

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 601**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2004 E 04776989 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 1660041**

54 Título: **Formulaciones de fotosensibilizadores no polares para terapia fotodinámica**

30 Prioridad:

26.08.2003 US 648168

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

20.05.2013

73 Titular/es:

**BIOLITEC PHARMA MARKETING LTD (100.0%)
Level 6 (D), Main Office Tower, Financial Park
Labuan, Jalan Merdeka
87018 F.T. Labuan , MY**

72 Inventor/es:

**ALBRECHT, VOLKER;
FAHR, ALFRED;
SCHEGLMANN, DIETRICH;
GRÄFE, SUSANNA y
NEUBERGER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 403 601 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

Formulaciones de fotosensibilizadores no polares para terapia fotodinámica

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a la preparación de formulaciones liposómicas que contienen Temoporina u otros fotosensibilizadores no polares y su uso en terapia, en particular mediante inyección intravenosa.

2. Declaración de Divulgación de Información

15 Los liposomas son vesículas artificiales compuestas de bicapas lipídicas concéntricas separadas por compartimientos de agua y se han investigado extensamente como vehículos de administración de fármacos. Debido a su estructura, composición química y tamaño coloidal, todos los cuales pueden ser bien controlados por los métodos de preparación, los liposomas presentan varias propiedades que pueden ser útiles en diversas aplicaciones. Las propiedades más importantes son el tamaño coloidal, es decir, distribuciones de tamaño de partícula más bien uniforme en el rango de 20 nm a 10 µm, y la membrana especial y características de la superficie.

20 Los liposomas se utilizan como vehículos para fármacos y antígenos, porque pueden servir para varios propósitos diferentes (Storm & Crommelin, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1, 19-31 1998). Los fármacos encapsulados en liposomas son inaccesibles a las enzimas metabolizadoras. Por el contrario, los componentes del cuerpo (tales como eritrocitos o tejidos en el sitio de la inyección) no están directamente expuestos a la dosis completa del medicamento. La duración de la acción del fármaco puede ser prolongada por los liposomas debido a una liberación más lenta del fármaco en el cuerpo. Los liposomas poseyendo un potencial de dirección, lo que significa, opciones de focalización cambian la distribución de la droga en el cuerpo. Las células utilizan los mecanismos de endocitosis o fagocitosis para tomar los liposomas en el citosol. Además, los liposomas pueden proteger un medicamento contra la degradación (por ejemplo, la degradación metabólica. Aunque a veces tienen éxito, los liposomas tienen limitaciones. Los liposomas no sólo entregan fármacos al tejido enfermo, sino que también entran rápidamente en el hígado, el bazo, los riñones y los sistemas reticuloendoteliales, y pierden drogas mientras están en circulación (Harris & Chess, *Nature*, March 2003, 2, 214-221).

35 La pegilación es un método alternativo para superar estas deficiencias. En primer lugar, la pegilación mantiene los niveles del fármaco dentro de la ventana terapéutica para períodos de tiempo más largos y proporciona la droga como un resto de larga circulación que se degrada gradualmente en más pequeño, más activo, y/o en fragmentos más fáciles de eliminar. En segundo lugar, permite que los micro particulados de larga circulación que contienen fármaco o las grandes macromoléculas se acumulen lentamente en sitios patológicos con vasculatura o receptores de expresión afectados, y mejora o intensifica la administración de fármacos en esas áreas. En tercer lugar, puede ayudar a conseguir un mejor efecto de focalización para aquellos medicamentos dirigidos y vehículos de fármacos, los que se supone alcanzan las zonas patológicas con disminución del flujo sanguíneo o con una baja concentración de un antígeno diana. Los beneficios de la pegilación típicamente resultan en un aumento de la estabilidad (temperatura, pH, solvente, etc.), una inmunogenicidad y antigenicidad significativamente reducida, una resistencia a las proteasas, un mantenimiento de la actividad catalítica, y mejoras en la solubilidad, entre otras características, y un aumento de la estabilidad líquido del producto y la reducción de la agregación inducida por agitación.

50 Membranas de los liposomas conteniendo especies compatibles con bicapas, tales como poli (etilenglicol)-enlazados con lípidos (PEG-lípido) o gangliósidos se utilizan para preparar los liposomas encubiertos. (Papahadjopoulos et al., *PNAS*, 88, 11460-4 1991). Los liposomas encubiertos tienen una vida media relativamente larga en la circulación sanguínea y muestran una biodistribución in vivo alterada. Vaage et al. (*Int. J. of Cancer* 51, 942-8, 1992) preparó liposomas encubiertos de doxorubicina y los utilizó para tratar carcinomas primarios de ratón con crecimiento bien establecido y recientemente implantados, y para inhibir el desarrollo de metástasis espontáneas de implantes tumorales intra-mamarios. Llegaron a la conclusión de que el tiempo de circulación largo de los liposomas encubiertos de formulación de doxorubicina explica su superior eficacia terapéutica. La presencia de los lípidos MPEG-derivatizados (pegilado) en la membrana bicapa de liposomas estéricamente estabilizados proporciona efectivamente una barrera estérica contra las interacciones con las proteínas plasmáticas y los receptores de la superficie celular que son responsables de la rápida desestabilización/ruptura intravascular y el aclaramiento RES visto después de la administración i.v. de liposomas convencionales. Como resultado, los liposomas pegilados tienen una vida media de circulación prolongada, y las farmacocinéticas de cualquier agente encapsulado son alteradas para ajustarse a aquellas del vehículo liposomal en lugar de las del fármaco atrapado (Stewart et al., *J. Clin. Oncol.* 16, 683-691, 1998). Debido a que el mecanismo de localización del tumor de los liposomas pegilados es por medio de extravasación a través de los vasos sanguíneos con fugas en el tumor (Northfelt et al., *J. Clin. Oncol.* 16, 2445-2451, 1998; Muggia et al., *J. Clin. Oncol.* 15, 987-993, 1997), la circulación prolongada es probable que favorezca la acumulación en el tumor, aumentando el número total de pasadas realizadas por los liposomas pegilados a través de la vasculatura del tumor.

La Terapia Fotodinámica (TFD) es una de las nuevas técnicas más prometedoras que se están explorando para su uso en una variedad de aplicaciones médicas y se conoce como un tratamiento bien reconocido para la destrucción de los tumores ("Pharmaceutical development and medical applications of porphyrin-type macrocycles", T.D. Mody, J. Porphyrins Phthalocyanines, 4, 362-367 2000). Otra aplicación importante de la TFD es el tratamiento de enfermedades infecciosas debido a microorganismos patogénicos incluyendo infecciones dérmicas, dentales, supurativas, respiratorias, gastrointestinales, genitales y otras infecciones.

Un problema constante en el tratamiento de enfermedades infecciosas es la falta de especificidad de los agentes usados para el tratamiento de la enfermedad, lo que resulta en la obtención por parte del paciente de un nuevo conjunto de enfermedades derivadas de la terapia.

El uso de la TFD para el tratamiento de diversos tipos de enfermedades es limitado debido a las características inherentes de fotosensibilizadores. Estos incluyen su alto costo, la retención prolongada en el organismo huésped, sustancial fototoxicidad en la piel, toxicidad de fondo, baja solubilidad en soluciones fisiológicas (lo que reduce su utilidad para la administración intravascular, ya que puede provocar accidentes tromboembólicos), y baja eficacia en la focalización. Estos inconvenientes conducen a la administración de dosis extremadamente altas de un fotosensibilizador, que aumentan dramáticamente la posibilidad de la acumulación del fotosensibilizador en tejidos no dañados y el consiguiente riesgo de afectar a sitios no dañados.

Uno de los posibles enfoques para aumentar la especificidad de los fotosensibilizadores y la eficacia de la TFD es la conjugación de un fotosensibilizador con un vector ligando, que se une específicamente a los receptores sobre la superficie de una célula diana. Un número de moléculas naturales y sintéticas reconocidas por las células diana se puede utilizar como tales vectores. Este enfoque se utiliza ahora en el diseño de nuevas generaciones de fotosensibilizadores para el tratamiento de tumores. ("Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy" E.D. Sternberg, D. Dolphin, C. Brueckner, Tetrahedron, 54, 4151-4202 1998).

Otro enfoque para aumentar la selectividad al tumor mediante la focalización de fotosensibilizadores a las células tumorales está utilizando liposomas, por ejemplo, liposomas conjugados con transferrina (Derycke & De Witte, Int. J. Oncology 20, 181-187, 2002). Debido a que los liposomas no conjugados son a menudo fácilmente reconocidos y eliminados por el sistema reticuloendotelial, se utilizaron liposomas de PEG-ilados. (Woodle & Lasic, Sterically stabilized liposomes, Biochim Biophys Acta 1113, 171-199, 1992; Dass et al., Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes. J Pharm Pharmacol 49, 972-975, 1997).

Dado que la aplicación de la terapia fotodinámica en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades está aumentando rápidamente, también hay una mayor demanda de nuevas formulaciones de fotosensibilizador. Estas nuevas formulaciones de fotosensibilizador necesitan ser más estables, fáciles de fabricar y de manejar. Además, especialmente los fotosensibilizadores no polares más hidrofóbicos, deberían ser capaces de focalizar al tejido diana de una manera eficiente y selectiva.

US6,074,666 describe formulaciones liposomales de fotosensibilizador de porfirina, que comprenden uno o más fosfolípidos junto con un disacárido o polisacárido. No se prefieren monosacáridos.

Objetivos y breve resumen de la invención

Es un objeto de realizaciones de la presente invención proporcionar una formulación de fotosensibilizador mejorado para su uso en terapia fotodinámica (TFD).

Es otro objeto incorporar fotosensibilizadores no polares en una membrana liposomal permitiendo así que las sustancias no polares y polares sean transportadas utilizando el mismo vehículo.

Es un objeto adicional preservar la estructura y el tamaño de las construcciones liposomales con fotosensibilizador no polar incorporado durante los procesos de liofilización mediante la adición de monosacáridos o polialcoholes como crioprotectores.

Es todavía otro objeto proporcionar una formulación de fotosensibilizador con propiedades farmacocinéticas mejoradas.

Es todavía otro objeto mejorar el transporte de fotosensibilizadores no polares a través de la membrana celular y por lo tanto el aumento de la eficacia de la TFD.

La presente invención proporciona una formulación farmacéutica liposomal liofilizada para terapia fotodinámica que comprende una bicapa liposomal, que consiste substancialmente en fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en dipalmitoil fosfatidil colina, dipalmitoil fosfatidil glicerol y combinaciones de estos materiales; un polialcohol o un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en glucosa y fructuosa; y una cantidad terapéuticamente eficaz de fotosensibilizador no polar seleccionado de dihidro- y tetrahidroporfirinas.

La presente invención implica una formulación liposomal farmacéutica para terapia fotodinámica que comprende un fotosensibilizador de porfirina no polar y uno o más fosfolípidos, que son estables en almacenamiento sin requerir liofilización. La formulación liposomal proporciona cantidades terapéuticamente eficaces del fotosensibilizador para la administración intravenosa. Los liposomas formados contienen el fotosensibilizador no polar dentro de la membrana y son útiles para la focalización combinada de un fotosensibilizador no polar y una segunda sustancia polar. Cuando una formulación incluye la presencia de monosacáridos o polialcoholes, puede ser eficientemente liofilizada preservando el tamaño de los vehículos liposomales y el contenido de una cantidad terapéuticamente eficaz del agente fotosensibilizante. La invención también se refiere a la composición de liposomas formados después de la reconstitución con un vehículo acuoso. La formulación liofilizada tras la reconstitución con un vehículo acuoso adecuado forma liposomas que son también útiles para la administración intravenosa.

Las realizaciones preferidas se describirán ahora a modo de ejemplo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 es una curva de filtración en gel de una formulación liposomal de mTHPC. Tanto los componentes lipídicos y la mTHPC muestran la misma distribución en todas las fracciones recogidas.

Figura 2 muestra la medición de fluorescencia inducida por luz (FIL) de tumores Colo 26 con la piel intacta, nu/nu ratones suizos 0,5 mg /kg, con inyección intravenosa de mTHPC, producto A y B dando la acumulación en el tumor como función del tiempo de post-inyección.

Figura 3 muestra el efecto de la TFD 6 h después de la inyección intravenosa de los productos A, B y mTHPC. Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal (i.p.) (0.25 ml) con azul de Evans (1%) inmediatamente después del tratamiento con TFD y se sacrificaron después de 24 h.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Una formulación liposomal farmacéutica para terapia fotodinámica que comprende un fotosensibilizador de porfirina no polar y uno o más fosfolípidos, que son estables en almacenamiento se describe a continuación. La formulación liposomal proporciona cantidades terapéuticamente eficaces de fotosensibilizador para la administración intravenosa. Los liposomas formados contienen el fotosensibilizador no polar dentro de la membrana y son útiles para la focalización combinada de un fotosensibilizador no polar y una segunda sustancia polar. También se describe la formulación que es estable en almacenamiento sin necesidad de liofilización.

La formulación se puede conservar por un procedimiento de liofilización utilizando un monosacárido o polialcohol, pero no tiene por qué serlo para tener una vida útil razonablemente estable. El ciclo de proceso conserva el tamaño del vehículo liposomal, así como el contenido en la membrana del compuesto fotosensibilizante.

Los fotosensibilizadores no polares en esta invención incluyen los compuestos conocidos a base de porfirina. En particular, los fotosensibilizadores que se emplean ventajosamente en la práctica de esta invención, están basados en fotosensibilizadores de macrociclo de porfirina, que incluyen deuteroporfirina, etioporfirina, protoporfirina, hematoporfirina, feoforbido y derivados de los mismos, especialmente di- y tetra-hidroporfirinas, que tienen máximos de absorción de luz en el intervalo de 640-780 nanómetros.

Los liposomas formados contienen el fotosensibilizador no polar dentro de la membrana y son útiles para la focalización combinada de un fotosensibilizador no polar y una segunda sustancia polar.

Las formulaciones fotosensibilizantes son útiles para orientar la molécula de fotosensibilizador no polar a las células o tejidos no deseados u otros materiales indeseables y, después de la irradiación con una fuente de luz apropiada, a dañar el objetivo. Las formulaciones fotosensibilizantes son también útiles para controlar las células o tejidos no deseados u otros materiales no deseados mediante el uso de métodos de formación de imágenes por fluorescencia con o sin activación fotoquímica limitada del fotosensibilizador.

Especialmente la formulación liposomal de la invención es útil para el transporte de fotosensibilizadores no polares. Las sustancias no polares están integradas dentro de la membrana de los vehículos, creando de este modo una estructura que se abre más fácilmente, liberando el fotosensibilizador para una acción directamente a la membrana celular. Este mecanismo entrega el fotosensibilizador directamente al sistema de membrana celular, un lugar preferido de acción. Así, el fotosensibilizador, siendo activado eficazmente mediante la iluminación con una fuente de luz externa adecuada, puede dañar irreversiblemente las células no deseadas, tejidos y otras estructuras.

Convencionalmente las formulaciones de liposomas construidas son utilizadas para el transporte de varios compuestos atrapados en la parte luminal del vehículo. La invención se centra en la combinación de dos compartimentos de transporte diferentes dentro de un liposoma permitiendo un transporte combinado de sustancias no polares y polares. De esta manera, mediante el fotosensibilizador residiendo dentro de la membrana, los agentes fotosensibilizantes se dirigen efectivamente a su lugar de acción, pero la parte luminal dentro de la partícula de liposoma se mantiene libre para la inclusión de otras sustancias, incluidos los medicamentos que pueden tener un efecto beneficioso sobre la terapia.

Además, la combinación de monosacáridos como glucosa y el fotosensibilizador unido a fosfolípidos es una excelente herramienta para preservar el tamaño de los liposomas durante la liofilización y la rehidratación utilizando un carbohidrato fisiológicamente común en lugar de disacáridos.

5 Este concepto versátil permite la adición de sustancias, que tendrá un efecto beneficioso en el tratamiento. La combinación de dos o más sustancias, junto con un fotosensibilizador unido a la membrana dentro de un vehículo permitirá influir directa o indirectamente en el contenido de oxígeno de las células diana influyendo en la eficacia de la terapia fotodinámica. Por ejemplo, tales efectos pueden lograrse mediante la adición de inhibidores de la actividad de las enzimas, como los inhibidores de la tiorredoxina reductasa de mamífero (TrxR). Por lo tanto, eficaz sólo
10 después de alcanzar el citoplasma de las células diana, el inhibidor bloqueará la vía de Trx/TrxR que normalmente actúa como un antioxidante.

Ejemplo 1

15 Preparación de liposomas conteniendo m-THPC

mTHPC (Temoporfina) se sintetizó como se describe en las Patentes Nos. 4,992,257 y 5,162,519.

Se divulgan liposomas preparados de acuerdo con el siguiente procedimiento general:

20 El fotosensibilizador no polar, el palmitato ascórbico y los fosfolípidos se disuelven en cloroformo/metanol. La solución luego se seca bajo vacío usando un evaporador rotatorio hasta que la mezcla cloroformo/metanol no es más detectable por cromatografía de gases. Se añade agua para inyección para rehidratar la película lipídica a una temperatura de 50°C durante al menos 2 horas. La mezcla luego se pasa a través de un sistema de filtro homogeneizador usando un tamaño de poro final de 100 nanómetros. Opcionalmente, el agua de rehidratación se suplementa con monosacáridos o polialcoholes. El filtrado se recoge, se envasa en viales y, opcionalmente, se
25 liofiliza. La composición liofilizada se reconstituye con agua para inyección antes de la administración.

Usando el procedimiento anterior, varias preparaciones diferentes de la formulación liposomal se prepararon como sigue:

Ejemplo 1a (Referencia)

| Ingrediente | Cantidad % p/v |
|--|---|
| mTHPC | 0.05 a 0.15 |
| Dipalmitoil fosfatidil colina | 0.5 a 2.0 |
| Dipalmitoil fosfatidil glicerol | 0.05 a 0.2 |
| 35 Diestearoil fosfatidil etanolamina pegilada | 0.05 a 0.2 |
| Palmitato ascórbico | 0.002 a 0.004 |
| Agua para inyección | según sea necesario para lograr las concentraciones |
| deseadas encima | |

Ejemplo 1b (Referencia)

| Ingrediente | Cantidad % p/v |
|------------------------------------|--|
| mTHPC | 0.05 a 0.15 |
| Dipalmitoil fosfatidil colina | 0.5 a 2.0 |
| 45 Dipalmitoil fosfatidil glicerol | 0.05 a 0.2 |
| Palmitato ascórbico | 0.002 a 0.004 |
| Agua para inyección | según sea necesario para lograr las concentraciones deseadas |
| encima | |

Ejemplo 1c

| Ingrediente | Cantidad % p/v |
|------------------------------------|--|
| mTHPC | 0.05 a 0.15 |
| Dipalmitoil fosfatidil colina | 0.5 a 2.0 |
| 55 Dipalmitoil fosfatidil glicerol | 0.05 a 0.2 |
| Glucosa | 2.0 a 12.0 |
| Palmitato ascórbico | 0.002 a 0.004 |
| Agua para inyección | según sea necesario para lograr las concentraciones deseadas |
| 60 encima | |

Se encontraron que todas funcionan bien en su uso de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 2

Estabilidad física y química de los liposomas m-THPC

- 5 La estabilidad física de las formulaciones liposómicas se midió monitoreando la distribución del tamaño de partícula mediante espectroscopía de correlación de fotones.

Estabilidad de mTHPC liposomal

| 10 | Condiciones de almacenamiento | Distribución del tamaño promedio de partícula (nm) |
|----|-------------------------------|--|
| | Inicial | 166 |
| | 23°C - 1 Mes | 177 |
| | 23°C - 4 Meses | 167 |

15 *Ejemplo 3*

Localización de mTHPC dentro de la bicapa liposomal de la formulación

- 20 La filtración en gel de la formulación liposomal se realiza en columnas Sephadex G50. Como se muestra en la Figura 1, lípidos y mTHPC muestran la misma distribución sobre todas las fracciones indicando una interacción física de ambos componentes es decir, la integración de mTHPC en la bicapa de la membrana. La distribución no cambia notablemente después de la destrucción de la estructura liposomal por ultrasonificación, como se muestra en las Tablas 1 y 2.

25 *Ejemplo 4*

Propiedades farmacocinéticas en ratones

- 30 Se utilizó Colo 26, una línea celular tumoral colorrectal de ratón sin metástasis, singénico a ratones Balb/c. Las células se mantuvieron como un cultivo monocapa en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 completado con suero de ternero fetal inactivado por calor al 10%, 1% de penicilina estreptomina y 200 mM de L-glutamina, a 37°C en 95% de aire y 5% de CO₂. Ratones hembra de seis semanas atímicos (Suizos, nu/nu) se inocularon por vía subcutánea en la pata trasera derecha con 2×10^6 células Colo 26. Dos semanas más tarde, cuando el tumor alcanzó un diámetro de 5-7 mm, las formulaciones de m-THPC (0,5 mg/kg) fueron inyectados por vía intravenosa.

- 35 Se han realizado mediciones de FIL no invasivas en tres sitios distintos: tumor con piel suprayacente, tejidos normales simétricos con piel suprayacente en la pata trasera izquierda y piel elevada a diferentes tiempos después de la administración del fármaco. En puntos de tiempo seleccionados los ratones fueron sacrificados y las señales de fluorescencia de los tejidos tumorales y normales se midieron en contacto directo.

- 40 La Figura 2 muestra la acumulación de mTHPC, el producto A y B en el tumor como una función del tiempo post-inyección medido en cuatro ratones. Las mediciones no invasivas demostraron la tendencia para la mejor acumulación de mTHPC en el tumor en comparación con los tejidos normales con una mejor relación (1,3) a las 24 h. Las mediciones invasivas realizadas en contacto directo con el tumor y el músculo a las 24 h y 48 h después de la inyección dieron las proporciones de 2,7 y 3,0 respectivamente.

- 45 Las mediciones para el producto A se han hecho en un ratón a las 0,5 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, y 72 h post-dosis. El producto A ha demostrado un comportamiento farmacocinético similar a la mTHPC. En comparación con la mTHPC, la intensidad de fluorescencia más alta en el tejido tumoral ya se alcanzó 4 horas después de la inyección.

- 50 Las mediciones para el producto B se han realizado en un ratón a las 0,5 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, y 72 h post-dosis. La mayor intensidad de fluorescencia en el tumor se midió 8 horas después de la inyección i.v. En comparación con la mTHPC, el producto B muestra propiedades farmacocinéticas completamente diferentes. La concentración del producto B se incrementó en el tumor mucho más rápido (16 h) que la mTHPC.

Ejemplo 5

55 Actividad antitumoral de m-THPC liposomal

- 60 Se utilizó Colo 26, una línea celular tumoral colorrectal de ratón sin metástasis, singénico a ratones Balb/c. Las células se mantuvieron como un cultivo monocapa en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 completado con suero de ternero fetal inactivado por calor al 10%, 1% de penicilina estreptomina y 200 mM de L-glutamina, a 37°C en 95% de aire y 5% de CO₂. Ratones hembra de seis semanas atímicos (Suizos, nu/nu) se inocularon por vía subcutánea en la pata trasera derecha con 2×10^6 células Colo 26. Dos a tres semanas más tarde, cuando el tumor alcanzó un diámetro de 10-13 mm, las formulaciones de m-THPC (0,5 mg/kg) fueron inyectados por vía intravenosa. A menos que se indique otra cosa, 3 ratones por grupo por producto se utilizaron para cada post-TFD.

a. Tratamiento fotodinámico

Intervalos Luz-Droga (ILD) de 0,5 h, 4 h, 6 h, 72 h fueron utilizados para los productos como mTHPC, el producto A (liposomas y m-THPC) y el producto B (liposomas PEG-ilados y m-THPC). Cada animal fue anestesiado mediante inyección i.m. de ketamina (12,5 mg/ml), luego, fotoirradiados a 652 nm con 10J/cm² a 100 mW/cm² utilizando un láser de luz de diodo.

b. Evaluación del efecto TFD

10 Método morfológico

Para evaluar la necrosis del tejido tumoral después del tratamiento con TFD, se utilizó el método de colorante azul de Evans.

15 Los ratones se inyectaron i.p. (0.25 ml) con azul de Evans (1%) inmediatamente después del tratamiento con TFD. Veinticuatro horas más tarde los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de halotano, los tumores se extirparon y cortaron longitudinalmente. Como se ejemplifica en la Figura 3, se tomaron fotos de los tumores enteros y de los cortes de tumor.

Las áreas necróticas sin teñir fueron considerados como daño tumoral:

- 20
- i. Intervalo luz-droga (ILD) = 0.5h, no se observó necrosis independientemente de los productos utilizados.
 - 25 ii. Intervalo luz-droga (ILD) = 4h. Tres ratones tratados con mTHPC-TFD demostraron necrosis tumoral parcial. Dos ratones tratados con el producto A dieron necrosis parcial del tumor, mientras que el tumor del tercer ratón permaneció intacto. Tres ratones tratados con el producto B-TFD demostraron necrosis tumoral: en dos ratones se observó una clara necrosis tumoral, mientras que en un ratón la necrosis del tumor fue parcial.
 - 30 iii. Intervalo luz-droga (ILD) = 6h; seis ratones fueron utilizados para el producto A. Se observó una clara necrosis en los tumores de dos de los ratones tratados con producto A y otros cuatro estaban intactos. Para el producto B, en todos los ratones se observó una clara necrosis tumoral. Dos tumores tratados con mTHPC-TFD demostraron clara necrosis, un tumor estaba libre de necrosis. Los tumores mTHPC-TFD que mostraron necrosis fueron confirmados por observaciones oculares

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación liposomal farmacéutica liofilizada para terapia fotodinámica que comprende una bicapa liposomal, que consiste substancialmente en fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en dipalmitoil fosfatidil colina, dipalmitoil fosfatidil glicerol y combinaciones de estos materiales; un polialcohol o un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en glucosa y fructuosa; y una cantidad terapéuticamente eficaz de fotosensibilizador no polar seleccionado de dihidro- y tetrahidroporfirinas.
- 10 2. Una formulación liposomal según la reivindicación 1, la cual consiste en dipalmitoil fosfatidil colina y dipalmitoil fosfatidil glicerol en cantidades de 0,5- 2,0 y 0,05- 0,2 % p/v, respectivamente, y cantidades de temoporfina, glucosa y palmitato ascórbico en cantidades de 0,05 – 0,15, 2,0-12,0, y 0,002 – 0,004 % p/v, respectivamente, y agua para inyección tal como se requiere para alcanzar las concentraciones deseables.
- 15 3. Una formulación liposomal según la reivindicación 1, donde el fotosensibilizador no polar es Temoporfina.
4. Una formulación liposomal según la reivindicación 1, donde la relación de peso entre el fosfolípido y el monosacárido es entre 1:2 y 1:12.
- 20 5. Una formulación liposomal según la reivindicación 1, donde la concentración terapéuticamente eficaz del fotosensibilizador es desde 0,0001 a 0,15 por ciento p/v.
6. Una formulación liposomal según la reivindicación 1, reconstituida con un fluido acuoso para administración farmacéutica.
- 25 7. Una formulación liposomal según la reivindicación 1, que comprende además un componente seleccionado del grupo que consiste en hidroxitolueno butilado, palmitato ascórbico y combinaciones de estos dos.

FIGURA 1

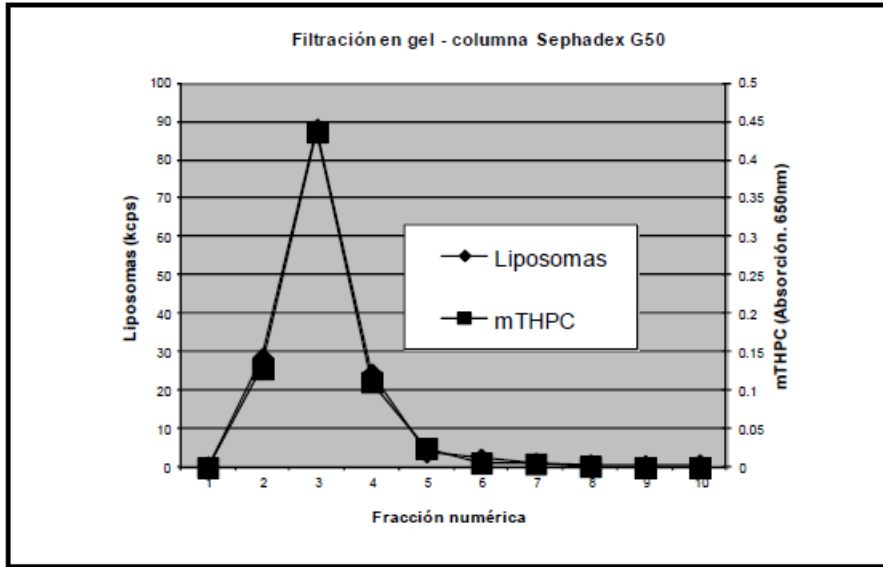


FIGURA 2

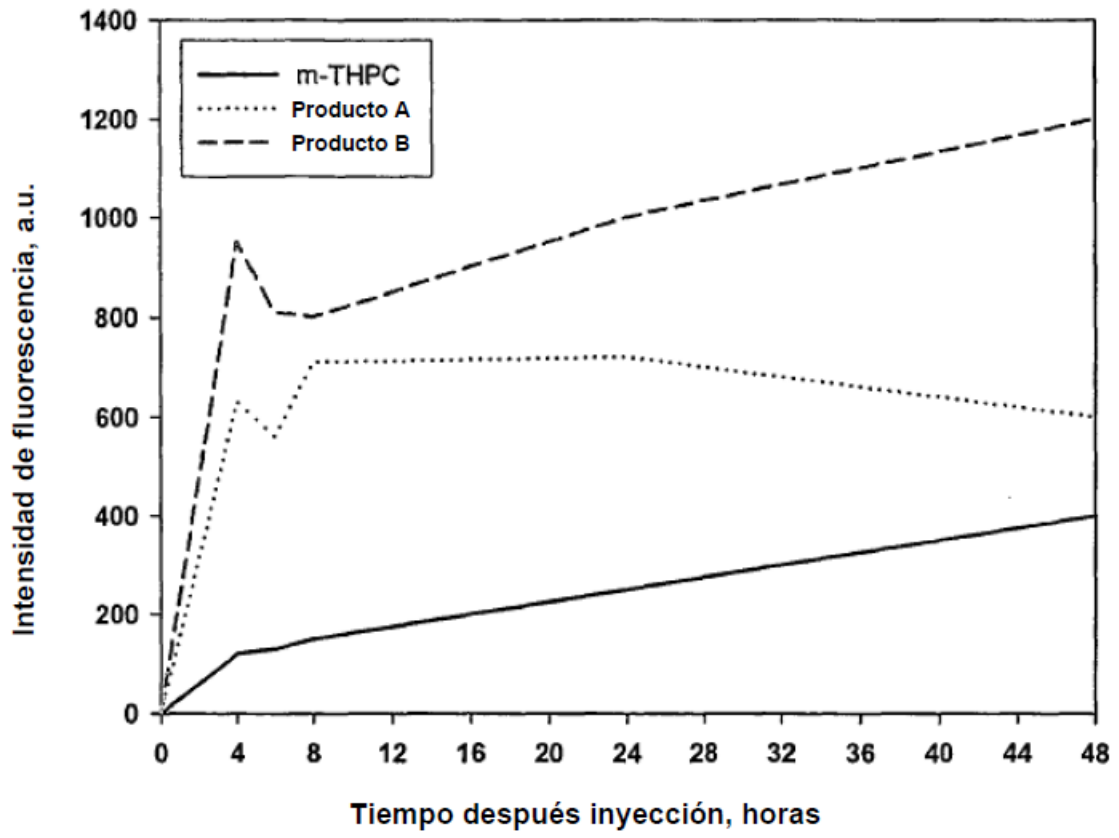
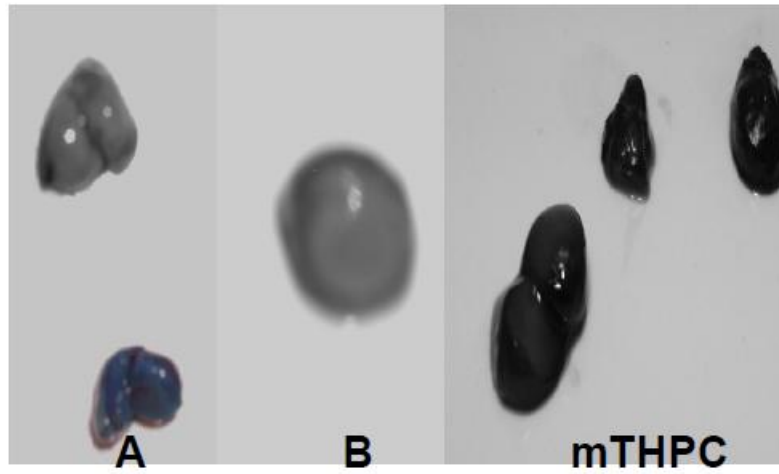


FIGURA 3



| | Absorción | Volumen (μl) | A x Volumen |
|--------------------------|-----------|--------------|------------------------|
| Fracción1 | 0,0000 | 175 | 0,0000 |
| Fracción2 | 0,1285 | 175 | 22,4875 |
| Fracción3 | 0,4367 | 175 | 76,4225 ¹⁰ |
| Fracción4 | 0,1111 | 175 | 19,4425 |
| Fracción5 | 0,0251 | 175 | 4,3925 |
| Fracción6 | 0,0058 | 175 | 1,0150 ¹⁵ |
| Fracción7 | 0,0050 | 175 | 0,8750 |
| Fracción8 | 0,0015 | 175 | 0,2625 |
| Fracción9 | 0,0000 | 175 | 0,0000 ²⁰ |
| Fracción10 | 0,0000 | 175 | 0,0000 |
| Fraciones totales | 0,7137 | 175 | 124,8975 |
| Probe | 0,6278 | 200 | 125,5600 ²⁵ |
| Tasa de recuperación (%) | | | 99,4724 |

Tabla 1: Tasa de recuperación de mTHPC después de filtración por gel G50

| | kcps | Volumen (μl) | kcps x Volumen |
|--------------------------|--------|--------------|----------------|
| Fracción1 | 0,30 | 175 | 52,50 |
| Fracción2 | 28,50 | 175 | 4987,50 |
| Fracción3 | 88,10 | 175 | 15417,50 |
| Fracción4 | 24,40 | 175 | 4270,00 |
| Fracción5 | 4,10 | 175 | 717,50 |
| Fracción6 | 2,30 | 175 | 402,50 |
| Fracción7 | 1,20 | 175 | 210,00 |
| Fracción8 | 0,80 | 175 | 140,00 |
| Fracción9 | 0,60 | 175 | 105,00 |
| Fracción10 | 0,80 | 175 | 140,00 |
| Fraciones totales | 151,10 | 175 | 26442,50 |
| Probe | 121,90 | 200 | 24380,00 |
| Tasa de recuperación (%) | | | 108,46 |

Tabla 2: Tasa de recuperación de lípidos después de de filtración por gel G50