

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 526**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/136 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2007 E 07846229 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013 EP 2123260**

54 Título: **Formulación de liposomas de mitoxantrona y procedimiento para la preparación de los mismos**

30 Prioridad:

29.12.2006 CN 200610102339

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

22.04.2013

73 Titular/es:

**CSPC ZHONGQI PHARMACEUTICAL
TECHNOLOGY (SHIJIAZHUANG) CO., LTD.
(100.0%)
No. 226, Huanghe Street, Shijiazhuang
Hebei 050035 , CN**

72 Inventor/es:

**LI, CHUNLEI;
WANG, JINXU;
WANG, CAIXIA;
LI, YANHUI;
SHEN, DONGMIN;
GUO, WENMIN;
ZHANG, LI y
ZHANG, LAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 401 526 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

Formulación de liposomas de mitoxantrona y procedimiento para la preparación de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una preparación liposómica y a una preparación farmacéutica liposómica para encapsular fármacos, especialmente a una preparación farmacéutica liposómica de mitoxantrona. La presente invención también se refiere a procedimientos para fabricar el liposoma, la preparación farmacéutica liposómica y a usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

10 Los liposomas se pueden usar como vehículo para muchos fármacos, especialmente para fármacos antitumorales (en particular fármacos quimioterapéuticos). Los liposomas pueden reducir la distribución del fármaco en tejidos normales, pero aumentan la acumulación del fármaco en tejidos tumorales, de modo que mejoran el índice terapéutico del fármaco. La razón por la cual un liposoma puede dirigirse pasivamente a un tumor está relacionada con las propiedades fisiológicas del tejido tumoral. Los vasos sanguíneos tumorales pueden tener un tamaño de poro de hasta 100-780 nm debido a su rápido crecimiento, mientras que las células endoteliales vasculares tienen un espacio típico de aproximadamente 2 nm. Por tanto, los liposomas se pueden acumular de forma pasiva en la región del tumor si pueden circular en la sangre durante un periodo relativamente largo de tiempo y tienen un tamaño inferior a 200 nm, ya que una vez que los liposomas con un tamaño pequeño se administran mediante inyección intravenosa, no pueden entrar en los tejidos normales pero pueden penetrar en el vaso sanguíneo de una región tumoral y llegar al área de tratamiento.

20 No obstante, no es fácil conseguir las ventajas terapéuticas de los liposomas y se tienen que cumplir los cuatro requisitos siguientes: (1) el fármaco se puede encapsular en el liposoma con una buena eficiencia de encapsulación y una carga farmacológica suficiente; (2) el fármaco no se liberará del liposoma durante el periodo de almacenamiento *in vitro*; (3) no existe una pérdida considerable de fármaco durante la circulación en sangre del fármaco en el liposoma; y (4) el fármaco se puede liberar con eficacia y, por tanto, puede ejercer sus efectos terapéuticos cuando los liposomas se acumulan en la región tumoral. Con respecto a las actuales técnicas liposómicas, los tres primeros problemas se han solucionado bien, por lo que la liberación racional *in vivo* del fármaco en el liposoma requiere más atención. Un problema técnico crucial que se ha de resolver para desarrollar fármacos liposómicos es controlar de un modo eficaz la liberación racional de fármacos liposómicos después de dirigirlos a una región tumoral. Esto es especialmente importante para algunos fármacos, tales como mitoxantrona.

30 Un grupo de estudio de liposomas en Canadá descubrió que una formulación liposómica con un tamaño de aproximadamente 100 nm preparada usando fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) y colesterol como bicapa fosfolipídica y cargando el fármaco mediante un gradiente de ácido cítrico 300 mM no era tan buena como la mitoxantrona libre. Con el fin de mejorar el efecto terapéutico de los liposomas, el grupo cambió finalmente la composición de la bicapa de fosfolípidos a dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) y colesterol y obtuvo una preparación con mejores índices terapéuticos. No obstante, la pérdida de fármaco puede aumentar durante el periodo de almacenamiento porque la temperatura de transición de fase de la DMPC es de aproximadamente 21 °C, de modo que la preparación puede no ser estable (*Liposomal formulations of mitoxantone*, documento US 5.858.397).

40 Neopharm Corporation de EE.UU. usó otra técnica para desarrollar una formulación liposómica de mitoxantrona en la que a la bicapa de fosfolípidos se añadió una cardiolipina portadora de una carga negativa. Debido a la intensa interacción entre la cardiolipina y la mitoxantrona, la mitoxantrona podía insertarse en la bicapa de fosfolípidos mediante un modo de carga pasivo. Esta técnica de carga pasiva es diferente de la técnica de carga activa. En virtud de la técnica de carga activa, un fármaco se depositaría en la fase acuosa intraliposomal en forma de precipitación. En el estudio clínico de fase I sobre el producto de Neopharm se indicó que los fármacos liposómicos podían aumentar la posibilidad de infección ocasional en comparación con el fármaco libre. El desarrollo de este producto cesó en vista de la seguridad (*Liposomal preparations of mitoxantrone*, documento CN01817424.8).

50 El Pacific Institute of Materia Medica (Changchou, China) también presentó una solicitud de patente para una preparación liposómica de mitoxantrona (*A liposomal injection of mitoxantrone or mitoxantrone hydrochloride and the process for making the same*, documento CN200410041612.1). En esta solicitud se usó el procedimiento tradicional de gradiente por valor de pH para cargar los fármacos. Esta solicitud busca proteger una formulación con una proporción específica y no divulga los efectos de factores tales como la composición de los fosfolípidos, los tipos de sales tampón en la fase acuosa interna, el tamaño del liposoma, la proporción fármaco/liposoma etc. sobre la eficacia terapéutica y la toxicidad del liposoma.

55 Zhirong Zhang, y col. de la West China School of Pharmacy, Sichuan University, también estudiaron preparaciones liposómicas de mitoxantrona. Usaron fosfatidilcolina de soja con una temperatura de transición de fase de 0 °C (que se comercializa con el nombre EPIKURON 200) para preparar liposomas de aproximadamente 60 nm. En este artículo solo se estudió la farmacocinética, la toxicidad asociada y la eficacia terapéutica de la preparación liposómica obtenida. Los contenidos relevantes se pueden ver en "Preparation of long circulating mitoxantrone liposomes and its pharmacokinetics", Zhirong Zhang, Botao Yu y Yisong Duan, *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2002,

Vol. 37, Nº 6; Studies on preparation of long circulating mitoxantrone liposomes with transmembrane ammonium sulfate gradients, Zhirong Zhang, Botao Yu, Yisong Duan y Yuan Huang, Chinese Pharmaceutical Journal, 2002 Vol. 37, Nº 12; y Study on the preparation techniques of mitoxantrone liposomes, Yisong Duan, West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001 Vol. 16, Nº 02.

5 En los estudios anteriores, normalmente se controla el tamaño de los liposomas en el intervalo de 80 ~ 150 nm, ya que hay un consenso en el campo de los liposomas de que un liposoma con un tamaño de aproximadamente 100 nm tendría la mejor eficiencia en el objetivo (Pharmacol. Rev. 1999 51: 691-744.). No obstante, como se ha mencionado en lo que antecede, un liposoma no solo debe tener una eficiencia por el objetivo excelente sino que también debe tener una liberación suficiente desde el liposoma para ejercer su efecto.

10 Como se ha indicado anteriormente, de acuerdo con el campo anterior, debería evitarse esencialmente la pérdida de fármaco durante la circulación en sangre de modo que el fármaco se pueda transferir con eficacia a los tumores, pero este requisito también da lugar a una dificultad para liberar el fármaco desde el liposoma cuando es dirigido a la región tumoral. En procedimientos convencionales para fabricación de liposomas, normalmente un fármaco se encapsula mediante una técnica de carga activa en la que el fármaco encapsulado en el liposoma está presente en forma de un precipitado coloidal que no tiene bioactividad, de modo que solo cuando el fármaco se libera del liposoma con eficacia puede convertirse en un fármaco terapéutico con bioactividad. Si la velocidad de liberación del fármaco es demasiado baja, el fármaco apenas podrá ejercer sus acciones terapéuticas aunque haya sido dirigido con eficacia a la región tumoral, y su efecto terapéutico puede ser incluso inferior al de un fármaco sin encapsular.

20 Por tanto, existe una urgente necesidad en el campo de una preparación liposómica capaz de liberar un fármaco con una buena capacidad de ser dirigido y liberar el fármaco en los tejidos objetivo con eficacia, y de una correspondiente preparación farmacéutica liposómica.

Sumario de la invención

25 Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado, por casualidad, que la mitoxantrona que tiene una pluralidad de grupos disociables y una tendencia a formar un precipitado compacto con contraiones multivalentes podría procesarse para formar una pequeña preparación liposómica unilamelar con un índice terapéutico mejorado con eficacia, de modo que se podría resolver el problema técnico anterior.

30 Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un fármaco liposómico, en el que (1) el fármaco liposómico comprende mitoxantrona; (2) el liposoma del fármaco liposómico tiene un tamaño de 30-80 nm; (3) la bicapa del liposoma comprende un fosfolípidos con una temperatura de transición de fase (Tm) superior a la temperatura corporal, de modo que la temperatura de transición de fase del liposoma es mayor que la temperatura corporal, la del colesterol y la de un lípido modificado con polímero hidrófilo; y (4) la fase intraliposómica del liposoma comprende un contraion multivalente en la que el contraion multivalente es portador de dos o más cargas opuestas a la del ingrediente farmacológico activo, seleccionándose el contraion multivalente de un anión de ácido orgánico saturado o insaturado, un anión de ácido inorgánico o una forma iónica de un aminoácido, y en la que el ácido orgánico se selecciona de ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico y ácido maleico; el ácido inorgánico se selecciona del anión sulfato y el anión fosfato; el aminoácido se selecciona de cisteína.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar la preparación liposómica anterior, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes: (1) preparar un liposoma con un tamaño de 30-80 nm usando un fosfolípidos con una Tm superior a la temperatura corporal, a la del colesterol y a la de un lípido modificado con polímero hidrófilo; y (2) encapsular la mitoxantrona y la fase intraliposómica del liposoma comprende un contraion multivalente.

El fármaco liposómico de acuerdo con la presente invención puede ser para uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto que necesite el tratamiento.

45 Preferentemente, el sujeto es un mamífero, especialmente un ser humano.

Breve descripción de las figuras

50 La Fig. 1 es la farmacocinética in vivo de PLM60 en ratones Kunming y la comparación de la misma con la farmacocinética in vivo de la mitoxantrona libre, en la que PLM representa el liposoma de mitoxantrona PEGilada, FM representa la mitoxantrona libre, en el eje de abscisas se representa el tiempo (horas) y en el eje de ordenadas se representa el nivel en plasma de mitoxantrona (μg de mitoxantrona/ml de plasma).

La Fig. 2 es el perfil de PLM60 y FM tumores en ratones en el que PLM60 representa el liposoma de mitoxantrona PEGilada, FM representa la mitoxantrona libre, en el eje de abscisas se representa el tiempo (horas) y en el eje de ordenadas se representa la concentración de mitoxantrona en tejidos tumorales (μg de mitoxantrona/g de tejido tumoral).

55 La Fig. 3 es la comparación de la farmacocinética in vivo en ratones de diferentes formulaciones, en la que en el

eje de abscisas se representa el tiempo (horas) y en el eje de ordenadas se representa el nivel en plasma de mitoxantrona $\mu\text{gde mitoxantrona/ml de plasma}$) y las dosificaciones de diferentes formulaciones son todas 4 mg/kg.

Descripción de las realizaciones preferidas

5 Normalmente, los liposomas se forman con fosfolípidos y colesterol como materiales de membrana. Estos dos ingredientes no solo son los materiales básicos para formar una bicapa de liposoma sino que también tienen funciones fisiológicas muy importantes.

Las propiedades físicas de la membrana del liposoma están estrechamente relacionadas con la temperatura. Cuando la temperatura es elevada, las cadenas laterales de acilo de la bicapa lipídica cambian desde una matriz ordenada a una matriz desordenada. Este tipo de cambio puede tener como resultado muchos cambios de propiedades físicas de la membrana lipídica. Por ejemplo, el estado de "gel" puede cambiar a estado de "cristal líquido", la sección transversal de la membrana puede aumentar, el espesor de la bicapa puede disminuir, la fluidez de la membrana puede aumentar. La temperatura a la cual se producen estos cambios se denomina temperatura de transición de fase. La temperatura de transición de fase de la membrana lipídica se puede determinar mediante calorimetría diferencial de barrido, resonancia de espín del electrón (ESR) y similares. La temperatura de transición de fase de la membrana del liposoma depende de los tipos de fosfolípidos. En general, cuando más larga es la cadena lateral de acilo más alta es la temperatura de transición de fase, y viceversa. Por ejemplo, la temperatura de transición de fase de la dimiristoil fosfatidilcolina es 24 °C, mientras que la de la dipalmitoil fosfatidilcolina y la diestearoil fosfatidilcolina es de 41 °C y 58 °C, respectivamente. La fluidez de la membrana es una importante propiedad de los liposomas. A la temperatura de transición de fase la fluidez de la membrana aumentará y el fármaco encapsulado en el liposoma tiene la velocidad de liberación máxima. Por tanto, la fluidez de la membrana afecta directamente a la estabilidad del liposoma.

La presente invención proporciona una preparación de liposomas que tienen un tamaño de 30 – 80 nm y un fosfolípidos con una Tm superior a la temperatura corporal en la capa de fosfolípidos, de modo que la temperatura de transición de fase del liposoma es mayor que la temperatura corporal.

Preferentemente, la preparación farmacéutica liposómica de la presente invención se prepara usando fosfolípidos con una temperatura de transición de fase Tm relativamente alta, tales como fosfatidilcolina. Si la Tm de la fosfatidilcolina es superior a la temperatura corporal, la longitud de su cadena de hidrocarburos es, preferentemente, no inferior a 16 carbonos. Preferentemente, los fosfolípidos de la presente invención incluyen, entre otros, fosfatidilcolina de soja hidrogenada, fosfatidilcolina de clara de huevo hidrogenada, dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) o diestearoil fosfatidilcolina (DSPC) o cualquier combinación de los mismos.

En la preparación liposómica de la presente invención, los fosfolípidos con una Tm superior a la temperatura corporal en la bicapa de fosfolípidos representa aproximadamente 50 – 100 mol/% mol, preferentemente aproximadamente 55 – 95 mol/% mol, más preferentemente aproximadamente 60 – 90 mol/% mol respecto al contenido total de todos los fosfolípidos. Opcionalmente, la bicapa de fosfolípidos puede comprender fosfolípidos adicionales, por ejemplo fosfolípidos con una Tm no superior a la temperatura corporal, tal como dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) y similares. Dichos fosfolípidos pueden estar presentes en el liposoma en cualquier cantidad adecuada, siempre que no reduzca la temperatura de transición de fase de la preparación liposómica por debajo de la temperatura corporal. Los expertos en el campo pueden determinar la cantidad adecuada de acuerdo con técnicas convencionales.

La preparación liposómica de la presente invención comprende además colesterol. El colesterol tiene la función de regular la fluidez de la membrana. Cuando la membrana liposómica comprende un 50 % (mol/mol) de colesterol, la transición de fase de la membrana del liposoma puede desaparecer. Papahadjopoulos y col. denominan al colesterol "tampón de fluidez", porque la adición de colesterol a los fosfolípidos bajo la temperatura de transición de fase puede reducir la matriz ordenada de la membrana e incrementar la fluidez de la membrana, mientras que la adición del colesterol a los fosfolípidos por encima de la temperatura de transición de fase puede aumentar la matriz ordenada de la membrana y reducir la fluidez de la membrana. En la preparación liposómica de la presente invención, el contenido de colesterol puede ser de 2 - 60 mol/mol %, 5 - 55 mol/mol % o 10 - 50 mol/mol % respecto a la cantidad total de ingredientes del liposoma. Más específicamente, el contenido de colesterol puede ser de 15 - 45 mol/mol %, 20 - 40 mol/mol %, respecto a la cantidad total de ingredientes del liposoma. Los expertos en el campo pueden determinar fácilmente el contenido de colesterol en el liposoma de la presente invención de acuerdo con técnicas convencionales.

La bicapa de fosfolípidos en el liposoma de la presente invención también comprende excipientes adicionales para modificar adicionalmente las características de la superficie del liposoma para conferir mejores comportamientos in vivo al liposoma. Estos excipientes incluyen sustancias lipídicas modificadas con polímeros hidrófilos y los ejemplos de los mismos son diaestearoil fosfatidiletanolamina modificada con PEG (DSPE-PEG), diaestearoil fosfatidilglicerol modificado con PEG (DSPG-PEG), colesterol modificado con PEG (col-PEG), diaestearoil fosfatidiletanolamina modificada con polividona (DSPE-PVP), diaestearoil fosfatidilglicerol modificado con polividona (DSPG-PVP), colesterol modificado con polividona (col-PVP). Dichos excipientes también pueden ser materiales de membrana

5 modificados con un anticuerpo o ligando específico. Los expertos en el campo pueden determinar la cantidad de dichos excipientes en el liposoma de la presente invención de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo puede ser 0,1 - 20 mol/mol %, preferentemente 0,3 - 18 mol/mol %, más preferentemente 0,5 - 15 mol/mol %, especialmente 0,8 - 12 mol/mol %, por ejemplo 1 - 10 mol/mol %, o 2 - 8 mol/mol %, 2,5 - 7 mol/mol %, 3 - 6 mol/mol %, etc. respecto al número molar de fosfolípidos. En los casos de usar lípidos modificados con PEG como excipientes, el peso molecular del resto PEG puede ser, por ejemplo, 400 - 20000 Dalton, preferentemente 600 - 15000 Dalton, más preferentemente 800 - 10000 Dalton, especialmente 1000 - 8000 Dalton, por ejemplo 1200-5000 Dalton. Los expertos en el campo también pueden determinar fácilmente el uso de PEG en la presente invención de acuerdo con técnicas convencionales.

10 La preparación liposómica de la presente invención es una pequeña preparación liposómica unilamelar y deberá tener un tamaño adecuado. El tamaño de la preparación es de 30 – 80 nm, preferentemente de 35 – 70 nm, más preferentemente de 40 – 60 nm. El tamaño del liposoma se puede determinar mediante un analizador de tamaño de partículas o con microscopia electrónica u otros medios. Debe entenderse que las partículas de liposoma en la presente invención no pueden tener un tamaño completamente uniforme, sino que están en un abanico de tamaños, debido a la naturaleza del propio liposoma y a las propiedades del procedimiento de fabricación. Por tanto, en la preparación liposómica de la presente invención, es posible que no se excluya la presencia de partículas de liposoma fuera del intervalo de tamaños indicado, siempre que no afecten de forma evidente a las características de la preparación liposómica o la preparación farmacéutica de la presente invención.

15 El liposoma en la presente invención se puede preparar mediante varios procedimientos adecuados, incluidos, por ejemplo, el procedimiento de dispersión pelicular, procedimiento de inyección, procedimiento de dispersión ultrasónica, procedimiento de liofilización, procedimiento de congelación-descongelación y similares. De acuerdo con los sistemas de partida usados para preparar los liposomas, los procedimientos se pueden dividir en: (1) procedimientos basados en la membrana lipídica seca, polvo de lípidos; (2) procedimientos basados en agentes emulsionantes; (3) procedimientos de preparación de liposomas basados en micelas mixtas; y (4) procedimientos de preparación de liposomas basados en una mezcla de fase triple de etanol, fosfolípidos y agua. La encapsulación del fármaco se puede implementar mediante el modo de carga pasiva o el modo de carga activa. Estos procedimientos se pueden encontrar en muchos artículos de revisión sobre liposomas.

20 Durante o después de la preparación de la preparación liposómica se pueden usar muchos procedimientos adecuados para encapsular un fármaco en un liposoma y formar una preparación farmacéutica liposómica. Procedimientos adecuados incluyen, por ejemplo, procedimientos de carga activa y procedimientos de carga pasiva. El procedimiento de carga activa normalmente se realiza mediante procedimientos de gradiente, por ejemplo un procedimiento de gradiente en sulfato amónico, es decir usando una solución de sulfato amónico como fase acuosa para preparar primero un liposoma que comprende sulfato amónico en fase tanto intraliposómica como extraliposómica, formar después un gradiente de concentraciones de sulfato amónico entre la fase intraliposómica y extraliposómica eliminando el sulfato amónico extraliposómico. El NH_4^+ intraliposómico se disocia en NH_3 y H^+ , que conduce a una diferencia de concentraciones de H^+ (es decir, un gradiente de pH) entre la fase intraliposómica y la extraliposómica, de modo que una vez que un fármaco extraliposómico en estado molecular entra en la fase acuosa intraliposómica cambia al estado iónico, de modo que el fármaco no puede volver a la fase acuosa extraliposómica y el liposoma tiene menos pérdida de fármaco y es más estable. El procedimiento de carga pasiva puede realizarse mediante el procedimiento de inyección del disolvente orgánico, el procedimiento de dispersión pelicular, el procedimiento de congelación-descongelación y similares.

30 La expresión "fármaco iónico multivalente" quiere decir un fármaco que tiene dos o más grupos disociables con una constante de disociación pK_a de $4,5 \approx 9,5$, de modo que el fármaco tiene más cargas positivas o más cargas negativas en los intervalos de pK_a . Los expertos en el campo pueden determinar fácilmente el valor de la pK_a de cada grupo disociable del fármaco iónico de acuerdo con técnicas convencionales.

35 En la presente invención, el fármaco iónico multivalente es mitoxantrona. Más preferentemente, la mitoxantrona puede combinarse, opcionalmente, con al menos uno de los fármacos adicionales que pueden ser, por ejemplo, un fármaco antitumoral, tal como vincristina, vinorelbina o vinblastina, y similares.

40 Cabe destacar que los fármacos liposómicos de la presente invención pueden también comprender opcionalmente uno o más fármacos iónicos no multivalentes de mitoxantrona adicional, además del fármaco iónico multivalente mitoxantrona que se puede administrar en combinación con mitoxantrona como se ha mencionado anteriormente. La administración en combinación comprende la administración con todos los componentes en una preparación, también comprende la administración combinatoria en formas de dosificación unitaria distintas.

45 La preparación farmacéutica liposómica de la presente invención comprende además un contraion multivalente con cargas opuestas a las del ingrediente activo. Ejemplos de contraiones multivalentes incluyen, entre otros, aniones de ácido orgánico, tales como aniones ácidos de los siguientes ácidos orgánicos saturados o insaturados: ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico y ácido maleico, y similares, aniones de ácido inorgánico, tales como el anión sulfato, el anión fosfato y similares. Entre ellos se prefieren el anión citrato, el anión sulfato o el anión fosfato. Además, dichos contraiones multivalentes también pueden ser aminoácidos, tales como cistina y similares. Sin desear quedar ligada a teoría alguna, se supone que el

contraion multivalente es capaz de formar un precipitado insoluble con el fármaco de interés (fármaco iónico multivalente mitoxantrona) encapsulado en el liposoma, de modo que se estabiliza la existencia del fármaco iónico multivalente mitoxantrona en el liposoma.

5 La preparación farmacéutica liposómica puede además comprender opcionalmente excipientes y vehículos adicionales conocidos habitualmente en el campo farmacéutico, tales como sacarosa, histidina, antioxidantes, estabilizantes, dispersantes, conservantes, diluyentes, agentes tampón, disolventes, sales para alterar la presión osmótica y similares.

10 Un procedimiento para preparar la preparación farmacéutica liposómica comprende: en primer lugar la preparación liposómica de la presente invención como se ha mencionado en lo que antecede y, después, incubar un fármaco de interés con la preparación liposómica en una condición adecuada. Más específicamente, el procedimiento para preparar la preparación farmacéutica liposómica comprende las etapas siguientes: (1) disolver los excipientes lipídicos adecuados para preparar un liposoma en un disolvente orgánico adecuado, tal como alcohol terc-butílico o ciclohexano, después liofilizar para obtener un polvo liofilizado; (2) hidratar el polvo liofilizado con una solución que contiene un contraion del ingrediente activo farmacológico de interés para formar un liposoma vacío; (3) eliminar el contraion extraliposómico por un medio adecuado tal como diálisis o cromatografía en columna y similares con el fin de formar un gradiente de contraiones entre la fase intraliposómica y la fase extraliposómica; y (4) incubar el fármaco con el liposoma para obtener el fármaco en el liposoma. Las descripciones sobre fosfolípidos, colesterol, excipientes y similares hacen referencia a lo que antecede para la preparación liposómica.

20 El lípido es un fosfolípidos con una temperatura de transición de fase relativamente alta, por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilcolina de soja hidrogenada, fosfatidilcolina de clara de huevo hidrogenada, dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) o diestearoil fosfatidilcolina (DSPC) o cualquier combinación de los mismos. Dicho lípido puede también comprender colesterol en una cantidad de, por ejemplo, 2 - 60 mol/mol %, 5 - 55 mol/mol % o 10 -50 mol/mol %. Más específicamente, la cantidad de colesterol puede ser de 15 - 45 mol/mol %, 20 - 40 mol/mol %, respecto al número molar total de todos los ingredientes del liposoma. Los expertos en el campo pueden determinar la cantidad de colesterol en función de requisitos específicos para la temperatura de transición de fase del liposoma que se va a obtener y las propiedades deseadas.

30 Una vez que se prepara la preparación farmacéutica liposómica, la eficiencia de encapsulación del fármaco en el liposoma se puede determinar mediante técnicas convencionales. Los procedimientos para determinar la eficiencia de encapsulación del liposoma incluyen ultrafiltración, diálisis, cromatografía de columna, centrifugación en minicolumna y similares. La ultrafiltración no se usa debido a los elevados requisitos de dispositivos experimentales; la cromatografía de columna no se usa porque la dilución requiere una gran cantidad de eluyente y el contenido del fármaco es muy bajo, de modo que es difícil realizar una determinación del contenido, además, la dilución de una cantidad grande de eluyente también puede conducir a la pérdida de fármaco en el liposoma, a partir de datos de ensayo se puede saber que la eficiencia de encapsulación para diálisis es menor (quizá debido a la rotura del liposoma tras la dilución) y el tiempo para diálisis es largo, de modo que el procedimiento no es adecuado. La determinación de la eficiencia de encapsulación mediante centrifugación en minicolumna tiene las ventajas siguientes: consumo de poco tiempo, velocidad de dilución pequeña para la solución del liposoma y no necesidad de instrumentos caros.

40 La preparación farmacéutica liposómica de la presente invención garantiza no solo una suficiente eficiencia de la encapsulación y suficiente carga de fármaco, pero también ausencia de liberación del fármaco del liposoma durante el almacenamiento in viro, ausencia de una pérdida considerable del fármaco del liposoma durante la circulación en sangre para aumentar la toxicidad. Un importante efecto considerable del fármaco liposómico de la presente invención es que la velocidad de liberación del fármaco se acelera con eficiencia, el índice de terapia del liposoma mejora, el periodo de semivida se prolonga significativamente, la toxicidad se reduce marcadamente en comparación con los productos actuales en el campo y, por tanto, se consiguen los efectos terapéuticos eficaces del fármaco. Por ejemplo, para una preparación farmacéutica liposómica preparada usando fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC) y dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), la toxicidad de la misma se reduce considerablemente y su índice terapéutico mejora significativamente. Por el contrario, si la bicapa fosfolipídica está compuesta por dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), la liberación del fármaco será demasiado rápida y conducirá a una toxicidad considerable, incluso la seguridad no será tan buena como la del fármaco libre. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se supone que la pequeña preparación liposómica unilamelar de la presente invención puede acelerar la liberación del fármaco porque la pequeña preparación liposómica unilamelar puede contener más partículas liposómicas en las que está contenida la precipitación de fármaco con un tamaño de partícula pequeño, en comparación con una preparación liposómica unilamelar más grande, si se fija la proporción fármaco/lípido. La precipitación de fármaco con un tamaño de partícula pequeño tendría un área de superficie relativamente grande y, por tanto, una velocidad de disolución más rápida en las mismas condiciones.

60 Además, la preparación farmacéutica liposómica de la presente invención se preparará usando fosfolípidos adecuados con el fin de alcanzar una liberación eficaz del fármaco en tejidos diana, especialmente en tumores. La bicapa fosfolipídica de la preparación farmacéutica liposómica de la presente invención está compuesta por fosfolípidos con una temperatura de transición de fase relativamente alta. Durante los experimentos se encontró que la toxicidad de la preparación disminuiría significativamente y el índice terapéutico mejoraría considerablemente si

en la preparación se usaran fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC) y dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) o similares. Si la bicapa fosfolipídica está compuesta por dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), la liberación del fármaco sería demasiado rápida y conduciría a una toxicidad considerable, incluso la seguridad no sería tan buena como la de un fármaco sin encapsular.

- 5 La preparación farmacéutica liposómica de la presente invención se puede administrar a un paciente que la necesite mediante una vía de administración de uso habitual en el campo. En una forma de realización de la presente invención, el fármaco liposómico se formula en una preparación para administración parenteral. En una forma de realización preferida de la presente invención, el fármaco liposómico se administra mediante inyección.

- 10 La presente invención también proporciona una preparación farmacéutica liposómica para uso en el tratamiento de una enfermedad, especialmente tumores, en un paciente, en la que la preparación farmacéutica liposómica de la presente invención se administra al paciente que necesite el tratamiento. Preferentemente, también se puede aplicar un procedimiento de termoterapia (tal como un procedimiento de termoterapia radiactiva) en combinación con un paciente con tumor con el fin de potenciar el efecto terapéutico de la preparación farmacéutica liposómica. El paciente puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano.

- 15 La presente invención también se refiere a un uso de la preparación liposómica o preparación farmacéutica liposómica como se ha mencionado en lo que anteceden en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con un tumor.

La presente invención se ilustra adicionalmente por medio de los ejemplos siguientes, que son solo ejemplos y no se deben interpretarse como una limitación de la presente invención.

- 20 Parte 1: Preparación de liposomas

Ejemplo 1

Procedimientos generales para preparar liposomas

1. Procedimiento general 1

- 25 Los fosfolípidos (p. ej., fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) o dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC)) y colesterol (proporción molar de 1:1 a 10:1) se disuelven en un disolvente orgánico, tal como alcohol t-butílico o ciclohexano, para formar una solución transparente. La solución se trata mediante liofilización convencional para obtener un polvo liofilizado. El polvo liofilizado se hidrata a 60 – 65 °C con una solución de sulfato amónico (50 – 1.000 mM), solución de ácido cítrico o solución de sulfato de metal de transición (p. ej., sulfato de níquel) y se agita durante aproximadamente 1 hora para obtener vesículas multilamelares heterogéneas. El tamaño de las vesículas obtenidas se reduce mediante un microfluidizador o un aparato de extrusión de alta presión para obtener liposomas. Una muestra de los liposomas obtenidos se diluye por 200 con una solución de NaCl al 0,9 % y se detecta mediante NanoZS. La solución de tampón extraliposómica se elimina mediante un aparato de ultrafiltración para formar un gradiente transmembrana dinámico. A los liposomas vacíos se añade una solución de clorhidrato de mitoxantrona (10 mg/ml) en una proporción liposoma/fármaco adecuada y la carga del fármaco se realiza a 60 - 65 °C. Tras la incubación durante aproximadamente 1 hora se usa una cromatografía de exclusión en gel para determinar la eficiencia de la encapsulación (EE).

2. Procedimiento general 2

- 40 Los fosfolípidos (p. ej., fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) o dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC)) y colesterol (proporción molar de 1:1 a 10:1) se mezclan y al mismo tiempo se añade una diestearoil fosfatidiletanolamina modificada con polietilenglicol (DSPE-PEG) en 0,1 – 20 % en moles de fosfolípido. La mezcla obtenida se disuelve en un disolvente orgánico, tal como alcohol t-butílico o ciclohexano, para formar una solución transparente. La solución se trata mediante liofilización convencional para obtener un polvo liofilizado. El polvo liofilizado se hidrata a 60 – 65 °C con una solución de sulfato amónico (50 – 1.000 mM), solución de ácido cítrico o solución de sulfato de metal de transición (p. ej., sulfato de níquel) y se agita durante aproximadamente 1 hora para obtener vesículas multilamelares heterogéneas. El tamaño de las vesículas obtenidas se reduce mediante un microfluidizador o un aparato de extrusión de alta presión para obtener liposomas. Una muestra de los liposomas obtenidos se diluye por 200 con una solución de NaCl al 0,9 % y se detecta mediante NanoZS. La solución de tampón extraliposómica se elimina mediante un aparato de ultrafiltración para formar un gradiente transmembrana dinámico. A los liposomas vacíos se añade una solución de clorhidrato de mitoxantrona (10 mg/ml) en una proporción liposoma/fármaco adecuada y la carga del fármaco se realiza a 60 - 65 °C. Tras la incubación durante aproximadamente 1 hora se usa una cromatografía de exclusión en gel para determinar la eficiencia de la encapsulación (EE).

Ejemplo 2**Preparación de liposoma con mitoxantrona PLM60**

HSPC, colesterol y DSPE-PEG2000 en una proporción en peso de 3:1:1 se disolvieron en 95 % de alcohol t-butílico para formar una solución transparente. La solución se trató mediante liofilización para obtener un polvo liofilizado. El polvo liofilizado se hidrató con una solución de sulfato amónico (300 mM) a 60 - 65 ° C y se agitó durante aproximadamente 1 hora para obtener vesículas multilamelares heterogéneas que tienen una concentración final de fosfolípido de 96 mg/ml. El tamaño de vesículas se redujo mediante un microfluidificador para obtener liposomas. Una muestra de los liposomas obtenidos se diluyó por 200 con NaCl al 0,9 % y se detectó mediante NanoZS, que tiene un tamaño promedio de aproximadamente 60 nm y un pico medio entre 40 nm y 60 nm. La solución extraliposómica de sulfato amónico se eliminó mediante un aparato de ultrafiltración y se sustituyó por una solución con sacarosa 250 mM y glicina 50 mM para formar un gradiente de transmembrana dinámico. A los liposomas vacíos se añadió una solución de clorhidrato de mitoxantrona (10 mg/ml) en una proporción liposoma/fármaco de 16:1 y la carga del fármaco se realizó a 60 - 65 °C. Tras la incubación durante aproximadamente 1 hora se determinó una eficiencia de encapsulación (EE) del 100 % mediante cromatografía de exclusión en gel. Los liposomas obtenidos se denominaron PLM60.

Ejemplo 3 (no conforme a la invención)**Preparación de liposoma con mitoxantrona PLM85**

HSPC, colesterol y DSPE-PEG2000 en una proporción en peso de 3:1:1 se disolvieron en 95 % de alcohol t-butílico para formar una solución transparente. La solución se trató mediante liofilización para obtener un polvo liofilizado. El polvo liofilizado se hidrató con una solución de sulfato amónico (300 mM) a 60 - 65 ° C y se agitó durante aproximadamente 1 hora para obtener vesículas multilamelares heterogéneas que tienen una concentración final de fosfolípido de 96 mg/ml. El tamaño de las vesículas se redujo mediante un aparato de extrusión a presión alta para obtener liposomas. Una muestra de los liposomas obtenidos se diluyó por 200 con una solución de NaCl y se detectó mediante NanoZS que tenían un tamaño promedio de aproximadamente 85 nm. La solución extraliposómica de sulfato amónico se eliminó mediante un aparato de ultrafiltración y se sustituyó por una solución con sacarosa 250 mM y glicina 50 mM para formar un gradiente de transmembrana dinámico. A los liposomas vacíos se añadió una solución de clorhidrato de mitoxantrona (10 mg/ml) en una proporción liposoma/fármaco de 16:1 y la carga del fármaco se realizó a 60 - 65 °C. Tras la incubación durante aproximadamente 1 hora se determinó una eficiencia de encapsulación (EE) del 100 % mediante cromatografía de exclusión en gel. Los liposomas obtenidos se denominaron PLM85.

Ejemplo 4 (no conforme a la invención)**Preparación de liposoma con mitoxantrona PLM100**

El mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 3 se usó para preparar liposomas con clorhidrato de mitoxantrona PLM100 en los que la formulación es idéntica a la de PLM60 y PLM85, pero el tamaño de los liposomas era 100 nm.

Ejemplo 5**Preparación de liposoma con mitoxantrona PLM60-dppc**

DPPC, colesterol y DSPE-PEG2000 en una proporción en peso de 3:1:1 se mezclaron y otras etapas eran idénticas a las del Ejemplo 2. Los liposomas obtenidos se denominaron PLM60- dppc.

Ejemplo 6 (no conforme a la invención)**Preparación de liposoma con mitoxantrona PLM60-dmpc**

DMPC, colesterol y DSPE-PEG2000 en una proporción en peso de 3:1:1 se mezclaron y otras etapas eran idénticas a las del Ejemplo 2. Los liposomas obtenidos se denominaron PLM60- dmpc.

Ejemplo 7 (no conforme a la invención)**Preparación de liposoma con mitoxantrona PLM60-DMPC-0,1**

DMPC, colesterol y DSPE-PEG2000 en una proporción en peso de 3:1:0,1 se mezclaron y las otras etapas fueron idénticas las del Ejemplo 2. Los liposomas obtenidos se denominaron PLM60- dmpc-0,1. **Ejemplo 8 (no conforme a la invención)**

Preparación de liposoma con adriamicina PLD60

Se sustituyó la mitoxantrona con adriamicina durante la etapa de la carga del fármaco y otras etapas eran idénticas

a las del Ejemplo 2. Los liposomas obtenidos se denominaron PLD60.

Parte 2: Liberación de fármaco de diferentes formulaciones liposómicas

Ejemplo 9

Diferencias de la liberación de fármaco entre los liposomas con adriamicina PLD60 y los liposomas con mitoxantrona PLM60

En el presente ejemplo se cargaron mitoxantrona y adriamicina bajo un gradiente de pH. Si se añadiera una concentración determinada de cloruro amónico a un medio de liberación, las moléculas de amoniaco difundirían hacia la fase interna del liposoma con ayuda del gradiente, de modo que el pH de la fase interna se elevaría y el fármaco protonado en la fase interna se convertiría en su forma neutra que se difundiría a través de la membrana. Este procedimiento podría acelerar la disolución de la precipitación en la fase interna del liposoma al mismo tiempo. La velocidad de la liberación del fármaco se controló mediante la disolución de la precipitación y con la permeabilidad de la membrana del liposoma. Las condiciones para la liberación del fármaco fueron las siguientes. Los liposomas se diluyeron por 25 con el medio de liberación. Los medios de liberación eran isotónicos, tenían un pH de 7,4.

y tenían una concentración de cloruro amónico de 2, 10 y 40 mM, respectivamente. Los liposomas diluidos se introdujeron en tubos de diálisis y la diálisis se realizó en 2 ml de liposomas diluidos en 400 ml del medio de liberación a 37 °C. Las muestras se tomaron a diferentes puntos de tiempo para el análisis hasta 96 horas después.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de regresión. En el medio de liberación que tiene cloruro amónico 2, 10 y 40 mM, los periodos de semivida de la liberación del fármaco de PDL60 fueron 94,3, 31,9 y 11,2 horas, respectivamente. Con respecto a PLM60 no se observó una liberación obvia en los tres medios de liberación. Dado que PLD60 y PLM60 no tenían diferencias en la composición y el tamaño, la diferencia de las características cinéticas de la liberación del fármaco se podían atribuir a sus diferentes características farmacéuticas. Tanto la adriamicina como la mitoxantrona son ambos antibióticos de tipo antraciclina y sus diferencias residen en que la adriamicina contiene un grupo disociable a pH fisiológico, mientras que la mitoxantrona contiene dos grupos disociables ($pK_a = 8,15$) a pH fisiológico. Este ejemplo ilustra que un fármaco con grupos multidisociables, tal como la mitoxantrona, pueden formar una precipitación compleja con contraiones cuando se usa un procedimiento de carga activa, de modo que la liberación in vitro del fármaco se ralentiza significativamente. Por otro lado, un fármaco con un grupo unidisociable tal como adriamicina se podría liberar demasiado rápido, incluso en un medio de liberación sin plasma cuando se usa un liposoma de tamaño pequeño.

Ejemplo 10

Comportamientos de liberación de liposomas con mitoxantrona con diferentes tamaños

Se tomaron dos condiciones de liberación para comparar los comportamientos de liberación de los liposomas con mitoxantrona con un tamaño diferente.

Condición de liberación 1: un liposoma se diluyó por 25 con un medio de liberación. El medio de liberación contenía 50 % de plasma humano, se ajustó para que fuera isotónico con glucosa y tenía un pH de 7,4. Otras condiciones eran idénticas a las del Ejemplo 9. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de regresión. El resultado mostró que el periodo de semivida de liberación de PLM60 fue de 56,4 horas, mientras que el PLM85 no se liberó significativamente en las mismas condiciones.

Condición de liberación 2: se usó un medio de liberación que contenía 50 % de plasma humano y cloruro amónico 20 mM y otras condiciones eran idénticas a las del Ejemplo 9. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de regresión. El resultado mostró que el periodo de semivida de liberación de PLM60 fue de 26,2 horas, mientras que el periodo de semivida de liberación de PLM85 fue de 36,7 horas.

Este ejemplo indicó suficientemente que la liberación de fármaco podría potenciarse significativamente reduciendo el tamaño del liposoma.

Ejemplo 11

Comportamientos de liberación de liposomas con mitoxantrona con diferentes composiciones de membrana

Se usaron las mismas condiciones de liberación que se han descrito en el Ejemplo 9. El resultado indicó que el periodo de semivida de liberación de PLM60-DPPC era de 116 horas, el periodo de semivida de liberación de PLM60-DMPC era de 26 horas y el periodo de semivida de liberación de PLM60-DMPC-0,1 era de 15 horas. Este ejemplo indicó que el uso de un fosfolípidos con una temperatura de transición de fase T_m menor podría acelerar la liberación del fármaco. No obstante, si la liberación del fármaco se aceleraba excesivamente, la toxicidad del fármaco podría aumentar excesivamente también, lo que se confirmó adicionalmente en los ejemplos siguientes:

Parte 3: Farmacocinética in vivo

Ejemplo 12**Comportamiento farmacocinético de PLM60 en ratones Kunming y comparación entre PLM60 y mitoxantrona libre**

5 Este ejemplo se realizó en ratones Kunming macho con un peso corporal de aproximadamente 20 g. Se inyectaron diferentes niveles de dosis de mitoxantrona a través de la vena de la cola de los ratones. Las dosis de PLM60 fueron 1, 2 y 4 mg/kg y la dosis de mitoxantrona libre (ML) era de 2 mg/kg. Se tomaron muestras de plasma a diferentes puntos de tiempo. Los procedimientos para procesar y detectar muestras de plasma se describieron en el documento: Methods in enzymology, Vol: 391, pág. 176 - 185. Los resultados se mostraron en la Tabla 1 y la Fig.1, en los que se indica claramente que el periodo de semivida de la mitoxantrona se había ampliado significativamente mediante encapsulación en liposomas. A la misma dosis, PLM60 tenía un tiempo de retención en la circulación sanguínea 32 veces el de la ML y una AUC 3.700 veces la de la ML. Un gráfico de la AUC frente a la dosis indicó que PLM60 tenía una farmacocinética lineal un vivo.

Tabla 1: Farmacocinética de PLM60 y ML en ratones Kunming

	PLM60 4 mg/kg	PLM60 2 mg/kg	PLM60 mg/kg	ML 2 mg/kg
Parámetros	Valor	Valor	Valor	Valor
AUC 0 - 48 (mg/l*h)	1451,666	728,398	452,709	0,198
AUC 0-∞ (mg/l*h)	1654,543	892,437	503,078	0,199
AUMC 0 – 48	21838,034	12050,681	7049,259	0,103
AUMC 0-∞	36234,611	24686,917	10488,811	0,135
MRT 0 – 48 (h)	15,043	16,544	15,571	0,517
MRT 0-∞ (h)	21,900	27,662	20,849	0,675
T _{máx} (h)	0,083	0,083	0,250	0,083
C _{máx} (mg/l)	86,329	47,513	25,97	0,699

15 Ejemplo 13**Distribución tisular de PLM60 y ML en ratones portadores de tumores**

Había diferencias obvias en la distribución tisular de PLM60 y ML en ratones portadores de tumores. En el presente ejemplo se usaron ratones Kunning macho con un peso corporal de aproximadamente 20 g. Se inoculó en la axila derecha de los ratones células de sarcoma S-180 a razón de 5×10^5 . Los fármacos se inyectaron a través de la vena en los ratones cuando el tumor creció a 0,4 - 0,7 g. Tras la administración de los fármacos se ejecutó a los ratones a varios puntos de tiempo y se extrajeron sus tejidos para determinar la concentración de mitoxantrona. Los tejidos incluyeron corazones, hígados, bazo, pulmones, riñones, intestinos, médula ósea y tumores. Los resultados mostraron que PLM60 estaba claramente dirigido a los tejidos tumorales. Los datos detallados se mostraron en la Tabla 2 y la Figura 2.

25 Tabla 2: Datos de distribución tisular de PLM60 y ML en ratones portadores de tumores

Tejido	PLM-60 4 mg/kg			FM 4 mg/kg		
	t (h)	C-µg/g	SD	t(h)	C-µg/g	SD
Corazón	1	4,01	0,38	1	5,385	0,679
	4	3,39	0,38	4	3,517	0,952
	8	3,48	0,64	8	3,197	0,357
	16	2,83	0,57	24	2,943	0,549
	24	2,06	0,48			
Hígado	1	6,78	0,78	1	4,77	0,997
	4	5,99	0,67	4	3,556	0,543
	8	6,31	0,38	8	2,659	0,439
	16	6,22	0,95	24	1,937	0,346
	24	4,52	0,65			

(continuación)

Tejido	PLM-60 4 mg/kg			FM 4 mg/kg		
	t (h)	C- μ g/g	SD	t(h)	C- μ g/g	SD
Bazo	1	4,66	1,37	1	4,044	0,414
	4	4,36	0,67	4	4,46	0,494
	8	4,78	1,7	8	3,774	2,676
	16	7,56	2,13	24	7,752	2,469
	24	5,91	1			
Pulmón	1	8,44	1,08	1	10,205	1,732
	4	4,58	2,36	4	8,024	1,859
	8	6,33	1,43	8	7,018	0,728
	16	5,12	1,24	24	8,082	0,844
	24	2,89	0,23			
Riñón	1	7,09	0,84	1	18,243	1,238
	4	7,12	1,17	4	17,192	5,01
	8	7,04	0,96	8	13,409	1,251
	16	6,75	1,16	24	7,463	1,209
	24	5,82	0,84			
Intestino	1	1,66	0,66	1	1,532	0,309
	4	2,33	0,66	4	2,14	0,655
	8	2,34	0,64	8	2,551	1,204
	16	2,42	0,51	24	3,936	1,625
	24	2,25	0,32			
Médula ósea	1	1,09	0,54	1	0,127	0,041
	4	0,64	0,14			
	8	0,73	0,16			
	16	0,54	0,24			
	24	0,12	0,02			
Tumor	1	91,28	7,41	1	0,0614	0,0078
	4	63,9	8,56	4	0,0133	0,0027
	8	54,01	8,04			
	16	38,61	9,19			
	24	10,41	2,67			

Ejemplo 14**Comparación de farmacocinéticas de diferentes formulaciones liposómicas**

- 5 Los animales usados en este ejemplo eran similares a los del ejemplo 12. Se inyectó en la vena de la cola de los ratones PLM60- DPPC, PLM60- DMPC-0,1 y PLM60- DMPC a 4 mg/kg. Los datos se muestran en la Tabla 3 y la Figura 3. Se mostró que la farmacocinética de los fármacos liposómicos cambiaba significativamente con el cambio de composición de la membrana del liposoma. Los valores de MRT de PLM60- DPPC, PLM60- DMPC-0,1 y PLM60- DMPC in vivo fueron de 14,22, 7,914 y 10,123 horas, respectivamente. La diferencia entre PLM60- DPPC y PLM60- DMPC residió en las longitudes de las cadenas de hidrocarburo de los fosfolípidos, que eran de 16 y 14 carbonos, respectivamente. La longitud de la cadena de acilo podía afectar significativamente a la permeabilidad de membrana de la bicapa fosfolipídica. La temperatura de transición de fase de DPPC fue de 41 °C y la temperatura de transición de fase de DMPC fue de 23 °C. La diferencia entre PLM60- DMPC-0,1 y PLM60- DMPC residió en el grado de PEGilación. La liberación del fármaco liposómico en el plasma depende de dos factores: uno es la liberación del fármaco liposómico a través de la bicapa fosfolipídica y el otro es la eliminación mediante las lipoproteínas y el sistema retículoendotelial (SER). Dado que la PEGilación de PLM60- DMPC-0,1 no era completa, la liberación producida por los componentes del plasma tenía mayor influencia sobre el mismo.
- 10
- 15

Tabla 3: Comparación de la farmacocinética *in vivo* de diferentes formulaciones liposómicas en ratones

Parámetro	PLM60-DPPC 4 mg/kg	PLM60-DMPC-0,1 4 mg/kg	PLM60-DMPC 4 mg/kg
	Valor	Valor	Valor
AUC 0 - 48 (mg/l*h)	1506,710	174,849	337,641
AUC 0-∞ (mg/l*h)	1581,242	175,705	344,134
AUMC 0 - 48	21425,274	1383,757	3417,981
AUMC 0-∞	26235,613	1478,267	3818,856
MRT 0 - 48 (h)	14,220	7,914	10,123
MRT 0-∞ (h)	16,592	8,413	11,097
T _{máx} (h)	1,000	1,000	1,000
C _{máx} (mg/l)	81,976	19,853	39,115

Parte 4: Comparación de la toxicidad de diferentes formulaciones**Ejemplo 15****5 Comparación de toxicidad aguda entre PLM60 y ML**

100 ratones Kunming (la mitad macho y la mitad hembra) con un peso corporal de 18 – 22 g se dividieron en 10 grupos, cada grupo con 10 ratones, la mitad macho y la mitad hembra. A los ratones de los grupos 1 – 5 se administraron diferentes niveles de dosis de ML, mientras que a los ratones de los grupos 6 – 10 se les administró un nivel de dosis equivalente del fármaco liposómico. Se observaron cambios en el peso corporal y se registró la hora de la muerte de cada animal. Se diseccionó a los animales muertos y se realizó la necropsia. Los resultados de todos los grupos se mostraron en la Tabla 4, que muestran que la toxicidad aguda de PLM60 era mucho menor que la de ML.

Tabla 4: Comparación de la toxicidad aguda de PLM60 y ML en ratones Kunming

Liposoma y dosis	Tiempo de supervivencia de los ratones macho (día)					Tiempo de supervivencia de los ratones hembra (día)				
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
mg/kg										
ML 20	7	8	8	9	6	8	8	8	9	NA
ML 12	18	13	13	NA	7	12	12	13	14	NA
ML 7.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ML 4.32	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ML 2.59	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PLM60 20	17	NA	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PLM60 12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PLM60 7.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PLM60 4.32	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PLM60 2.59	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA: Datos no disponibles, es decir, ningún animal murió al final de la observación experimental.

15 Ejemplo 16**Comparación de la toxicidad aguda de diferentes formulaciones liposómicas**

90 ratones Balb/c macho con un peso corporal de 18 – 22 g se dividieron en 9 grupos, cada grupo con 10 ratones. A los ratones del grupo 1 se les administró FM a 6 mg/kg, mientras que a los ratones de los otros 8 grupos se les

administró PLM60, PLM60- DPPC y PLM60- DMPC-0.1 and PLM60- DMPC a 6 y 12 mg/kg, respectivamente. Se observaron cambios en el peso corporal y se registró la hora de la muerte de cada animal. Se diseccionó a los animales muertos y se realizó la necropsia. Los resultados de la muerte de los ratones del grupo tratado con ML y de los grupos tratados con fármacos liposómicos se mostraron en la Tabla 5. Este experimento mostró que el orden de toxicidad aguda era: PLM60 < PLM60- DPPC < PLM60- DMPC-0.1 FM < PLM60- DMPC. Este experimento también confirmó que la liberación de fármaco podría acelerarse adicionalmente usando vesículas unilamelares pequeñas y fosfolípidos con una Tm menor como la composición de la bicapa, tal como PLM60- DMPC, de modo que se tiene como resultado más toxicidad in vivo. Cabe destacar que la toxicidad de los liposomas con PEGilación incompleta fue menor que la de los liposomas con una PEGilación más completa. Esto se puede atribuir a que bajo la acción de las lipoproteínas y el ataque del sistema inmunitario durante la circulación sanguínea, PLM60- DMPC-0.1 con PEGilación incompleta liberarían el fármaco antes en comparación con PLM60- DMPC y no liberarían de repente en los tejidos importantes, de modo que exhiben una toxicidad menor pero la toxicidad de PLM60- DMPC-0,1 era todavía casi equivalente a la de la mitoxantrona libre.

Tabla 5: Comparación de la toxicidad aguda de diferentes liposomas del ejemplo 17

Formulario y dosis (mg/kg)	Tiempo de supervivencia de los ratones (día)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ML-6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PLM60-6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PLM60-12	NA	NA	NA	NA	NA	10	NA	NA	NA	11
Plm60 DPPC-6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Plm60 DPPC-12	10	10	12	11	NA	NA	NA	13	NA	14
Plm60-DMPC-6	4	NA	NA	3	6	7	7	6	NA	NA
Plm60 DMPC-12	3	3	5	3	3	3	4	3	3	3
Plm60 DMPC-0,1-6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Plm60 DMPC-0,1-12	10	12	10	12	10	10	10	11	10	10

NA: Ningún animal murió al final de la observación experimental.

15 Ejemplo 17

Comparación de la toxicidad de formulaciones liposómicas con diferentes tamaños

En la comparación de PLM60, PLM85 y PLM 100 se usaron ratones C57 macho con un peso corporal de 18 – 22 g. La dosis fue de 9 mg/kg. Los resultados indicaron que las variaciones en el peso corporal producidas por las tres formulaciones liposómicas eran equivalentes, lo que confirmó que las tres formulaciones liposómicas no tenían diferencias significativas en la toxicidad en las condiciones experimentales. En ratones del grupo de ML, el peso corporal disminuyó un 30 % y aproximadamente el 20 % de los ratones murió.

Parte 5: Efectos antitumorales in vivo.

Ejemplo 18

Comparación de los efectos del tratamiento de PLM60 y ML sobre el sarcoma S-180

En ratones portadores de tumores ascíticos se inocularon células de tumor S180 y 7 días después fueron ejecutados mediante decapitación y se extrajo el fluid ascítico viscoso lechoso y se diluyó con medio RPMI 1640. Tras la dilución, el número de células tumorales se ajustó a $2,5 \times 10^6$ células/ml. En los tejidos de la axila de la extremidad delantera de ratones KM macho con un peso corporal de 18 – 22 g se inocularon 0,2 ml de la suspensión de células tumorales que contenía aproximadamente 5×10^5 células tumorales. Tras la inoculación, las células en la suspensión de células tumorales residual se contaron con el microscopio óptico y las células tumorales vivas eran más del 95 %. El número de ratones inoculados fue de 80.

Siete días después de la inoculación se seleccionaron 39 ratones con tumores con márgenes claros que tenían un diámetro de aproximadamente 5 mm y se dividieron en 5 grupos por el volumen tumoral y el peso corporal, es decir 7 ratones en el grupo control blanco, 8 ratones en cada uno de los grupos tratados con 4 mg/kg PLM60, 6 mg/kg PLM60, 4 mg/kg ML y 6 mg/kg ML. Se administró a los ratones mediante inyección intravenosa.

Tras la administración se alimentó a los ratones con normalidad. Los diámetros de los tumores se midieron con un compás vernier 3 veces a la semana y los pesos corporales se midieron al mismo tiempo. El volumen del tumor (VT) se calculó mediante la fórmula siguiente: $V = 1/2 \times a \times b^2$, en la que a y b representan la longitud y la anchura, respectivamente. Los volúmenes tumorales se calcularon usando los resultados de la medición. Se ejecutó a los ratones mediante decapitación el día 21 tras la inoculación y se extrajeron los tumores y se pesaron. La tasa de

inhibición tumoral (%) se calculó con la fórmula siguiente: Tasa de inhibición tumoral= (1 - peso tumoral promedio del grupo de fármaco / peso tumoral promedio del grupo control) x 100 %. Los resultados experimentales se analizaron mediante la prueba t.

5 La Tabla 6 mostró que el crecimiento del tumor sólido S 180 se suprimió significativamente en el grupo tratado con 4 mg/kg de PLM60 y en el grupo tratado con 6 mg/kg de PLM60.

Tabla 6: Efectos de PLM60 sobre el peso del tumor sólido S180

Grupo	Peso del tumor (mg)	Proporción de inhibición del tumor (%)
Control	2813,8 ± 884,2	
PLM60 4 mg/kg	421,9 ± 215,4a	85,00
PLM60 6 mg/kg	332,4 ± 162,5a	88,19
Mitoxantrona libre 4 mg/kg	2828,5 ± 1067,8	---
Mitoxantrona libre 6 mg/kg	2293,3 ± 1720,0	18,50
a: en comparación con el grupo control, p < 0,01		

Ejemplo 19

Efectos del tratamiento de PLM60 y ML sobre el modelo de ascitis L1210

10 En ratones con tumores ascíticos BDF1 se inocularon células de tumor ascítico L1210 y 7 días después fueron ejecutados mediante decapitación y se extrajo el fluido ascítico viscoso lechoso en condiciones de asepsia y se diluyó con medio RPMI 1640. Tras la dilución, el número de células tumorales se ajustó a $2,5 \times 10^6$ células/ml. En la cavidad abdominal de un ratón BDF1 hembra de 7 – 8 semanas de edad se inocularon 0,2 ml de la suspensión de células tumorales que contenía aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células tumorales. Tras la inoculación, las células en la suspensión de células tumorales residual se contaron con el microscopio óptico y las células tumorales vivas eran más del 95 %.

15 24 horas después se dividió a los ratones en 8 grupos por el peso corporal y se les administró ML y PLM60 mediante inyección en un volumen de 20 ml/kg a través de la vena de la cola de los ratones, respectivamente. Tras la administración se alimentó a los ratones con normalidad. Sus pesos corporales se midieron 3 veces a la semana, se observó y registró el momento de la muerte de cada ratón y se calculó el tiempo de supervivencia. Para evaluar el tiempo de supervivencia de cada grupo se usaron el tiempo de supervivencia medio (TSM) y la mediana del tiempo de supervivencia. La observación experimental se mantuvo durante 60 días después de la inoculación.

20 Los datos se analizaron mediante el software de estadística SPSS 11.5. Los resultados mostraron que todos los grupos de administración exhibían un incremento del tiempo de supervivencia en comparación con el grupo control y el grupo de PLM60 exhibió una mejora significativa del tratamiento en comparación con el grupo de ML a la misma dosis (P < 0,05).

Ejemplo 20

Efectos del tratamiento de PLM60 y ML sobre el modelo de metástasis hepática L1210

30 En ratones con tumores ascíticos BDF1 se inocularon células de tumor ascítico L1210 y 7 días después fueron ejecutados mediante decapitación y se extrajo el fluido ascítico viscoso lechoso en condiciones de asepsia y se diluyó con medio RPMI 1640. Tras la dilución, el número de células tumorales se ajustó a $2,5 \times 10^5$ células/ml. En la cavidad abdominal de un ratón BDF1 macho de 7 – 8 semanas de edad se inocularon por vía intravenosa 0,2 ml de la suspensión de células tumorales que contenía aproximadamente $5,0 \times 10^4$ células tumorales. Tras la inoculación, las células en la suspensión de células tumorales residual se contaron con el microscopio óptico y las células tumorales vivas eran más del 95 %. En total se inoculó a 62 ratones.

35 24 horas después se agrupó a los ratones y se inició la administración. Tras la administración se alimentó a los ratones con normalidad. Sus pesos corporales de los ratones se midieron 3 veces a la semana, se observó y registró cada día el momento de la muerte de cada ratón y se calculó el tiempo de supervivencia. La observación experimental se mantuvo durante 60 días después de la inoculación.

40 El resultado mostró que todos los ratones del grupo control murieron entre los días 11 y 14 tras la inoculación, todos los ratones de los tres grupos de niveles de dosis de ML murieron entre los días 11 y 17 tras la inoculación, todos los ratones del grupo que recibió 2 mg/kg de PLM60 murieron entre los días 15 y 29 tras la inoculación, solo un ratón del grupo que recibió 6 mg/kg de PLM60 murió el día 39 tras la inoculación y ningún ratón del grupo que recibió 8 mg/kg de PLM60 murió durante la observación.

Los datos se analizaron mediante el software de estadística SPSS 11.5. Los resultados mostraron que el grupo que recibió 6 mg/kg de ML y todos los grupos de fármacos liposómicos exhibieron un incremento significativo en tiempo de supervivencia de los ratones en comparación con el grupo control blanco. Al mismo nivel de dosis, la mitoxantrona liposómica exhibió un incremento significativo en el tiempo de supervivencia de los ratones en comparación con la mitoxantrona libre. Los resultados se muestran en la tabla 8.

5

Tabla 8: Efectos de la inoculación intravenosa de L1210 sobre el tiempo de supervivencia de los ratones BDF1

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (N)	Número de animales muertos (N)	Tiempo de supervivencia (intervalo de confianza del 95 %)		Tasa de supervivencia (%)
				Tiempo medio de supervivencia	Mediana del tiempo de supervivencia	
Control	--	6	6	11,83 ± 0,48 (10,90 - 12,77)	11,0	0
ML	2	8	8	12,13 ± 0,61 (10,93 - 13,32)	11,0	0
	4	8	8	13,25 ± 0,53 (12,22 - 14,28)	13,00 ± 0,46 (12,11 - 13,89)	0
	6	8	8	14,50 ± 0,71 (13,11 - 15,89)	14,00 ± 0,91 (12,21 - 15,79)	0
PLM60	2	8	8	19,13 ± 1,57 (16,04 - 22,21)	18,00 ± 1,41 (15,23 - 20,77)	0
	4	8	5	36,50 ± 6,51 (23,75 - 49,25)	22,00 ± 5,660,61 (10,91 - 33,09)	37,50
	6	8	1	57,38 ± 2,46 (52,56 - 62,19)	N ^b	87,50
	8	8	0	Na	N ^a	100,00

N^a: Ningún animal murió hasta el final de 60 días de observación experimental y no se calculó la mediana del tiempo hasta la supervivencia.
N^b: Sólo uno de los animales murió hasta el final de 60 días de observación experimental y no se calculó la mediana del tiempo hasta la supervivencia.

Ejemplo 21

Efectos del tratamiento de la mitoxantrona liposómica con diferentes tamaño sobre tumores ascíticos L1210

10 El esquema experimental y el modo de procesamiento de datos fueron los mismos que en el Ejemplo 19. Se fijaron cinco grupo, incluidos el grupo control, el grupo tratado con ML, el grupo tratado con PLM60, el grupo tratado con PLM85 y el grupo tratado con PLM100. La dosis de administración para ratones en cada grupo fue de 4 mg/kg. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Los resultados mostraron que los liposomas con menor tamaño tenían mejores efectos de tratamiento.

15 **Tabla 9: Efectos del tumor ascítico L1210 sobre el tiempo de supervivencia de los ratones BDF1**

Grupo	Dosis (mg/kg)	Número de animales (N)	Número de animales muertos (N)	Tiempo de supervivencia (intervalo de confianza del 95 %)		Tasa de supervivencia (%)
				Tiempo medio de supervivencia	Mediana del tiempo de supervivencia	
Control	--	12	12	9,08 ± 0,19	9,00 ± 0,21	0
ML	4	12	8	38,67 ± 3,54	36,00 ± 6,06	33,33
PLM60	4	12	4	47,00 ± 2,88	N ^b	66,67
PLM85	4	12	8	39,17 ± 4,1	38,00 ± 11,26	33,33
PLM100	4	12	10	30,08 ± 3,59	23,00 ± 2,89	16,66

N^b: Sólo unos pocos animales murieron al final de 60 días de observación experimental y no se calculó la mediana del tiempo hasta la supervivencia.

Algunos ejemplos preferidos de la presente invención se han descrito anteriormente pero con estos ejemplos no se pretende limitar de ningún modo el ámbito de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un fármaco liposómico, en el que (1) el fármaco liposómico comprende mitoxantrona; (2) el liposoma del fármaco liposómico tiene un tamaño de 30-80 nm; (3) la bicapa del liposoma comprende un fosfolípido con una temperatura de transición de fase (Tm) superior a la temperatura corporal, de modo que la temperatura de transición de fase del liposoma es mayor que la temperatura corporal, la del colesterol y la de un lípido modificado con polímero hidrófilo; y (4) la fase intraliposómica del liposoma comprende un contraion multivalente en la que el contraion multivalente es portador de dos o más cargas opuestas a la del ingrediente farmacológico activo, seleccionándose el contraion multivalente de un anión de ácido orgánico saturado o insaturado, un anión de ácido inorgánico o una forma iónica de un aminoácido, y en la que el ácido orgánico está seleccionado de ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico y ácido maleico; el ácido inorgánico está seleccionado del anión sulfato y el anión fosfato; el aminoácido está seleccionado de cisteína.
2. El fármaco liposómico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tamaño del liposoma es 35 – 75 nm, preferentemente 40 – 70 nm, especialmente 40 – 60 nm.
3. El fármaco liposómico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el contraion multivalente es un anión citrato, anión sulfato o anión fosfato.
4. El fármaco liposómico de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el contraion multivalente es un anión sulfato.
5. El fármaco liposómico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** el fosfolípido con una temperatura de transición de fase (Tm) superior a la temperatura corporal en la bicapa fosfolipídica está seleccionado de fosfatidilcolina, fosfatidilcolina hidrogenada de soja, fosfatidilcolina de clara de huevo hidrogenada, dipalmitoil fosfatidilcolina, diestearoil fosfatidilcolina o cualquier combinación de los mismos.
6. El fármaco liposómico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la bicapa fosfolipídica comprende además un fosfolípido con una temperatura de transición de fase Tm no superior a la temperatura corporal.
7. El fármaco liposómico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fosfolípido con una Tm superior a la temperatura corporal representa 50 – 100 mol/% mol, preferentemente 55 – 95 mol/% mol, más preferentemente 60 – 90 mol/% mol respecto al contenido total de los fosfolípidos en la bicapa fosfolipídica.
8. El fármaco liposómico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el contenido de colesterol es de 2 - 60 mol/mol %, preferentemente 5 - 55 mol/mol %, especialmente 10 - 50 mol/mol %, particularmente 15 - 45 mol/mol %, más particularmente 20 – 40 mol/mol %, respecto al contenido total de los ingredientes en la bicapa fosfolipídica.
9. El fármaco liposómico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que los lípidos modificados con polímeros hidrófilos están seleccionados de diaestearoil fosfatidiletanolamina modificada con PEG (DSPE-PEG), diaestearoil fosfatidilglicerol modificado con PEG (DSPG-PEG), colesterol modificado con PEG (col-PEG), diaestearoil fosfatidiletanolamina modificada con polividona (DSPE-PVP), diaestearoil fosfatidilglicerol modificado con polividona (DSPG-PVP), colesterol modificado con polividona (col-PVP), o cualquier combinación de los mismos, en una cantidad de 0,1 - 20 mol/% mol, preferentemente 0,3 - 18 mol/% mol, más preferentemente 0,5 - 15 mol/% mol, incluso más preferentemente 0,8 - 12 mol/% mol, más preferentemente 3 - 6 mol/% mol respecto al contenido total de los fosfolípidos en la bicapa fosfolipídica.
10. El fármaco liposómico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol y diestearoil fosfatidiletanolamina modificada con PEG en una proporción en peso de 3:1:1, en el que la diestearoil fosfatidiletanolamina modificada con PEG es, preferentemente, diestearoil fosfatidiletanolamina modificada con PEG2000.
11. El fármaco liposómico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura de transición de fase Tm del liposoma es superior a la temperatura corporal.
12. Un procedimiento para preparar el fármaco liposómico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende las etapas siguientes: (1) preparar un liposoma con un tamaño de 30 - 80 nm usando un fosfolípido con una Tm superior a la temperatura corporal, a la del colesterol y a la de un lípido modificado con polímero hidrófilo; y (2) encapsular la mitoxantrona y la fase intraliposómica del liposoma comprende un contraion multivalente.
13. Una preparación farmacéutica liposómica, que comprende el fármaco liposómico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y, opcionalmente, un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. La preparación farmacéutica liposómica de acuerdo con la reivindicación 13, que además comprende una sal para alterar la presión osmótica, un agente tampón y/o un antioxidante.
15. El fármaco liposómico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 11 o la preparación farmacéutica liposómica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 – 14 para su uso en el tratamiento de un tumor en un paciente.

16. El fármaco liposómico o la preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el tratamiento comprende además tratar al paciente mediante termoterapia, preferentemente termoterapia radiactiva.

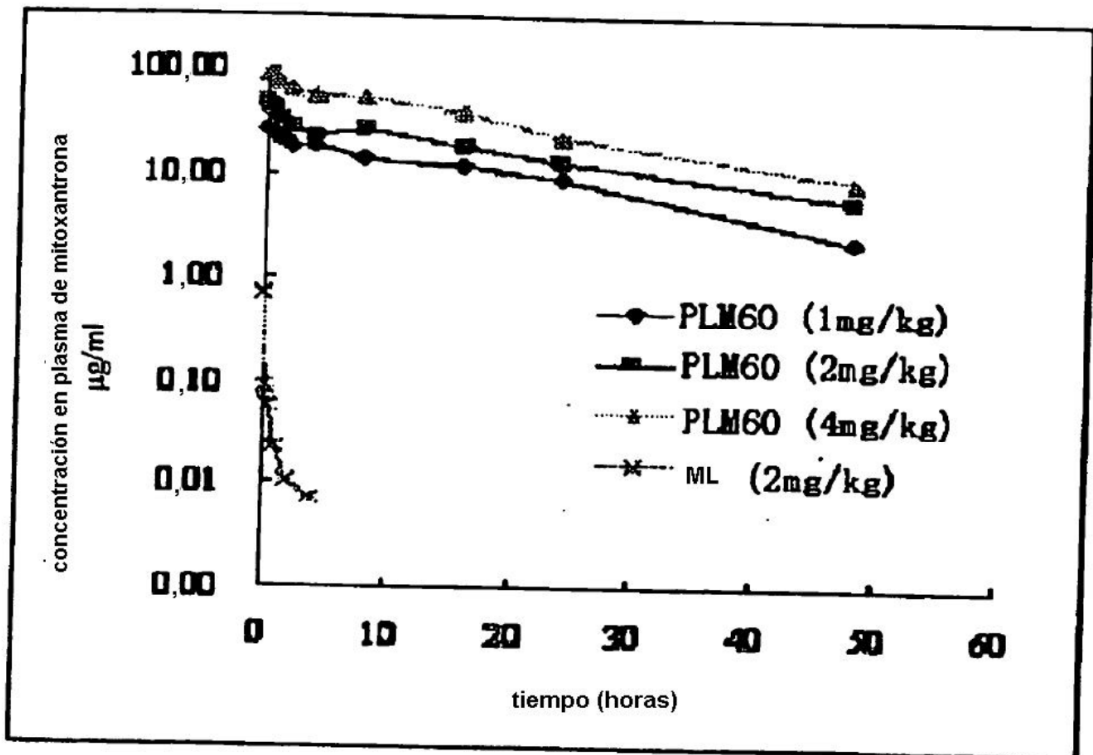


Fig.1

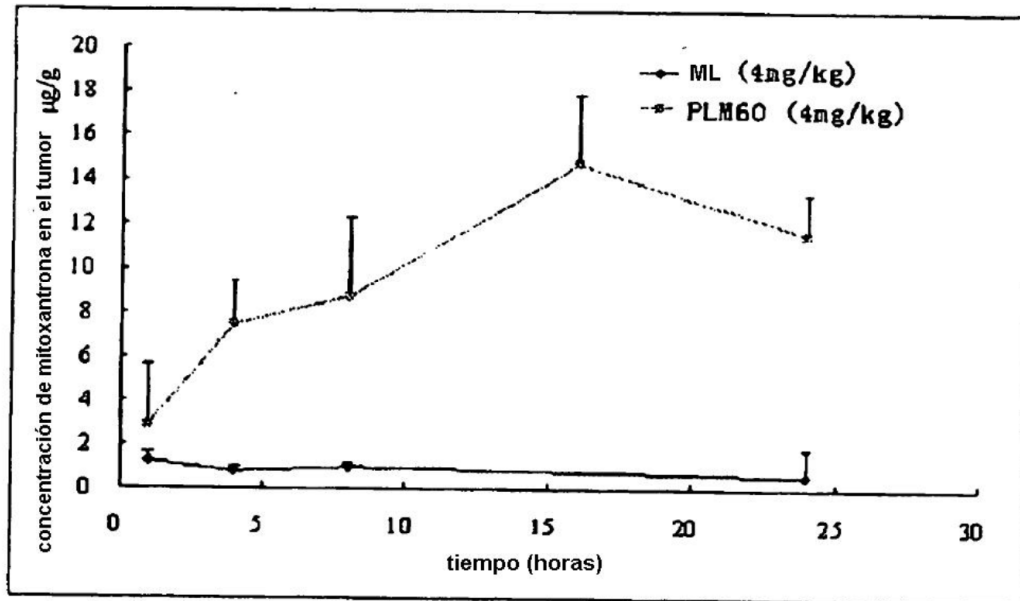


Fig.2

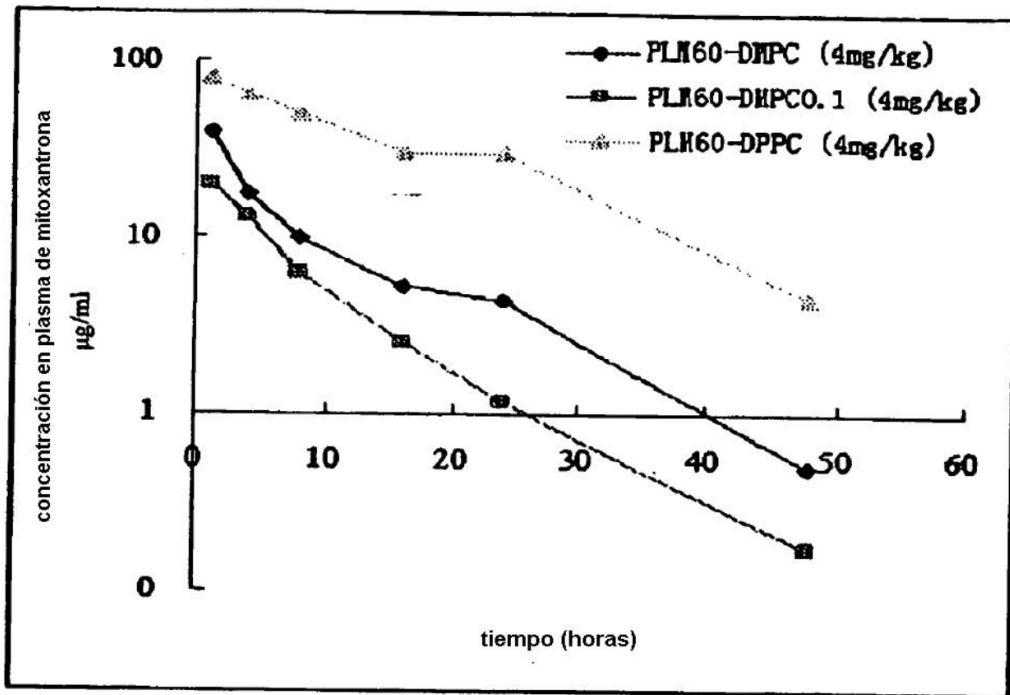


Fig.3