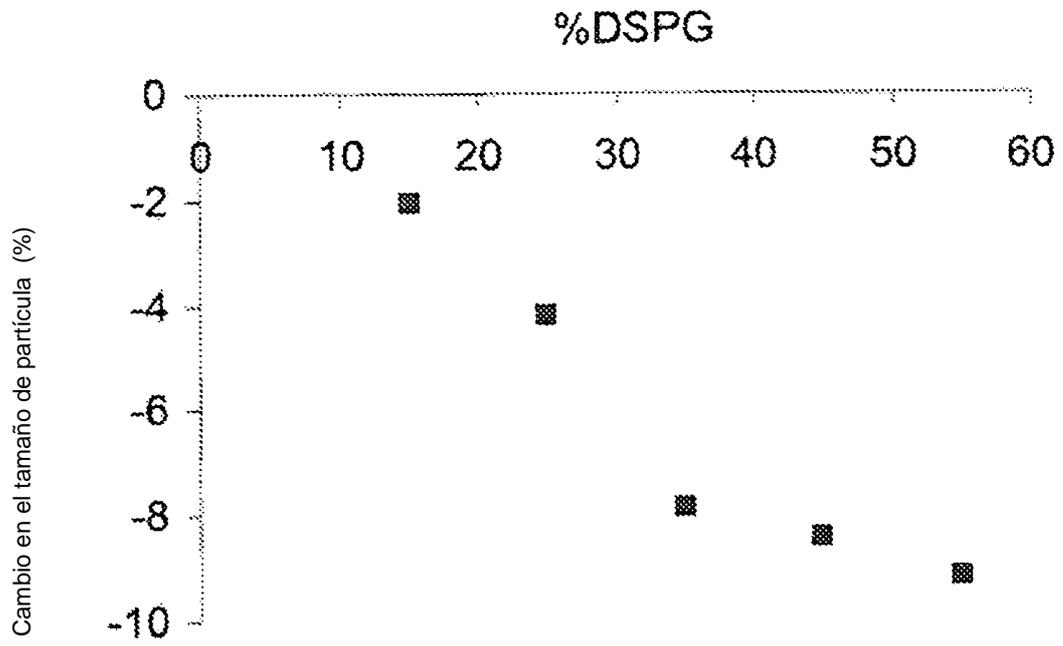


Figura 11

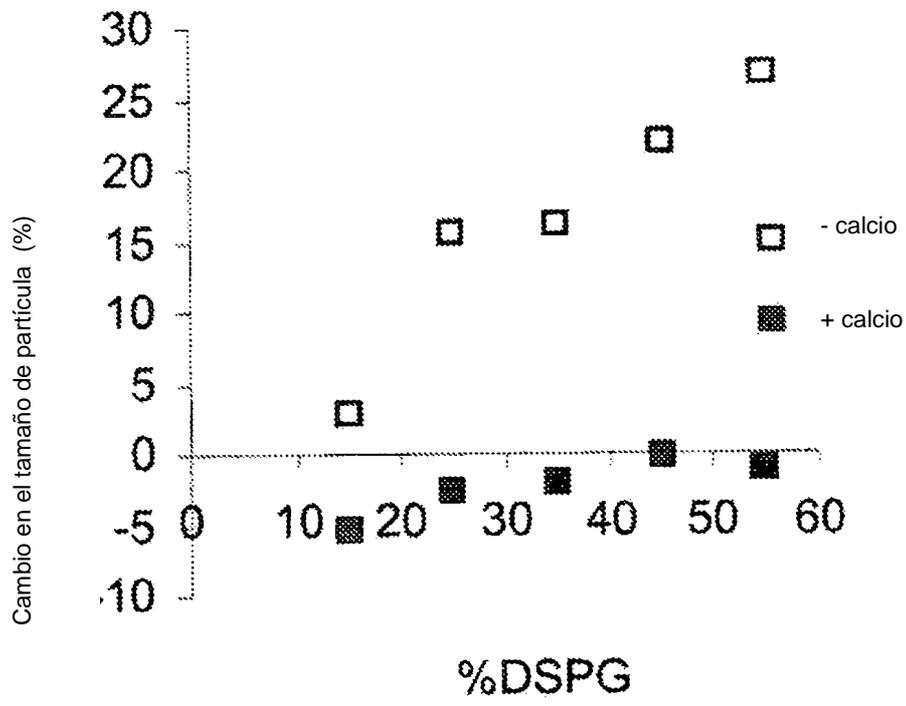


Figura 12

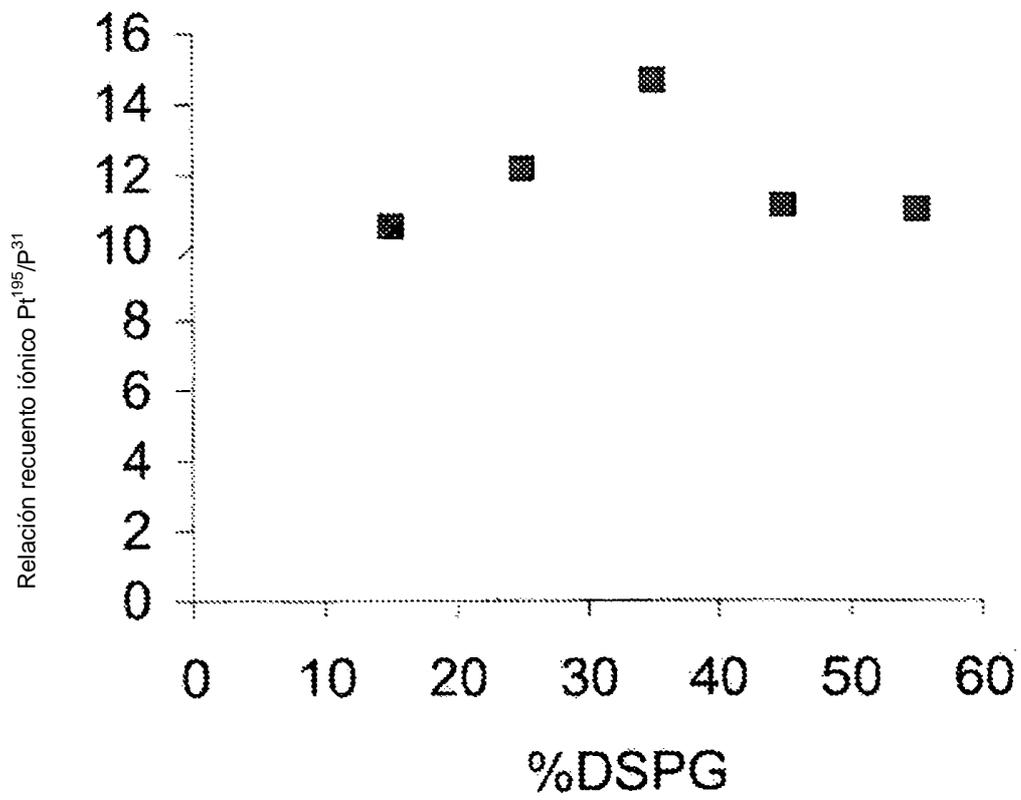


Figura 13

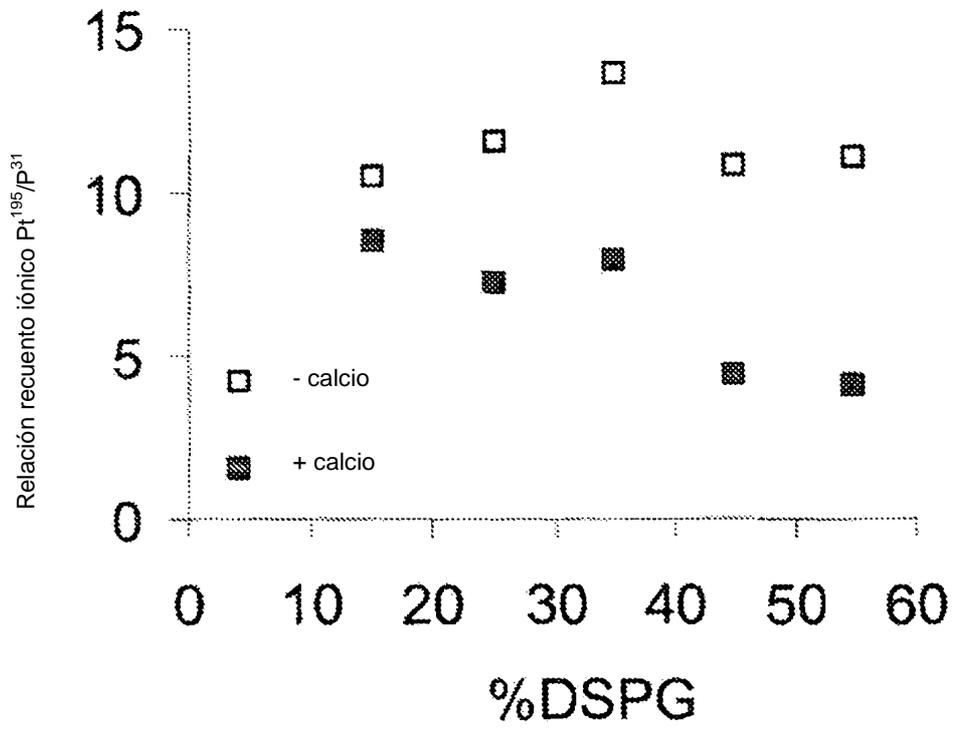


Figura 14

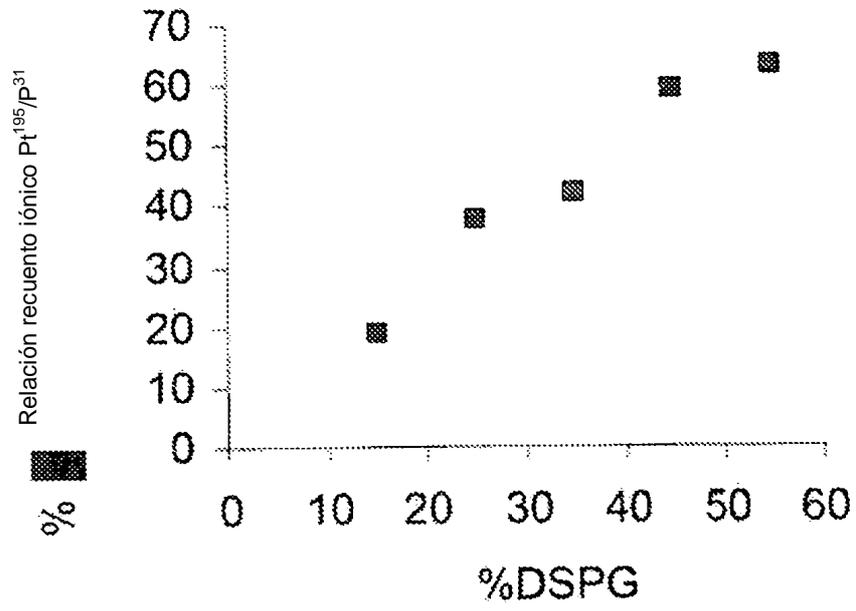


Figura 15

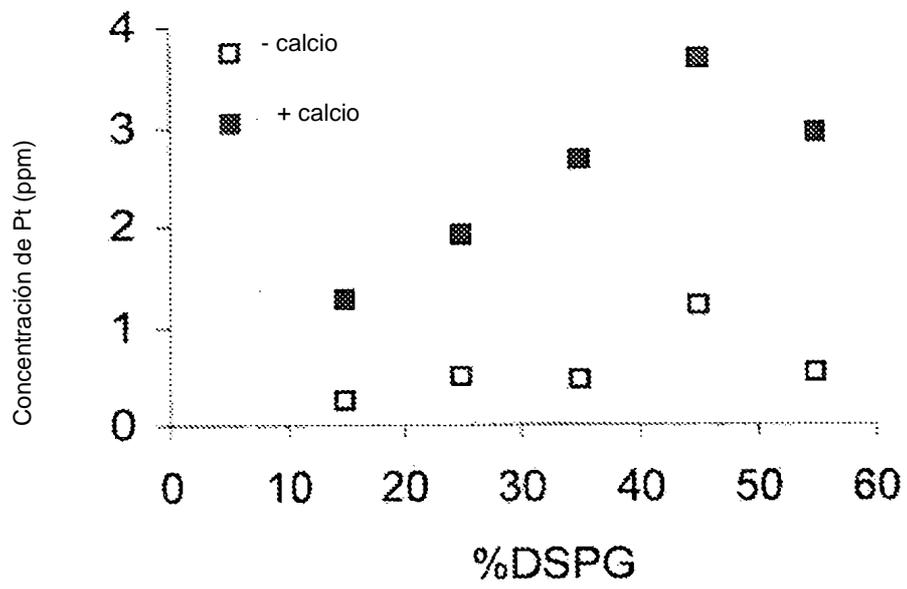


Figura 16

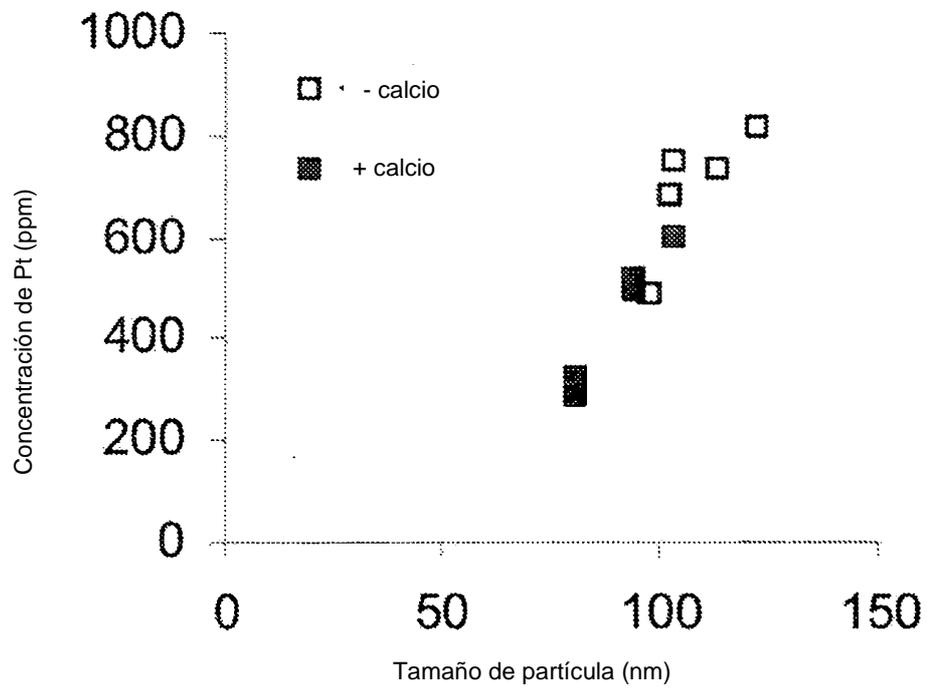


Figura 17

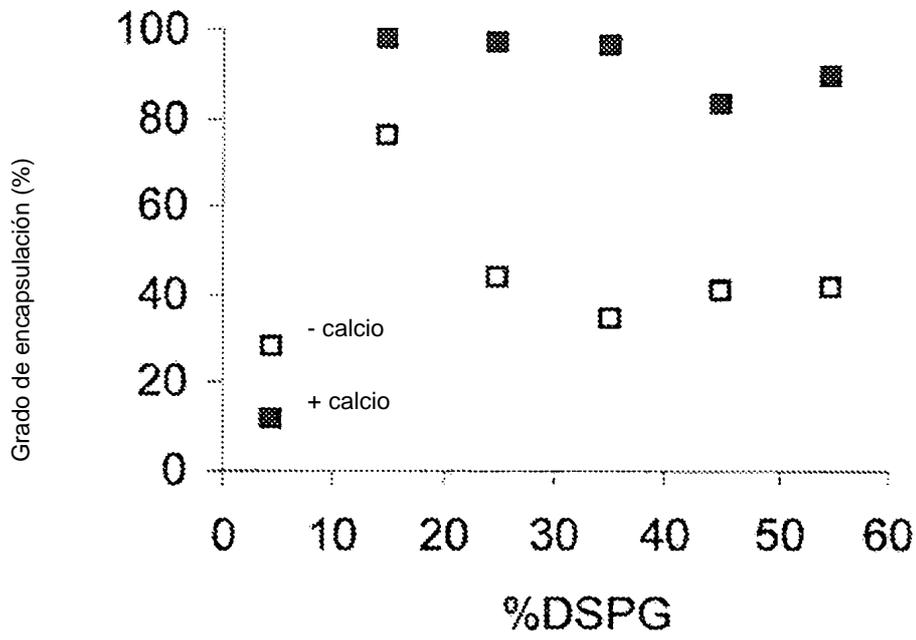


Figura 18

Calorimetría de barrido diferencial

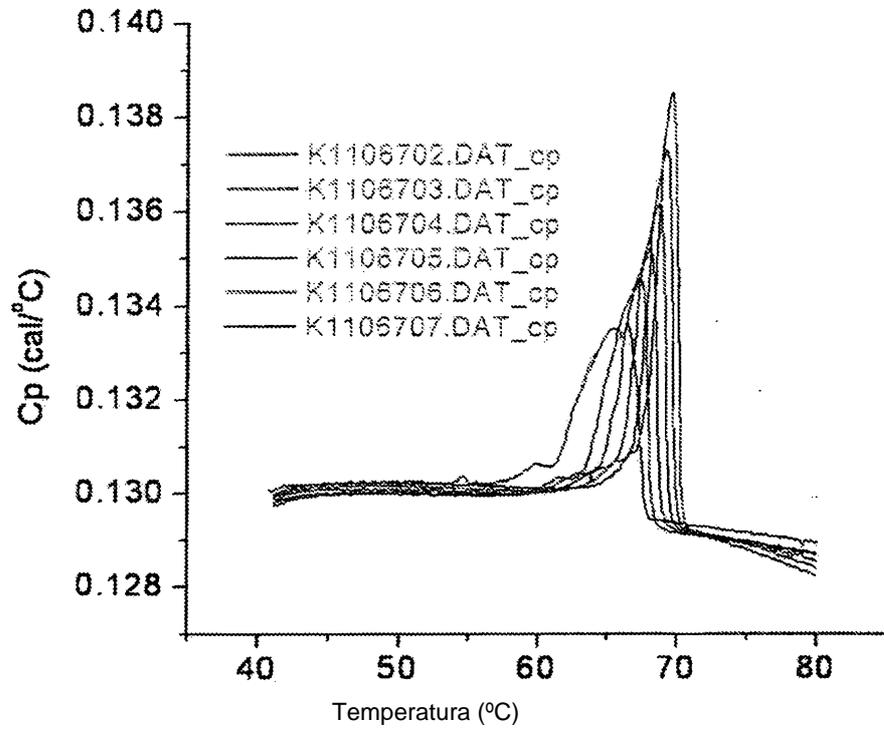


Figura 19

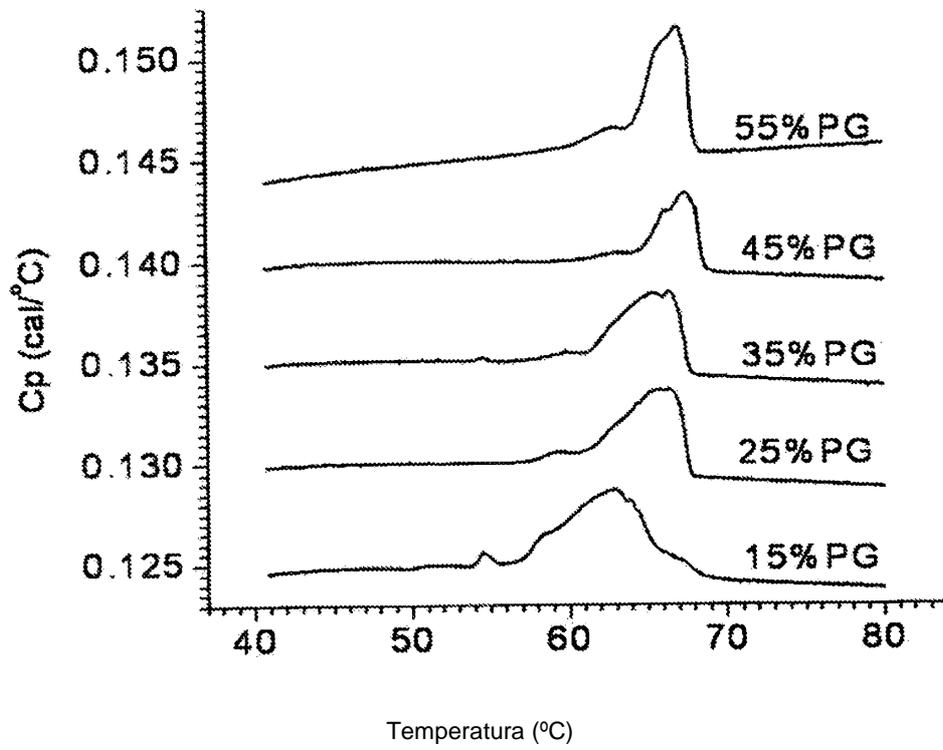


Figura 20

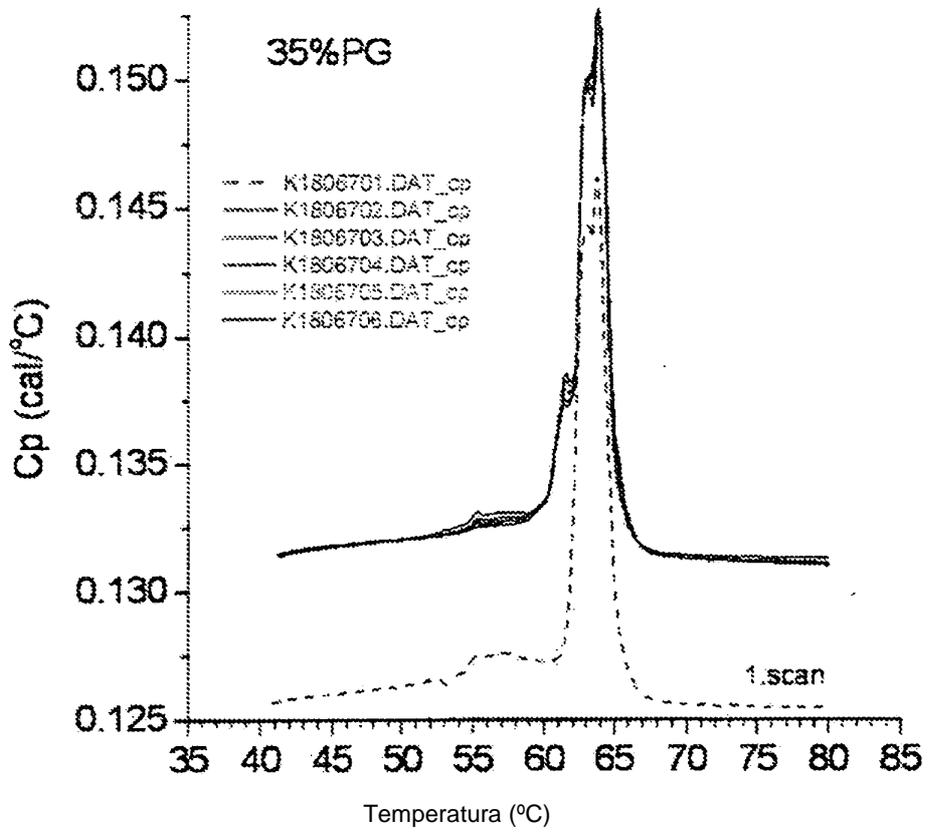


Figura 21

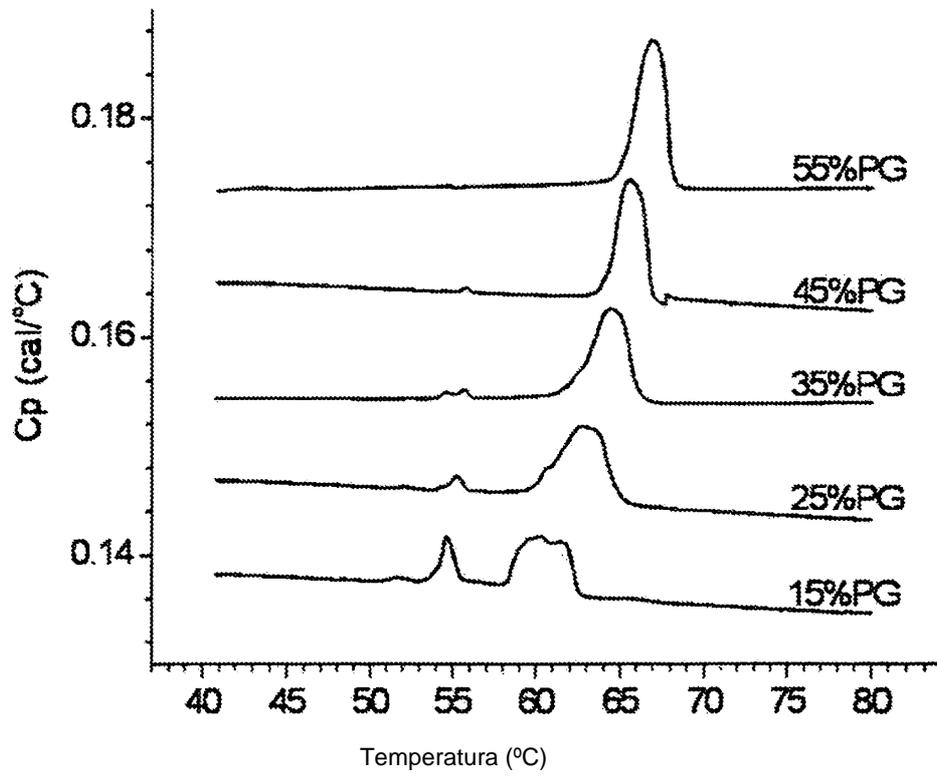


Figura 22

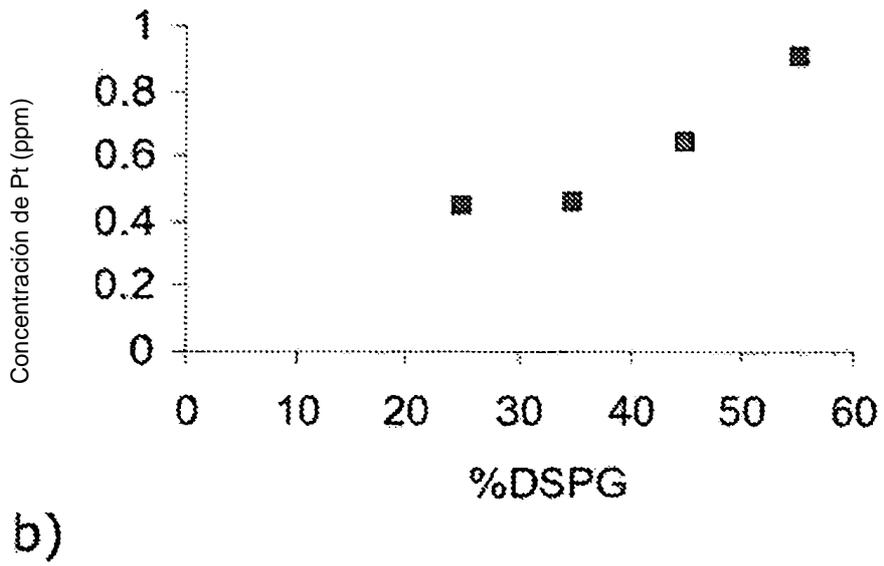
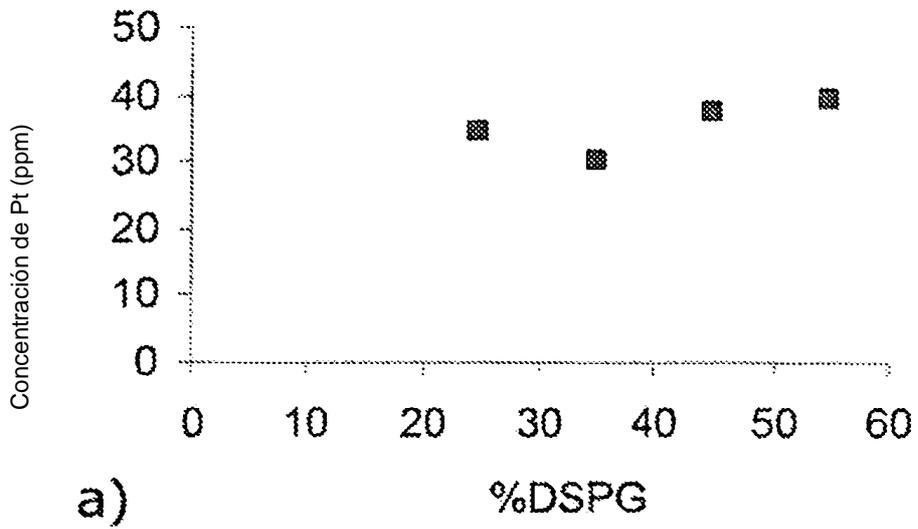


Figura 23

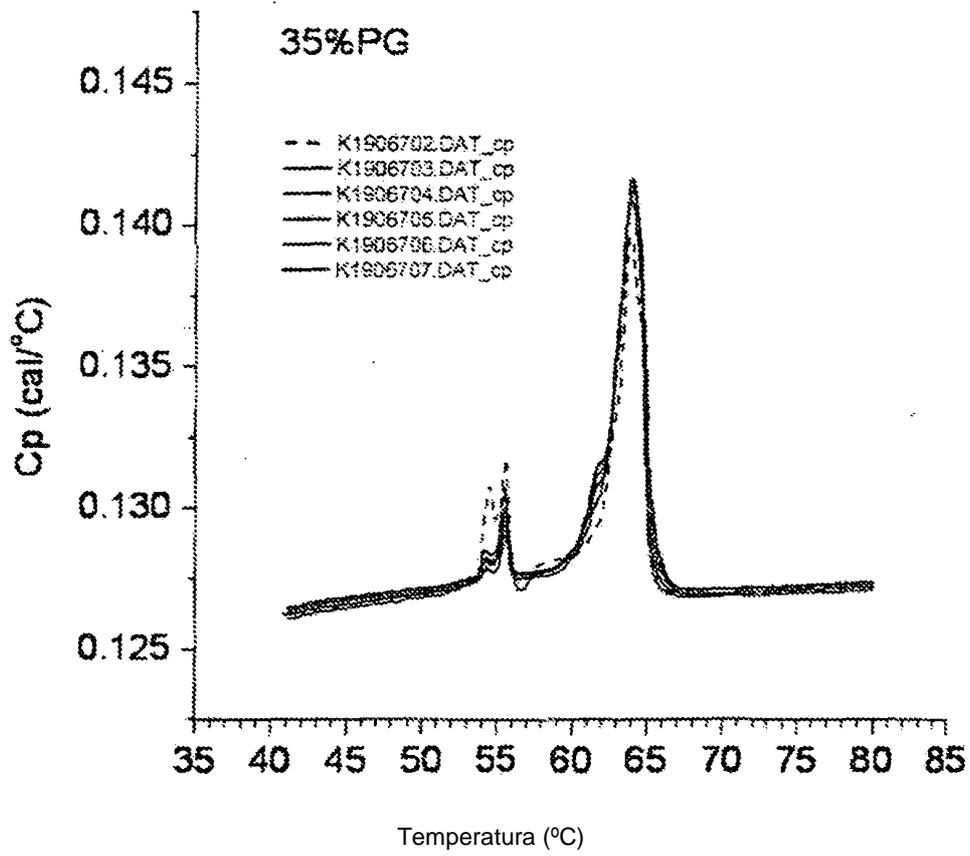


Figura 24

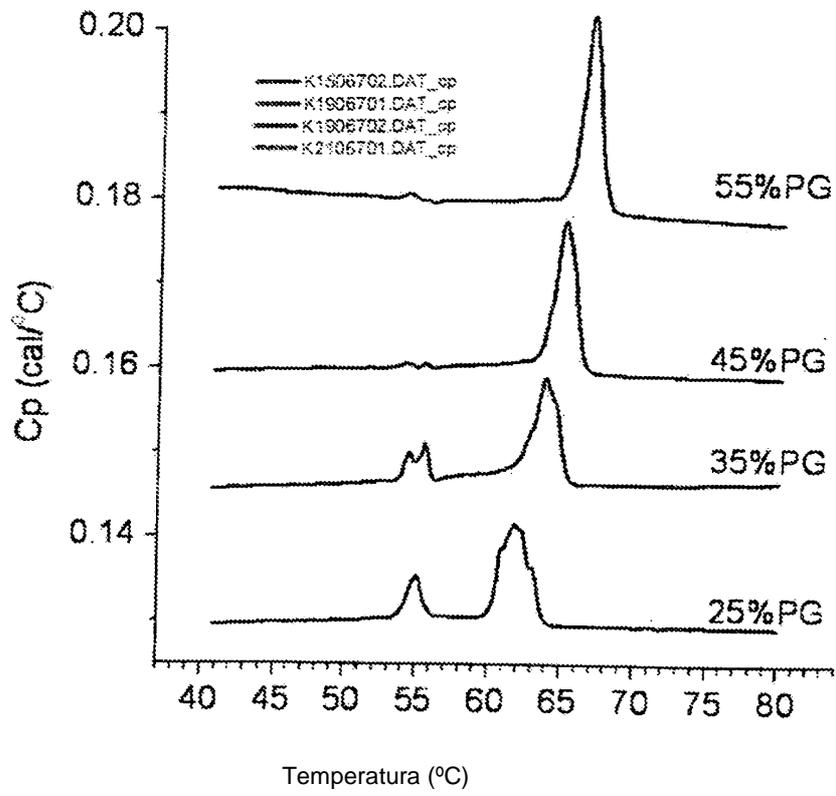


Figura 25