

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 565**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2010 E 10772956 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2490671**

54 Título: **Liposomas hidrolizables por SPLA2 con mejor estabilidad de almacenamiento**

30 Prioridad:

23.10.2009 DK 200901150

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

06.06.2014

73 Titular/es:

**BIO-BEDST APS (100.0%)
Dandyvej 19
7100 Vejle, DK**

72 Inventor/es:

**MADSEN, MOGENS WINKEL;
PETERSEN, SUNE ALLAN y
VIKBJERG, ANDERS FALK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 465 565 T3

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

DESCRIPCIÓN

Liposomas hidrolizables por SPLA2 con mejor estabilidad de almacenamiento

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a sistemas de administración de fármacos con liposomas hidrolizables por sPLA2 con mejor estabilidad de almacenamiento, en particular mejor estabilidad de almacenamiento a 2-8 grados Celsius.

10 **Antecedentes**

Liposomas para administración de fármacos

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

20 Los liposomas tienen tres compartimentos distintos que se pueden usar para transportar diversos compuestos tales como fármacos: el compartimento acuoso interior; la bicapa hidrofóbica; y la interfase polar de la laminilla interna y externa. Dependiendo de la naturaleza química del compuesto a encapsular, se localizarán en cualquiera de los compartimentos.

25 En la actualidad, existen varias formulaciones farmacológicas de liposoma parenterales disponibles en el mercado. Los fármacos solubles en agua tienden a estar localizados en el compartimento acuoso de los liposomas, y ejemplos de fármacos encapsulados en liposomas son, por ejemplo, doxorubicina (Doxil), doxorubicina (Myocet) y daunorubicina (DaunoXone). Ejemplos de fármacos intercalados en la membrana de los liposomas son, por ejemplo, anfotericina B (AmBisome), anfotericina (Albelcet B), benzoporfirina (Visudyne) y muramil tripéptido fosfatidiletanolamina (Junovan).

30 Los liposomas se consideran un sistema de administración de fármaco prometedor ya que de manera pasiva se dirigen al tejido tumoral diana mediante el uso de las características fisiopatológicas de tumores sólidos tales como hiperplasia y aumento de la permeabilidad vascular aunque también un defecto en el drenaje linfático. Estas características facilitan la extravasación de las nanopartículas y los liposomas que se pueden retener en el tejido durante un período de tiempo más largo debido a la mayor permeabilidad y al efecto de retención (EPR).

35 La propiedad de los liposomas como vehículos de administración de fármacos depende de manera crucial de su carga superficial, permeabilidad, solubilidad, estabilidad, etc., que se ve influenciado significativamente por los lípidos comprendidos en la composición de liposomas. Además, el fármaco a encapsular en el liposoma puede necesitar otros requisitos a tener en cuenta en la preparación de una formulación de liposomas estables.

40 Consideraciones con respecto a seguridad y eficacia de los fármacos requieren que las formulaciones de liposomas mantengan sus propiedades, es decir, que permanezcan estables, desde el momento de la preparación hasta la administración.

45 Además, es deseable que dichas formulaciones estén intactas durante el transporte en el sujeto tratado hasta que alcancen el sitio diana en el que el fármaco se libera específicamente.

Se han descrito diversas estrategias de dirección para liposomas, por ejemplo, conjugación a ligandos específicos de células tales como anticuerpos.

50 **Liposomas hidrolizables por sPLA2**

55 Se ha sugerido otro enfoque basado en los niveles elevados de fosfolipasa A2 secretora (sPLA2) en tejido canceroso y también en sitios de inflamación. La idea básica es que se pueden preparar liposomas que son hidrolizables por sPLA2 y que la hidrólisis por la sPLA2 conduce a la liberación del fármaco encapsulado dentro del liposoma. Por otra parte, los productos de la hidrólisis por sPLA2, un lisolípido y un ácido graso actúan como permeabilizadores de membranas celulares lo que conduce a un aumento de la adsorción celular del fármaco. Dado que los niveles de sPLA2 son elevados en tejidos cancerosos y en sitios de inflamación, los liposomas activados por sPLA2 se pueden usar para administrar fármacos encapsulados preferentemente en dichos sitios.

60 **Estabilidad de almacenamiento de liposomas hidrolizables por sPLA2**

Los liposomas hidrolizables por sPLA2 plantean retos especiales con respecto a la estabilidad de almacenamiento. Estos retos se basan en la composición lipídica en particular necesaria para la hidrólisis de sPLA2.

65

En general, muchos parámetros influyen en la estabilidad de almacenamiento, y es difícil predecir las consecuencias de la alteración de la composición del tampón sobre la estabilidad de almacenamiento, ya que esto afecta no solo a la osmolaridad, sino también la estabilidad de la membrana.

5 Técnica anterior

Un número de documentos han descrito liposomas activados por sPLA2, y diversos documentos han estudiado la estabilidad de almacenamiento de los liposomas. Sin embargo, ninguno de los documentos ha estudiado los problemas de almacenamiento particulares planteados por los liposomas hidrolizables por sPLA2.

10 Andreson et al., Progress in Lipid Research, 44 (1), 2005, 68-97, describen liposomas hidrolizables por SPAL2 que comprenden cisplatino.

15 El documento WO0158910 describió liposomas activados por sPLA2 que comprenden profármacos de mono-éter lisofosfolípidos. Este documento también describió la encapsulación de compuestos bioactivos adicionales.

20 El documento WO0176555 sugirió el uso de un sistema de administración de fármacos basado en lípidos para el tratamiento de enfermedades o afecciones asociadas con un aumento localizado en sPLA2 extracelular en tejido cutáneo o subcutáneo de un mamífero, para la administración de un profármaco de un éter-lisolípidos que se activa por sPLA2. El sistema comprende adicionalmente un, así llamado, compuesto activo marginal.

25 El documento WO0176556 sugirió el uso de un sistema de administración de fármacos basado en lípidos para el tratamiento o la prevención de una infección parasitaria seleccionada entre Leishmaniasis, Tripanosomiasis, malaria, Entamoeba, Histolitacisis y "Trematodo hepático oriental chlomorchis sinensis", en el que el sistema comprendía profármacos en forma de derivados de lípidos que se activan por sPLA2. Los liposomas pueden contener un compuesto bioactivo adicional.

El documento WO06048017 y el documento WO07107161 también describen liposomas activados por sPLA2.

30 El documento US5094854 desveló liposomas sensibles a la temperatura optimizados con respecto a la estabilidad y a la liberación por calentamiento. Los liposomas que se describen en el presente documento tienen preferentemente una solución interior con una presión osmótica de 1,2 a 2,5 veces mayor que la de los fluidos corporales de animales de sangre caliente y tienen una temperatura de transición de fase de 40-45 grados Celsius. Los liposomas que se desvelan en el presente documento no son sustratos de sPLA2, porque no tienen la composición de lípidos apropiada.

35 La mayoría de las formulaciones de liposomas no tienen problemas de fugas durante el almacenamiento. Más bien, las formulaciones son tan estables que es difícil obtener una liberación de compuestos encapsulados en los sitios pretendidos.

40 Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende

- 45
- un liposoma hidrolizable por sPLA2,
 - una solución exterior,
 - y una solución interior dentro del liposoma,
 -
- 50 - en la que la concentración de osmolitos es mayor en la solución interior que en la solución exterior.

La composición mejora la estabilidad de almacenamiento de liposomas hidrolizables por sPLA2, en particular cuando se almacenan a 2-8 grados Celsius. El liposoma encapsula cisplatino preferentemente.

55 La invención también proporciona métodos de preparación de la composición de la invención.

Breve descripción de las figuras

60 Figura 1. Representación del contorno que ilustra la influencia de la concentración de sacarosa y la presión de homogeneización usada durante la preparación de liposomas en el tamaño de partícula. Los números dentro de la representación del contorno indican el tamaño de partícula.

65 Figura 2. Concentraciones totales de Pt en liposomas como una función del tamaño de partícula.

Figura 3.
Cambio del tamaño de partícula durante el almacenamiento a 2-8 °C para LPB0057-LPB0073.

5 Figura 4.
Cambió en PDI durante el almacenamiento a 2-8 °C para LPB0057-LPB0073.

10 Figura 5.
Representación del contorno que ilustra la influencia de la concentración interior de NaCl y de la presión de homogenización usada durante la preparación de liposomas sobre un % inicial de DOE. Los números dentro de la representación del contorno indican el % de DOE.

15 Figura 6.
Concentración de Pt durante el almacenamiento para LPB0057-LPB0073.

20 Figura 7.
(%) exterior de Pt durante el almacenamiento para LPB0057-LPB0073.

25 Figura 8.
Pérdida de LPB0057-LP80073 durante el almacenamiento a 2-8 °C.

30 Figura 9.
Representación del contorno que ilustra la influencia de la concentración interior de NaCl y la concentración de sacarosa en el % de DOE después de 56 días de almacenamiento 2-8 °C con la presión de homogenización mantenida a 12.500 KPa. Los números dentro de la representación del contorno indican el % de DOE después de 56 días de almacenamiento 2-8 °C.

35 Figura 10.
Representación del contorno que ilustra la influencia de la concentración interior de NaCl y la concentración de sacarosa en el % de pérdida después de 56 días de almacenamiento 2-8 °C con la presión de homogenización mantenida a 12.500 KPa. Los números dentro de la representación del contorno indican el % de pérdida después de 56 días de almacenamiento 2-8 °C.

40 Figura 11.
Pérdida de la formulación liposomal de cisplatino durante el almacenamiento a 2-8 °C. Las formulaciones se prepararon con gradiente osmótico variable. Para detalles adicionales consultar la tabla 3.

45 Figura 12.
Tamaño de partícula de formulaciones liposomales de cisplatino durante el almacenamiento a 2-8 °C. Para una descripción detallada sobre la composición de tampón consultar la tabla 3.

50 Figura 13.
Tabla 1 que muestra ajustes experimentales reales de factores y las respuestas.

55 Figura 14.
Tabla 2 que muestra valores de coeficientes de regresión y significancia (P) del modelo después de eliminación inversa.

60 Figura 15.
Tabla 3 que muestra una visión de conjunto de formulaciones liposomales de cisplatino preparadas con gradiente osmótico variable.

65 Figura 16.
Tabla 4 que muestra una visión de conjunto de diferentes formulaciones liposomales de fármacos preparadas con peso molecular variable.

Divulgación de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que las pérdidas de liposomas hidrolizables por sPLA2 se pueden reducir por el almacenamiento en una solución exterior que tiene una menor concentración de osmolitos que la solución interior del liposoma.

El problema de las pérdidas se observó en relación con el almacenamiento de cisplatino encapsulado en liposomas hidrolizables por sPLA2 a usar en un estudio de fase 1 de una formulación iso-osmótica de cisplatino encapsulado en liposomas hidrolizables por sPLA2. En esta formulación, la solución interior era de NaCl al 0,9 % y la solución exterior era de tampón de fosfato 10 mM a pH 6,5, NaCl 1 mM y sacarosa al 10 %. Debido a un alto grado de pérdidas cuando se almacena a 2-8 grados Celsius, la formulación iso-osmótica se tuvo que almacenar a menos 80

grados Celsius, que no es una solución óptima para un producto comercial. Por lo tanto, no todos los hospitales cuentan con instalaciones para el almacenamiento a menos 80 grados. Por otra parte, el transporte a menos 80 grados Celsius es difícil.

5 Además, cuando se descongelan los viales antes de su uso, se encontraron problemas de rotura de los viales y la descongelación causó pérdidas significativas de los liposomas.

10 Tal como se ha mencionado, se cree que el problema de pérdidas es una consecuencia de los requisitos específicos con respecto a la composición lipídica de los liposomas hidrolizables por sPLA2. En particular, se cree que la pérdida está causada por la ausencia de o por bajas cantidades de agentes de estabilización tales como colesterol en liposomas hidrolizables por sPLA2. Por otra parte, la naturaleza aniónica de los liposomas hidrolizables por sPLA2 puede influir en las pérdidas.

15 Por lo tanto, hay una necesidad de una composición que comprenda hidrolizables liposomas por sPLA2 con pérdida reducida cuando se almacena a 2-8 grados Celsius.

20 Las expresiones "pérdida reducida" y "estabilidad mejorada" con respecto a los liposomas spa2 se usan indistintamente en el presente documento. Tal como se comprenderá, la pérdida está relacionada con y se puede describir mediante cambios en la concentración (o cantidad) de un agente terapéutico en la solución interior, preferentemente con el tiempo.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende

- 25 • un liposoma hidrolizable por sPLA2, que comprende cisplatino encapsulado dentro del liposoma
 - una solución exterior,
 - una solución exterior,
 - y una solución dentro del liposoma,
- 30 - en la que la concentración de osmolitos en la solución interior es 200 mM mayor que la concentración de osmolitos en la solución exterior.

La composición será normalmente una composición farmacéutica.

35 En una realización preferente, el liposoma comprende un agente terapéutico encapsulado dentro del liposoma. El agente terapéutico se disuelve por lo general en la solución interior. Sin embargo, el agente terapéutico también puede precipitar parcial o totalmente, por ejemplo, debido a la solubilidad reducida durante el almacenamiento en comparación con la solubilidad durante la encapsulación. La solubilidad durante la encapsulación puede ser más elevada debido a una temperatura más elevada.

40 Es preferente que el agente terapéutico tenga un peso molecular de menos de 350 g/mol, ya que el problema de las pérdidas se produce por lo general para agentes más pequeños y se cree que los agentes más pequeños pueden atravesar más fácilmente la bicapa lipídica del liposoma.

45 Es incluso más preferente que el agente terapéutico sea cisplatino (cis-diaminodicloroplatino (II)). Tal como se ha mencionado anteriormente, los liposomas hidrolizables por sPLA2 que encapsulan cisplatino tienden a tener pérdidas durante el almacenamiento.

50 En una realización preferente, el único agente terapéutico en el liposoma hidrolizable por sPLA2 es cisplatino. Por lo tanto, la solución interior solo comprende osmolitos y cisplatino y opcionalmente un tampón.

55 Los iones cloruro evitan que el cisplatino forme un producto de hidratación altamente tóxico no deseado. Por lo tanto, es preferente que la solución interior comprenda NaCl o KCl en una concentración de al menos un 0,2 % o un 0,4 %, más preferentemente un 0,2-2,5 % en p/p, o un 0,4-1,8 % y lo más preferentemente entre un 0,8-1 %. En algunas realizaciones, se pueden usar otras sales de cloruro. Normalmente, se prefiere NaCl sobre KCl.

60 En algunas realizaciones, es preferente que la solución exterior comprenda NaCl o KCl en una concentración de al menos un 0,2 % o un 0,4 %, más preferentemente un 0,2-2,5 % en p/p, o un 0,4-1,8 % y lo más preferentemente entre un 0,8-1 %. La concentración habitual es de un 0,9 %. Por lo tanto, si cantidades menores de cisplatino se pierden fuera del liposoma, la presencia de iones cloruro minimizará la formación de productos de hidratación tóxicos. Una vez más, normalmente se prefiere NaCl sobre KCl.

En una realización, no hay cationes divalentes, tales como iones de Calcio, en la solución exterior.

En otra realización, los cationes divalentes se pueden incluir en la solución exterior.

65

La solución interior por lo general no incluye un tampón. Por otra parte, los sulfatos no se incluyen normalmente en la solución interior.

En una realización de la composición, la solución interior comprende al menos un 1,4 % de NaCl o KCl y más preferentemente un 1,8 % de NaCl o KCl y no comprende un potenciador de la viscosidad, seleccionado preferentemente entre el grupo que consiste en azúcares tales como lactosa, sacarosa, maltosa, galactosa, glucosa y polímeros hidrofílicos tales como almidón, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil-pirrolidona, dextrina, xantano y oligómeros de celulosa parcialmente hidrolizados y proteínas y polipéptidos.

En otra realización de la composición, la solución interior comprende al menos un 5 % de un potenciador de la viscosidad. Preferentemente, el potenciador de la viscosidad se selecciona entre el grupo que consiste en azúcares tales como lactosa, sacarosa, maltosa, galactosa, glucosa y polímeros hidrofílicos, tales como almidón, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil-pirrolidona, dextrina, xantano y oligómeros de celulosa parcialmente hidrolizados y proteínas y polipéptidos. Se debería reconocer que los potenciadores de la viscosidad también funcionarán como osmolitos.

Cuando la solución interior comprende un potenciador de la viscosidad, es preferente que la concentración sea superior a un 5 % en p/p. Es incluso más preferente una concentración superior a un 6, 7, 8, 9 o 10 %. En una realización preferente, el potenciador de la viscosidad se selecciona entre el grupo que consiste en azúcares tales como lactosa, sacarosa, maltosa, galactosa, glucosa y polímeros hidrofílicos, tales como almidón, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil-pirrolidona, dextrina, xantano y oligómeros de celulosa parcialmente hidrolizados y proteínas y polipéptidos. Los más preferentes son azúcares, en particular sacarosa.

En general, es preferente que la solución exterior tenga una concentración de osmolitos de aproximadamente 300 mM, ya que esta es la concentración fisiológica de los osmolitos. Por lo tanto, en una realización, es preferente que la solución exterior tenga una concentración de osmolitos entre 200 y 400 mM, más preferentemente entre 250-350 mM y lo más preferente entre 275 y 325 mM.

La composición se caracteriza por que hay una diferencia en la concentración de osmolitos entre la solución interior y la solución exterior. En el presente documento, la diferencia también se denomina gradiente osmótico.

Tal como se demuestra en la sección de ejemplos, un gradiente osmótico (la concentración exterior de osmolitos se resta de la concentración interior de osmolitos) de 27 mM no puede reducir las pérdidas suficientemente. Un gradiente de 59 mM reduce la pérdida adicionalmente tal como también lo hace un gradiente de 91 mM. Se debería indicar que la concentración de osmolitos es la concentración total de todas las partículas de soluto, que a menudo se denomina osmolaridad (Osm) de una solución.

En una realización, la osmolaridad de las soluciones se corrige usando los coeficientes osmóticos de las partículas de soluto.

Es preferente que el gradiente osmótico fuera mayor de 27 mM. Es más preferente un gradiente osmótico mayor de 59 mM o mayor de 91 mM. Es aún más preferente mayor de 100 mM, tal como mayor de 150 mM, mayor de 200 mM, mayor de 250 mM, mayor de 275 mM y mayor de 300 mM.

En una realización, se supone que la concentración de osmolitos en la solución interior es la misma que la concentración de los osmolitos en el disolvente de hidratación usado en la preparación de los liposomas. Es decir; cuando se hace referencia a la concentración de osmolitos en la solución interior, esta concentración se puede determinar fácilmente ya que es la concentración de osmolitos en el disolvente de hidratación.

La concentración real de osmolitos en la solución interior puede no ser idéntica a la concentración de osmolitos en el disolvente de hidratación, porque el agua se puede mover en el liposoma después de la formación y por lo tanto disminuir la concentración de osmolitos (a la vez que aumenta la presión osmótica dentro del liposoma).

El gradiente osmótico máximo es preferentemente de 1500 mM, más preferentemente 1200 mM y lo más preferentemente 900 mM. Si el gradiente osmótico es demasiado alto, se cree que los liposomas tendrán inicialmente filtraciones, de modo que los osmolitos atravesarán la membrana hasta que se establezca un gradiente máximo tolerable, en el que después de la pérdida estará en un mínimo.

Por lo tanto, el gradiente osmótico está por lo general entre 27 y 900 mM, más preferentemente entre 200 y 600 mM y lo más preferentemente entre 280 y 320 mM.

El pH de la solución exterior es por lo general un pH entre 5 y 7 y la solución interior tiene por lo general un pH entre 5 y 7. Se pueden usar tampones apropiados para mantener el pH en el valor deseado.

Sin embargo, en una realización, la solución interior y/o exterior de la solución no comprende un tampón, preferentemente tampón de fosfato. En algunas realizaciones, los tampones de fosfato son indeseables, porque promueven la conversión de cisplatino en productos secundarios.

Las composiciones preferentes en particular en las que el cisplatino está encapsulado en el liposoma comprenden las siguientes:

5 1) Solución interior: NaCl al 0,8-1,0 %, tal como NaCl al 0,9 % y sacarosa al 9-11 %, tal como sacarosa al 10 %.
Solución exterior: Tampón de fosfato 8-12 mM (pH 6,5), tal como Tampón de fosfato 10 mM (pH 6,5) + sacarosa al 9-11 %, tal como sacarosa al 10 %.

10 2) Solución interior: NaCl al 1,6-2,0 %, tal como al NaCl 1,8 %
Solución exterior: Tampón de fosfato 8-12 mM (pH 6,5), tal como Tampón de fosfato 10 mM (pH 6,5) + sacarosa al 9-11 %, tal como sacarosa al 10 %.

15 3) Solución interior: NaCl al 0,8-1,0 %, tal como NaCl al 0,9 % y sacarosa al 9-11 %, tal como sacarosa al 10 %.
Solución exterior: Tampón de fosfato 8-12 mM (pH 6,5), tal como Tampón de fosfato 10 mM (pH 6,5) + NaCl al 0,35 % - 0,55 % tal como NaCl al 0,45 % + sacarosa al 4-6 %, tal como sacarosa al 5 %.

20 4) Solución interior: NaCl al 1,6-2,0 %, tal como al NaCl 1,8 %
Solución exterior: Tampón de fosfato 8-12 mM (pH 6,5), tal como Tampón de fosfato 10 mM (pH 6,5) + NaCl al 0,8-1,0 %, tal como NaCl al 0,9 %.

La concentración del agente terapéutico en la composición final está por lo general entre 0,1 mg/ml y 15 mg/ml. Cuando el agente terapéutico es cisplatino, es preferente que la concentración esté entre 0,5 mg/ml y 1,5 mg/ml. Dichas concentraciones se pueden conseguir mediante el uso de una concentración de cisplatino de 8 mg/ml en la solución de hidratación durante la preparación de liposomas. Se puede conseguir una concentración de 8 mg/ml por calentamiento de la solución de hidratación a una temperatura de 65 grados Celsius.

Los liposomas de la composición tienen preferentemente un tamaño medio (diámetro) entre 50 y 200 nm, más preferentemente entre 75 y 160 nm.

30 Los liposomas de la composición deberían tener una pérdida menor de un 20 %, un 15 % o un 10 %, más preferentemente menor de un 9 %, un 8 % o un 7 % de filtraciones después de 56 días de almacenamiento a una temperatura entre 2 y 8 grados Celsius. Tal como se demuestra en la sección de ejemplos, esto se puede conseguir mediante el ajuste del gradiente osmótico.

35 Cuando se hace referencia al porcentaje de pérdidas, la referencia es a la cantidad de cisplatino en los liposomas después de una etapa de diálisis o de ultrafiltración en comparación con la cantidad de cisplatino en los liposomas después del almacenamiento. Después de una etapa de diálisis o de ultrafiltración, la solución exterior puede comprender un 5 % de la cantidad total de cisplatino en la composición. Por lo tanto, la solución interna comprende un 95 % del cisplatino en la composición. Después del almacenamiento, la solución interna puede comprender un 85,5 % de la cantidad total de cisplatino y, en consecuencia, la solución exterior un 14,5 %. Entonces, la pérdida ha sido $9,5 / 95 = 10 \%$.

En una realización preferente, la composición del primer aspecto se prepara mediante el método del segundo aspecto.

45 **Liposomas hidrolizables por sPLA2**

Los liposomas hidrolizables por sPLA2 para uso en la composición de la presente invención se definen con más detalle en las siguientes realizaciones. En su realización más amplia, los liposomas hidrolizables por sPLA2 se refieren a liposomas que son hidrolizables en condiciones fisiológicas, en particular en tejido canceroso.

Preferentemente, los liposomas hidrolizables por sPLA2 comprenden entre un 20 % y un 45 % (mol/mol) de un lípido aniónico. El contenido de lípido aniónico afecta a características importantes de los liposomas, tales como la velocidad de hidrólisis de lípidos mediada por sPLA2 del liposoma y también la respuesta inmune hacia el liposoma.

55 A medida que el contenido de lípidos aniónicos aumenta, también lo hace la velocidad de hidrólisis de lípidos por sPLA₂ (y la liberación del fármaco). Se ha demostrado que se puede lograr una velocidad de hidrólisis razonable mediante el contenido de lípido aniónico entre un 20 % y un 45 %. Por lo tanto, en una realización, el contenido de lípido aniónico es de al menos un 20 %. En otra realización, el contenido de lípido aniónico no es superior a un 45 %.
60 Además, en otra realización, el contenido de lípidos aniónicos del liposoma se selecciona entre el grupo que consiste de entre un 20 % y un 45 %, entre un 25 % y un 45 %, entre un 28 % y un 42 %, entre un 30 % y un 40 %, entre un 32 % y un 38 % y entre un 34 % y un 36 %.

75 Tal como se ha mencionado, también la respuesta inmune hacia los liposomas se ve afectada por el contenido de lípido aniónico. Por lo tanto, la velocidad de aclaramiento del liposoma en el organismo se puede reducir manteniendo el contenido del lípido aniónico en el liposoma por debajo de un determinado nivel y los presentes

inventores han reconocido que el contenido de lípido aniónico en el liposoma se puede usar para establecer un equilibrio entre la velocidad de hidrólisis de sPLA₂ y el aclaramiento por el sistema reticuloendotelial.

Preferentemente, el lípido aniónico es un fosfolípido y preferentemente, el fosfolípido se selecciona entre el grupo que consiste de PI (fosfatidil inositol), PS (fosfatidil serina), DPG (bisfosfatidil glicerol), PA (ácido fosfatídico), PEOH (alcohol de fosfatidilo), y PG (fosfatidil glicerol). Más preferentemente, el fosfolípido aniónico es PG. Preferentemente, los lípidos comprenden cadenas de estearoílo. Por lo tanto el PG preferente es DSPG, etc.

Polímeros hidrofílicos

En una realización preferente, el liposoma hidrolizable por sPLA₂ para su uso en la presente invención comprende adicionalmente un polímero hidrofílico seleccionado entre el grupo que consiste de PEG [poli (etilenglicol)], PACM [poli(N-acrilolmorfolina)], PVP [poli(vinilpirrolidona)], PLA [poli(lactida)], PG [poli(glicólido)], POZO [poli(2-metil-2-oxazolona)], PVA [poli(alcohol vinílico)], HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa), PEO [poli(óxido de etileno)], quitosano [poli(D-glucosamina)], PAA [poli(aminoácido)], poli-HEMA [Poli(metacrilato de 2-hidroxietilo)] y co-polímeros de los mismos.

Más preferentemente, el polímero es PEG con un peso molecular entre 100 Da y 10 kDa. Son particularmente preferentes tamaños de PEG de 2-5 kDa (PEG2000 a PEG5000), y lo más preferente es PEG2000.

La inclusión de polímeros en liposomas es bien conocida por el experto en la materia y se puede usar para aumentar la vida media de los liposomas en el torrente sanguíneo, presuntamente mediante la reducción del aclaramiento por el sistema reticuloendotelial.

Preferentemente, el polímero se conjuga con el grupo de cabeza de fosfatidil etanolamina. Otra opción es la conjugación con ceramidas (a pesar de que este lípido no se puede hidrolizar por sPLA₂). Cuando el polímero se conjuga con fosfatidil etanolamina, se introduce una carga negativa y por lo tanto DSPE-PEG se contempla como un lípido aniónico (al contrario de DSPE que se contempla como un lípido neutro).

El lípido conjugado con polímero está presente preferentemente en una cantidad de al menos un 2 %. Más preferentemente, la cantidad es de al menos un 5 % y no superior a un 15 %. Incluso más preferentemente, la cantidad de lípido conjugado con polímero es de al menos un 3 % y no superior a un 6 %. Los liposomas que contienen fosfolípidos aniónicos y $\leq 2,5$ % de DSPE-PEG2000 tienen una mayor tendencia a agregarse en presencia de calcio. Normalmente, esto se puede observar por la formación de gel de alta viscosidad. Los liposomas que contienen fosfolípidos aniónicos y $> 7,5$ % de DSPE-PEG2000 hacen que los liposomas sedimenten o que se separen las fases.

Componentes líquidos con carga neutra en el liposoma

Preferentemente, el liposoma a usar en la presente invención también comprende un fosfolípido no cargado seleccionado entre el grupo que consiste en fosfolípidos zwitteriónicos que comprenden PC (fosfatidil colina) y PE (fosfatidiletanolamina). Lo más preferentemente, el fosfolípido zwitteriónico es PC.

En contraste con el fosfolípido aniónico, el fosfolípido zwitteriónico sirve como un componente líquido hidrolizable por sPLA₂ con carga neutra en el liposoma. Mediante la combinación de fosfolípidos zwitteriónicos y aniónicos en el mismo liposoma, es posible ajustar a una densidad de carga de superficie deseada que cumple tanto con una hidrólisis suficientemente alta por sPLA₂ como con una baja velocidad de aclaramiento en la sangre.

La cantidad de fosfolípidos zwitteriónicos en el liposoma está preferentemente un 40 % y un 75 % y más preferentemente entre un 50 y un 70 %.

Preferentemente, los lípidos (lípidos aniónicos, lípidos neutros y lípidos conjugados con polímeros) comprenden cadenas de estearoílo). Por lo tanto, PG es preferentemente DSPG, PE es preferentemente DSPE, etc.

Éter-fosfolípidos

Algunos o todos los fosfolípidos pueden ser éter-fosfolípidos.

Por lo tanto, estos pueden alojar un enlace éter en lugar de un enlace éster en la posición sn-1 de la cadena principal de glicerol del fosfolípido. Cuando sPLA₂ hidroliza este tipo particular de fosfolípidos, se producen mono-éter liso-fosfolípidos y estos son tóxicos, por ejemplo, para las células cancerosas. Es decir, los éter fosfolípidos se pueden ver como profármacos de mono-éter liso-fosfolípidos y liposomas de la invención se pueden usar para administrar dichos profármacos al entorno mejorado por sPLA₂ de las células cancerosas en las que los profármacos se activan por hidrólisis con sPLA₂. Se han descrito éter-fosfolípidos en el documento EP 1254143 y en el documento WO 2006/048017.

En una realización, los liposomas activados por sPLA₂ tal como se usan en la presente invención no comprenden

éter-fosfolípidos.

Otros profármacos

5 El resto liberado del lípido mediante sPLA₂ para crear un lisolípido también puede ser un fármaco. Por lo tanto, un liposoma puede comprender profármacos de mono-éter lisolípidos, profármacos liberados desde el lípido mediante sPLA₂ y otros agentes terapéuticos, tal como se describe adicionalmente a continuación.

10 En una realización, los liposomas activados por sPLA₂ tal como se usan en la presente invención no comprenden profármacos liberados a partir del lípido mediante sPLA₂.

Agente de estabilizante

15 El liposoma también se puede estabilizar mediante la inclusión de colesterol como componente de membrana en el liposoma. Sin embargo, cantidades elevadas de colesterol en el liposomas tienen un efecto negativo sobre la hidrólisis por PLA₂ y por lo tanto es preferente que el liposoma comprenda no más de un 10 % de colesterol. Incluso más preferentemente, liposoma comprende menos de un 1 % de colesterol, menos de un 0,1 % o no comprende nada de colesterol.

20 La longitud de la cadena de alquilo de los lípidos que comprenden el liposoma se puede ajustar para una velocidad óptima de hidrólisis por PLA₂ y una pérdida mínima del compuesto atrapado fuera del liposoma. Preferentemente, las cadenas de alquilo son cadenas saturadas C18 o C16.

25 Tal como se ha descrito anteriormente, los liposomas pueden comprender profármacos de mono-éter liso-lípidos y/o del resto liberado del líquido por sPLA₂ para crear el lisolípido.

Características fisicoquímicas de los liposomas

30 El liposoma puede ser unilamelar o multilamelar. Lo más preferentemente, el liposoma es unilamelar. El diámetro del liposoma debería estar entre 50 y 400 nm, preferentemente entre 80 y 160 nm y lo más preferentemente entre 90 y 120 nm.

35 Preferentemente, el Índice de Poli Dispersión (PDI) de la formulación liposomal del segundo aspecto de la invención no debería superar 0,2 y más preferentemente es 0,10 o inferior. Un valor de PDI en este intervalo expresa una distribución del tamaño de partícula relativamente estrecha en la formulación.

Tal como quedará claro a partir de lo mencionado anteriormente, es preferente que al menos uno de los lípidos que comprenden el liposoma sea un sustrato para sPLA₂ cuando esté presente en el liposoma.

40 En una realización, el liposoma comprende lípidos que se hidrolizan por sPLA₂ en la posición sn-3 en lugar de en la posición sn-2. Dichos lípidos y liposomas no naturales que comprenden lípidos no naturales se han desvelado en el documento WO 2006/048017.

45 En una realización lo más preferente, los liposomas a usar en la presente invención comprender DSPC al 70 %, DSPG al 25 % y DSPE-PEG al 5 %.

Método de preparación

50 Un segundo aspecto de la invención es un método que comprende las etapas

- a) Preparar una mezcla de lípidos por disolución de los lípidos seleccionados en un disolvente orgánico
- b) Hidratar el producto de la etapa a) con un disolvente de hidratación acuoso con el fin de formar liposomas
- c) Retirar el disolvente orgánico de la etapa a) antes de la adición del disolvente de hidratación acuoso o después de la adición del disolvente de hidratación acuoso
- 55 d) intercambiar el disolvente de hidratación con una solución exterior, que tiene una concentración de osmolitos menor que la solución de hidratación
- e) Formar de este modo una composición tal como se describe en el primer aspecto de la invención.

60 El disolvente de hidratación se puede intercambiar por centrifugación, ultrafiltración, diálisis o similares. Después de cambiar el disolvente de hidratación a la solución exterior, es precedente que menos de un 15 %, menos de un 10 % o más preferentemente menos de un 8 % o un 6 % de agente terapéutico esté presente en la solución exterior.

65 Preferentemente, el grado de encapsulación del fármaco en los liposomas debería ser > 70 %, más preferentemente > 95 % y lo más preferentemente > 99 %. El grado de encapsulación del fármaco es la relación de fármaco encapsulado a la cantidad total de fármaco en la formulación. Preferentemente, el disolvente orgánico se retira antes de la adición del disolvente de hidratación.

El método puede comprender adicionalmente una mezcla pura elevada para reducir el tamaño de los liposomas.

5 El método puede comprender además una etapa de extrusión de los liposomas producidos en la etapa c) a través de un filtro para producir liposomas de un tamaño medio determinado.

El método también puede comprender una etapa de sonicación de la formulación liposomal para producir liposomas de un determinado tamaño.

10 El método también puede comprender la homogeneización a una presión entre 5000 y 20000 kPa.

Preferentemente, el liposoma es un liposoma tal como se describe en el primer aspecto de la invención, es decir, los lípidos se seleccionan en consecuencia.

15 Los liposomas se pueden cargar con al menos un agente terapéutico mediante la solubilización del fármaco en el disolvente orgánico o en el disolvente de hidratación usado para preparar los liposomas. Preferentemente, el agente terapéutico se solubiliza en el disolvente de hidratación y el agente terapéutico es preferentemente cisplatino.

20 Como alternativa, el agente terapéutico ionizable se puede cargar en los liposomas, primero mediante la formación de los liposomas, estableciendo un potencial electroquímico, por ejemplo, por medio de un gradiente de pH, a través de la capa más externa del liposoma, y a continuación añadiendo el agente terapéutico ionizable al medio acuoso externo al liposoma.

25 Ejemplos

Ejemplo 1, Optimización de la estabilidad de almacenamiento de liposomas hidrolizables por sPLA2

Resumen

30 Se ha observado que después del almacenamiento a 2-8 °C, LiPlaCis (cisplatino liposomal) puede tener hasta un 30 % de pérdida durante el primer par de meses. La pérdida es más extensa durante los primeros dos meses, y más allá de este periodo de tiempo solo se producen filtraciones menores.

35 Se estableció un diseño factorial para someter a ensayo la estabilidad de LiPlacis a 2-8 °C. Las formulaciones se prepararon con composición de tampón interior variable, y se homogeneizó a diferentes presiones de acuerdo con el diseño de la cara compuesta. Se sometieron a ensayo 3 factores a 3 niveles:

- Concentración de NaCl interior (0,9, 1,4, y 1,9 %)
- Concentración de Sacarosa interior (0, 5, y 10 %)
- 40 • Presión de homogeneización usada durante la preparación (5000, 12500, y 20000 KPa).

Se demostró que la pérdida desde la formulación estaba influenciada por todos los parámetros sometidos a ensayo. El aumento de la concentración de sacarosa y de NaCl en el interior del liposoma y que tiene una baja presión de homogeneización durante la preparación de liposomas da como resultado una retención del fármaco más elevada durante el almacenamiento. Las formulaciones que tienen el mayor grado de encapsulación después de dos meses de almacenamiento se prepararon con NaCl al 1,9 % y sacarosa al 10 % en el interior del liposoma, y se homogeneizó a 5000 KPa. No se observaron cambios significativos en el tamaño de partícula durante el almacenamiento para ninguna de las formulaciones preparadas.

50 Materiales y métodos

Preparación de liposomas sPLA2 (LiPlaCis)

55 1,2-di(octadecanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-di(octadecanoil)-sn-glicero-3-fosfoglicerol (DSPG), y 1,2-di(octadecanoil)fosfatidiletanolamina-metoxi poli (etilenglicol) 2000 (DSPE-PEG 2000) adquirieron todos en Lipoid (Ludvigshafen, Alemania). La sacarosa se adquirió en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El cloruro sódico y el dihidrógeno fosfato sódico se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania) y en J.T. Baker (Deventer, Holanda), respectivamente. La solución patrón de absorción atómica de iridio se adquirió en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los casetes de diálisis Slide-A-Lyzer de 10K MWCO se adquirieron en Thermo Scientific (Rockford, IL). Los dispositivos de filtro de centrifuga Ultra-4 Ultracel-30k Amicon® se adquirieron en Millipore (Bedford, MA).

Preparación de LiPlaCis

65 Se preparó una mezcla homogénea de lípidos (DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000 a un 70:25:5 % en moles) disolviendo lípidos en cloroformo/metanol a 9:1 (v/v). El disolvente se evaporó de las mezclas de lípidos a una temperatura de 50 °C, usando una corriente suave de nitrógeno gaseoso. El disolvente residual se evaporó mediante el

almacenamiento al vacío durante la noche en una liofilizada Christ Epsilon 2-4 de Martin Christ Freeze Dryers GmbH (Harz, Alemania). Se prepararon vesículas multilamelares (MLV), mediante la dispersión de las películas de lípidos en un medio de hidratación caliente a 65 °C que contenía 8 mg/ml de cisplatino y concentraciones variables de sacarosa y cloruro sódico de acuerdo con la tabla 1. Los lípidos se hidrataron durante ½ h a 65 °C. Durante la hidratación, las muestras se agitaron vorticialmente cada 5 min. La suspensión de lípido hidratado se homogeneizó en EmulsiFlex-C3 de Avestin, Inc. (Ontario, Canadá) a presión variable (5000-20.000 KPa) de acuerdo con la tabla 1. Todas las etapas de homogeneización se llevaron a cabo a una temperatura de 65 °C. El cisplatino no atrapado se retiró de la formulación por precipitación y diálisis. La precipitación se llevó a cabo en dos etapas; primero a 25 °C durante 1 h, y después a 5 °C durante 1 h. Se dializó frente a un volumen de 100x 2 veces en tampón de Fosfato 10 mM que contiene sacarosa al 10 % a pH 6,5 durante 18 y 24 horas, respectivamente. Inmediatamente después de la preparación, las formulaciones se dividieron en viales de vidrio con 500 µl de la muestra en cada vial. Los viales se cerraron herméticamente con tapa y se colocaron en un refrigerador (2-8 °C). El día de la colocación en el refrigerador se considera la fecha de comienzo. Se toman muestras continuamente durante el almacenamiento, y se analizaron mediante ICP-MS y Zetasizer nano para la determinación de las concentraciones de PT y tamaño de partícula, respectivamente.

Determinación de los tamaños de partícula

Se mezclaron dos gotas de LiPlaCis en 10 ml de agua Milli-Q. Se transfirió 1 ml de la mezcla a una cubeta desechable y se midió el tamaño de partícula en el dispositivo Zetasizer Nano ZS de Dispersión Dinámica de la Luz de Malvern Inc. (Worcestershire, Reino Unido). Los tamaños de partícula se determinaron tres veces a una temperatura de 25 °C usando agua como la sustancia de referencia interna. Se calculó un tamaño medio de partícula de Z media (es decir, diámetro) basado en las tres mediciones.

Determinación del grado de encapsulación

Los liposomas se diluyeron con un factor de 100 en solución de diálisis. Posteriormente, los liposomas diluidos se equilibraron durante 1 h a 25 °C. A continuación, parte de los liposomas diluidos se centrifugó a 2500 g durante 30 min. a 15 °C en un dispositivo Amicon® de filtro de Ultra centrifugas (30K MWCO) de Millipore (Billerica, MA). Las muestras antes de la centrifugación (es decir, liposomas diluidos 100 veces) y después de la centrifugación (permeado) se diluyeron 100 veces en agua Milli-Q. Se añadió solución patrón de absorción atómica de iridio al 1 % en volumen (1,05 ppm) a todas las muestras como patrón interno. Un dispositivo de plasma acoplado inductivamente PESCIX Elan 6000 de Perkin-Elmer (Ontario, Canadá) equipado con un nebulizador de flujo transversal y se usó un cono pt para medir los niveles de platino en muestras de LiPlaCis.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se realizó usando un diseño de cara compuesta central para investigar los efectos del producto lineal, cuadrático, y cruzadote los tres factores, cada uno de los cuales variado a tres niveles y también incluye tres puntos centrales para la replicación. Los factores y sus niveles se muestran en la tabla 1. Los tres factores elegidos fueron la concentración de NaCl interior (% en p/v), concentración de sacarosa interior (% en p/v), y la presión de homogenización (kPa).

El diseño del experimento usado se presenta en la tabla 1. Un paquete de software (Modde 8.0, Umetri, Umeå, Suecia) se usó para ajustar el modelo de segundo orden a las variables independientes.

El modelo de superficie de respuesta se ajustó a la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon$$

En la que Y es la variable de respuesta, X_i la i^a variable independiente, β_0 el intercepto, β_i el coeficiente del modelo de primer orden, β_{ii} el coeficiente cuadrático para la variable i y β_{ij} es el coeficiente modelo para la interacción entre el factor i y j , ϵ es la combinación del error experimental para los factores. El término cuadrático hace posible obtener información sobre las curvaturas en la respuesta.

El coeficiente de determinación (R^2) y el ensayo de falta de ajuste se usaron para determinar si el modelo construido era adecuado para describir los datos observados. $R^2 > 0,8$ indica que el modelo tiene cualidades aceptables. Cuando es posible, el modelo se simplifica mediante términos que disminuyen, que no eran significativos ($P > 0,05$) mediante el análisis de la varianza. Sin embargo, los términos no se retiran del modelo si R^2 se hace menor de 0,8.

RSM se usó para evaluar el efecto de los factores seleccionados en el tamaño de partícula inicial, % de DOE inmediatamente después de la preparación, % de DOE y pérdida después de 56 días de almacenamiento a 2-8 °C.

Resultados y análisis

- 5 Ajuste del modelo
- Se determinaron los modelos que mejor se ajustan por regresión múltiple y eliminación inversa. Los valores observados y predichos se correlacionaron suficientemente. Se calcularon las estadísticas de los coeficientes del modelo y los valores de probabilidad (P) de las variables de respuesta (Tabla 2). Los modelos generados fueron en general satisfactorios para las evaluaciones, ya que los resultados observados y predichos se correlacionaron bien. De acuerdo con el análisis de la varianza, no hubo falta de ajuste para ninguno de los modelos generados.
- 10
- Tamaño de partícula
- 15 Los datos muestran que la presión de homogeneización tiene la influencia más significativa en el tamaño de partícula. Con una presión de homogeneización más elevada usada durante la preparación, el tamaño de partícula disminuye. Además, se demostró que la concentración de sacarosa usada durante la preparación tiene una influencia significativa en el tamaño de partícula. El aumento de la concentración de sacarosa da como resultado un tamaño de partícula más grande. La representación del contorno que ilustra la influencia de la concentración de sacarosa interior y la presión de homogeneización usada durante la preparación de liposomas sobre la partícula se presenta en la figura 1.
- 20
- A partir de la figura 2, se puede observar que con un tamaño de partícula más grande no se observa normalmente una cantidad más elevada de cisplatino encapsulado. Con un tamaño de partícula más grande, también se podría esperar que el volumen interior aumentara, lo que permite que se encapsule más Pt.
- 25
- Los cambios en el tamaño de partícula y PDI durante el almacenamiento se presentan en las figuras 3-4. No se observaron cambios significativos en el tamaño de partícula durante el almacenamiento en frío para ninguna de las formulaciones de liposomas preparadas.
- 30
- Grado inicial de encapsulación (%)
- Las formulaciones tenían un grado inicial de encapsulación que varía entre un 84 y un 92 %. Se demostró que el NaCl tuvo la influencia más significativa en el grado inicial de encapsulación (DOE). Con una concentración de sal más elevada usada en la solución de hidratación se obtuvo un DOE inicial más elevado. Por otra parte, la presión de homogeneización más elevada usada durante la preparación dio como resultado un DOE menor. Esto se debe probablemente al hecho de que se obtienen liposomas más pequeños a mayor presión de homogeneización, y por lo tanto se puede esperar más platino en el exterior del liposoma. El contorno que ilustra la influencia de la concentración interior de NaCl y la presión de homogeneización usada durante la preparación de liposomas en un % inicial de DOE se presenta en la figura 5.
- 35
- 40
- Influencia de los parámetros sobre el % de DOE y pérdida después de 56 días de almacenamiento a 2-8 °C
- 45 El análisis de Pt (contenido total de Pt, contenido de Pt exterior de liposoma y pérdida) durante el almacenamiento se presenta en las figuras 6-8.
- Se demostró que el NaCl interior y las concentraciones de sacarosa tienen una influencia significativa en el grado de encapsulación (DOE) después de 56 días de almacenamiento. Con una concentración más elevada de NaCl y de sacarosa en el interior del liposoma se obtuvo una DOE más elevada. No se observó ningún efecto principal para la presión de homogeneización; sin embargo se observó interacción entre la presión de homogeneización y la sacarosa. Una concentración de sacarosa interior elevada y una baja presión de homogeneización dan como resultado mayores DOE comparados, en comparación con el que tiene mayor presión de homogeneización.
- 50
- 55 La cantidad de cisplatino que se filtra de la formulación durante 56 días de almacenamiento depende de todos los factores examinados. Sin embargo, el factor que tiene el efecto más significativo sobre la pérdida fue la concentración de sacarosa. Se observó que un aumento de las concentraciones de NaCl y de sacarosa interiores aumentar la retención del fármaco durante el almacenamiento. Se podría observar más pérdida a partir de liposomas preparados a baja presión en comparación con los que se preparan a presión más elevada.
- 60
- Se observó una pérdida más baja para las formulaciones preparadas con solución de hidratación que contiene sacarosa al 10 % y NaCl al 1,9 %, y homogeneizadas a 20000 KPa. La formulación que tiene el DOE más elevados después del almacenamiento de 56 días a 2-8 °C se preparó con solución de hidratación que contiene sacarosa al 10 % y NaCl 1,9 %, y homogeneizada a 5000 kPa.
- 65

Conclusión

Los modelos de respuesta expresaron de forma satisfactoria la relación entre los parámetros seleccionados y las respuestas. Los resultados demuestran que las concentraciones de NaCl interior y sacarosa tienen una influencia significativa en la pérdida a partir de la formulación de LiPlacis durante el almacenamiento a 2-8 °C. Durante el almacenamiento, el factor que tuvo la influencia más significativa en la retención del fármaco fue la sacarosa. El aumento de NaCl también mejora la retención del fármaco. El grado de encapsulación más elevado después de 56 días se observó para las formulaciones que tienen alta concentración de NaCl y sacarosa en el interior del liposoma. Se demostró que el DOE mejoraba mediante el aumento de la concentración de NaCl en los medios de hidratación.

La pérdida fue más pronunciada cuando se prepararon liposomas a baja presión, en comparación con los liposomas preparados a alta presión. El DOE inicial también es mayor para los liposomas preparados a presiones más bajas. Dado que la presión de homogeneización tiene una gran influencia en el tamaño de partícula, los resultados indican que la retención del fármaco está influenciada, hasta cierto punto, por el tamaño de partícula. i

Las formulaciones que tienen el grado de encapsulación más elevado después de dos meses de almacenamiento se prepararon con NaCl al 1,9 % y sacarosa al 10 % en el interior del liposoma, y se homogeneizaron a baja presión.

No se observaron cambios significativos en el tamaño de partícula durante el almacenamiento para cualquiera de las formulaciones preparadas.

Ejemplo 2

Las formulaciones de cisplatino en liposomas se prepararon por hidratación de película seguido de extrusión. La solución de hidratación se preparó con concentraciones osmóticas variables. Después de la extrusión, los liposomas se dializaron en diferentes medios. Las formulaciones preparadas tenían diferente gradiente osmótico (diferencia de osmolaridad entre interior y exterior) tal como se indica en la tabla 3. Para comparación, se prepararon formulaciones liposomales de otros agentes quimioterapéuticos tal como se indica en la tabla 4. Todas las formulaciones se colocaron en el refrigerador a 2-8 °C, y se tomaron muestras continuamente durante el almacenamiento.

Preparación de formulaciones Liposomales

Los fosfolípidos (DSPC/DSPG/DSPE-PEG2000, 70:25:5 % en moles) se disolvieron en cloroformo/metanol a 9:1 (v/v). El disolvente de las mezclas de lípidos disueltos se evaporó a continuación en un baño de agua caliente 50 °C hasta sequedad visual, bajo una corriente de gas nitrógeno. Las muestras se secaron adicionalmente al vacío durante la noche.

Los líquidos de hidratación (concentraciones variables de Sal y de sacarosa de acuerdo con las tablas 3 y 4) que contienen un agente quimioterapéutico se añadieron a las mezclas de lípidos secos a una temperatura de 65 °C durante la preparación de vesículas multilamelares (MLV). Las suspensiones de lípidos se mantuvieron a 65 °C durante al menos 30 min con el fin de asegurar la hidratación completa. Durante este periodo de tiempo, las suspensiones de lípidos fueron vórtice cada 5 min. Las vesículas unilamelares grandes (LUV) se prepararon por extrusión a través de membranas con tamaño de poro definido (100 nm) a 65 °C. Las LUV se transfirieron posteriormente a casetes de diálisis (MWCO: 10 kDa) con el fin de eliminar el fármaco sin atrapar. Las formulaciones liposomales se dializaron en diferentes soluciones tampón tal como se indica en las tablas 3 y 4.

Inmediatamente después de la preparación de las formulaciones, se dividieron en viales de vidrio. Los viales de vidrio se cerraron herméticamente con tapa y se colocaron en el refrigerador (2-8 °C). El día de la colocación en el refrigerador se considera la fecha de comienzo. Durante el almacenamiento se tomaron muestras continuamente, y se determinó el tamaño de partícula y la concentración del fármaco (Exterior y total).

Resultados:

Las formulaciones liposomales se prepararon con cualquiera de cisplatino, oxaliplatino, MTX, Bleomicina, o 5FU. Se observó que las formulaciones que contienen fármacos con un peso molecular pequeño (< 350 g/mol) tales como cisplatino y 5FU eran filtrantes cuando el gradiente osmótico entre el interior y exterior era bajo. Se demostró que las formulaciones liposomales que contienen fármacos con peso molecular más elevado (> 350 g/mol) no eran prácticamente filtrantes durante el almacenamiento a 2-8 °C.

Se demostró que los ensayos para aumentar el gradiente osmótico en las formulaciones de cisplatino eran un modo eficaz de minimizar la pérdida durante el almacenamiento. Cuando la diferencia entre el gradiente osmótico del interior y del exterior era > 282 mOsM, la pérdida observada durante el almacenamiento se mantuvo en niveles aceptables (véase la tabla 3 y la figura 11).

No se observaron cambios en el tamaño de partícula durante el almacenamiento a 2-8 °C (Figura 12). Por lo tanto, el tamaño de partícula de la formulación no se ve influenciado por el gradiente osmótico más elevado en la formulación de cisplatino.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende
- 5 • un liposoma hidrolizable por sPLA2 que comprende cisplatino encapsulado dentro del liposoma,
 • una solución exterior,
 • y una solución interior dentro del liposoma,
 • en donde la diferencia en la concentración de osmolitos entre la solución interior y la exterior (concentración exterior de osmolitos restada de la concentración interior de osmolitos) es superior a 200 mM
- 10 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el único agente terapéutico es cisplatino.
3. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la diferencia en la concentración de osmolitos entre la solución interior y la exterior (concentración exterior de osmolitos restada de la concentración interior de osmolitos) está entre 200 y 600 mM.
- 15 4. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la diferencia en la concentración de osmolitos entre la solución interior y la exterior (concentración exterior de osmolitos restada de la concentración interior de osmolitos) está entre 280 y 320 mM.
- 20 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la diferencia en la concentración de osmolitos entre la solución interior y la exterior (concentración exterior de osmolitos restada de la concentración interior de osmolitos) es al menos 275 mM.
- 25 6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución interior comprende NaCl o KCl a una concentración entre un 0,2-2,5 % en p/p.
7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución exterior comprende NaCl o KCl a una concentración entre un 0,2-2,5 % en p/p.
- 30 8. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución interior y la exterior se seleccionan entre el grupo que consiste en
- 35 a. Solución interior de NaCl al 0,8-1,0 % y sacarosa al 9-11 % y solución exterior de tampón fosfato 8-12 mM (pH 6,5) + sacarosa al 9-11 %,
 b. Solución interior de NaCl al 1,6-2,0 % y solución exterior de tampón fosfato 8-12 mM (pH 6,5) + sacarosa al 9-11 %,
 c. Solución interior de NaCl al 0,8-1,0 % y sacarosa al 9-11 % y solución exterior de tampón fosfato 8-12 mM (pH 6,5) + NaCl al 0,35 % - 0,55 % + sacarosa al 4-6 %,
40 d. Solución interior de NaCl al 1,6-2,0 % y solución exterior de tampón fosfato 8-12 mM (pH 6,5) + NaCl al 0,8-1,0 %.

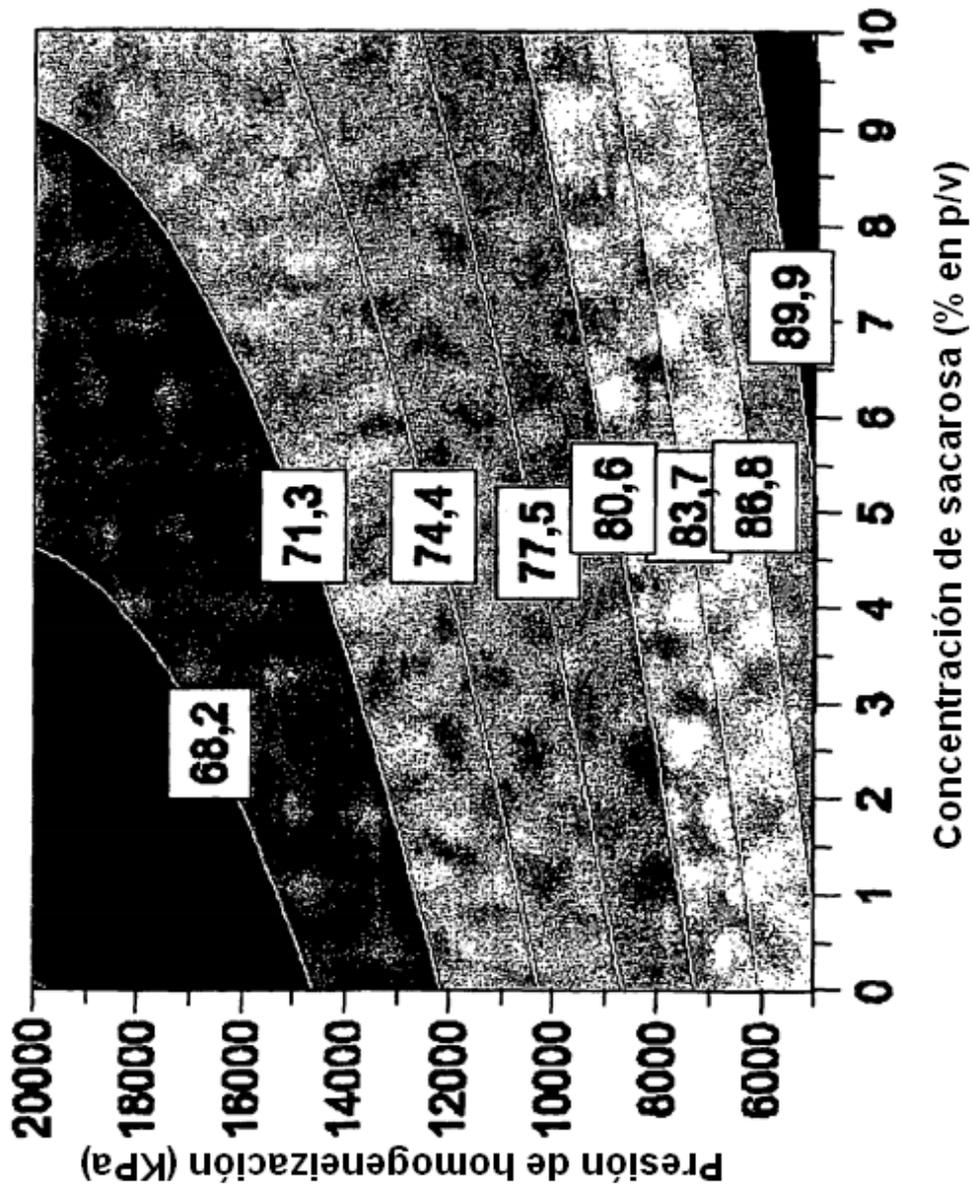


Figura 1

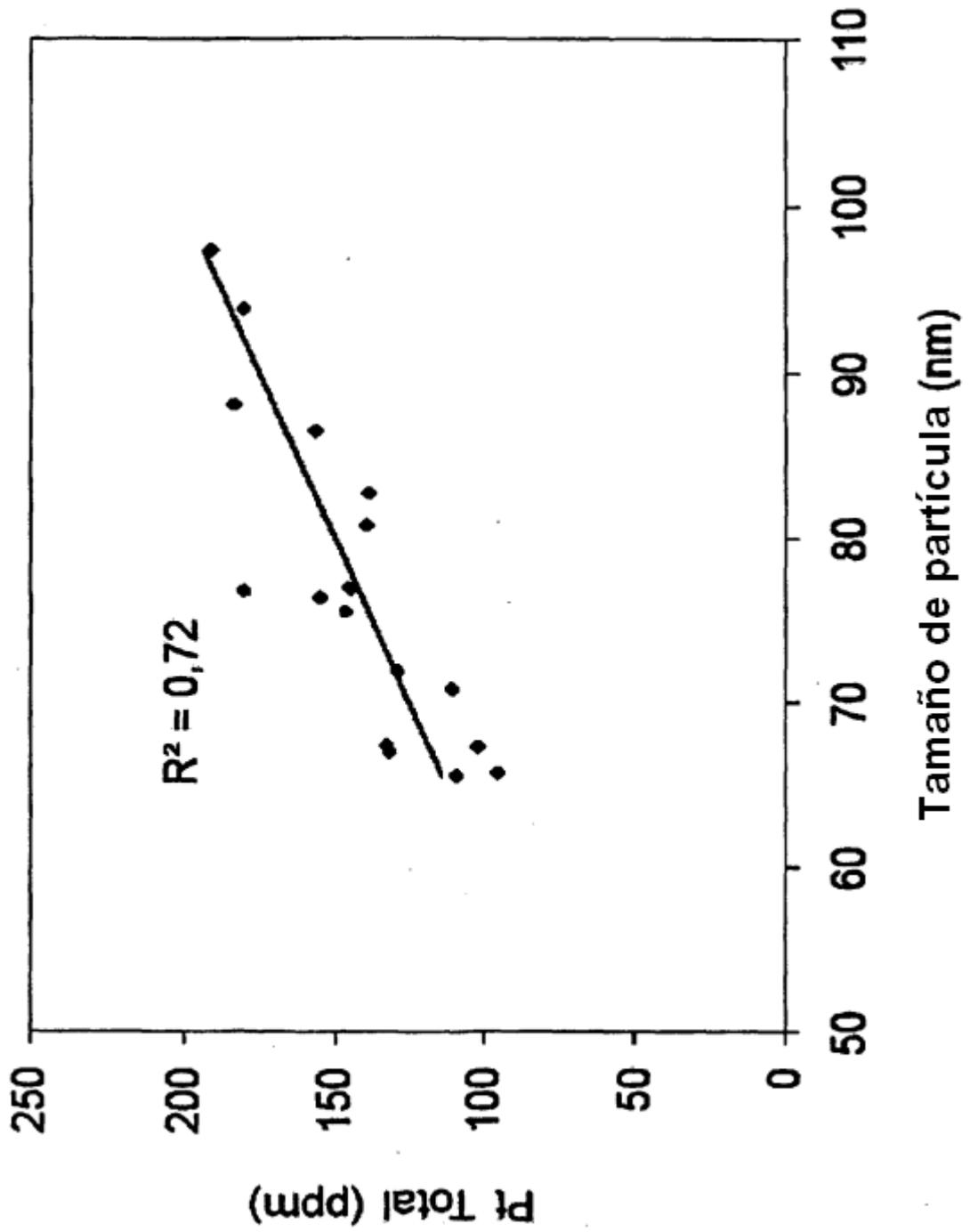


Figura 2

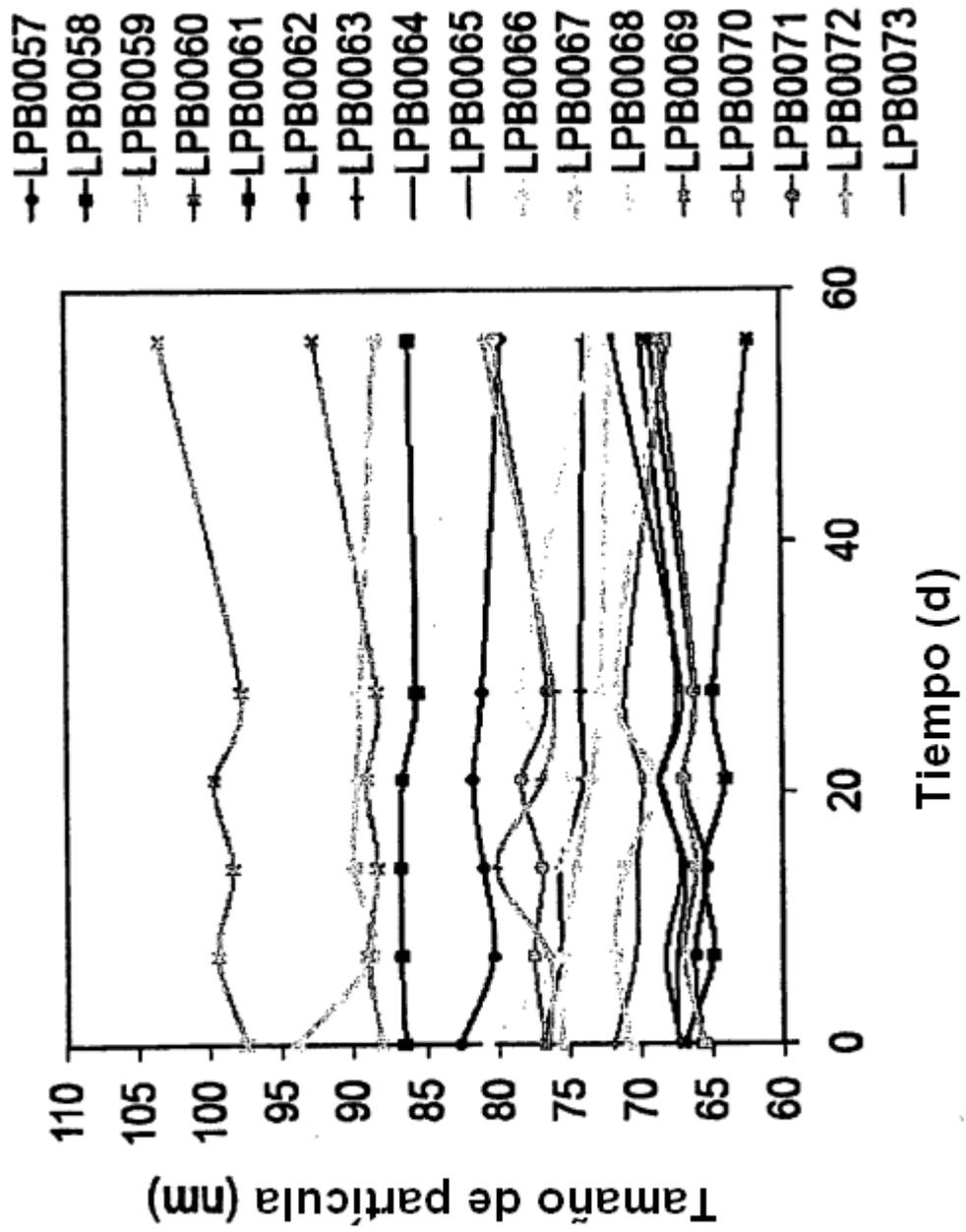


Figura 3

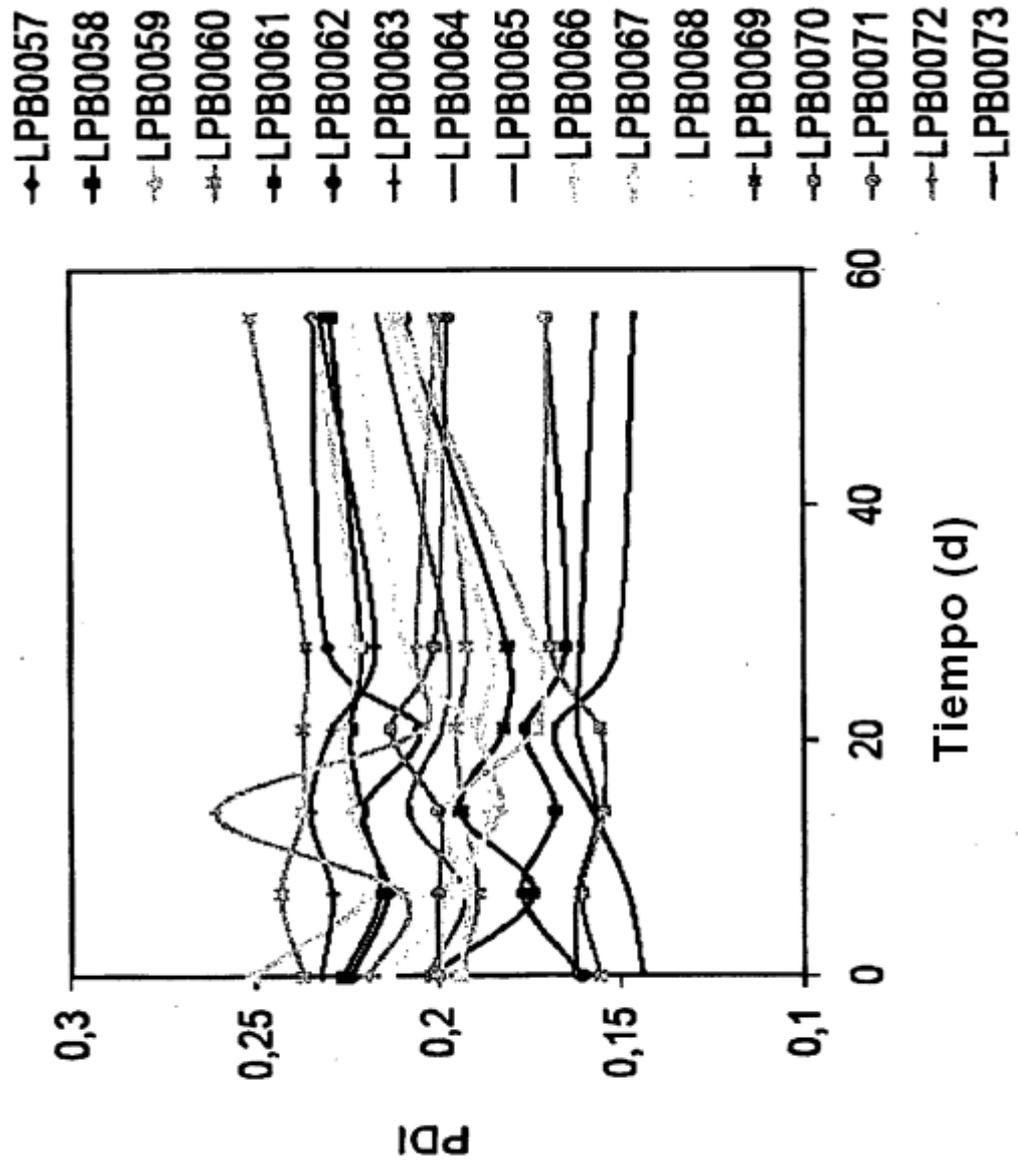


Figura 4

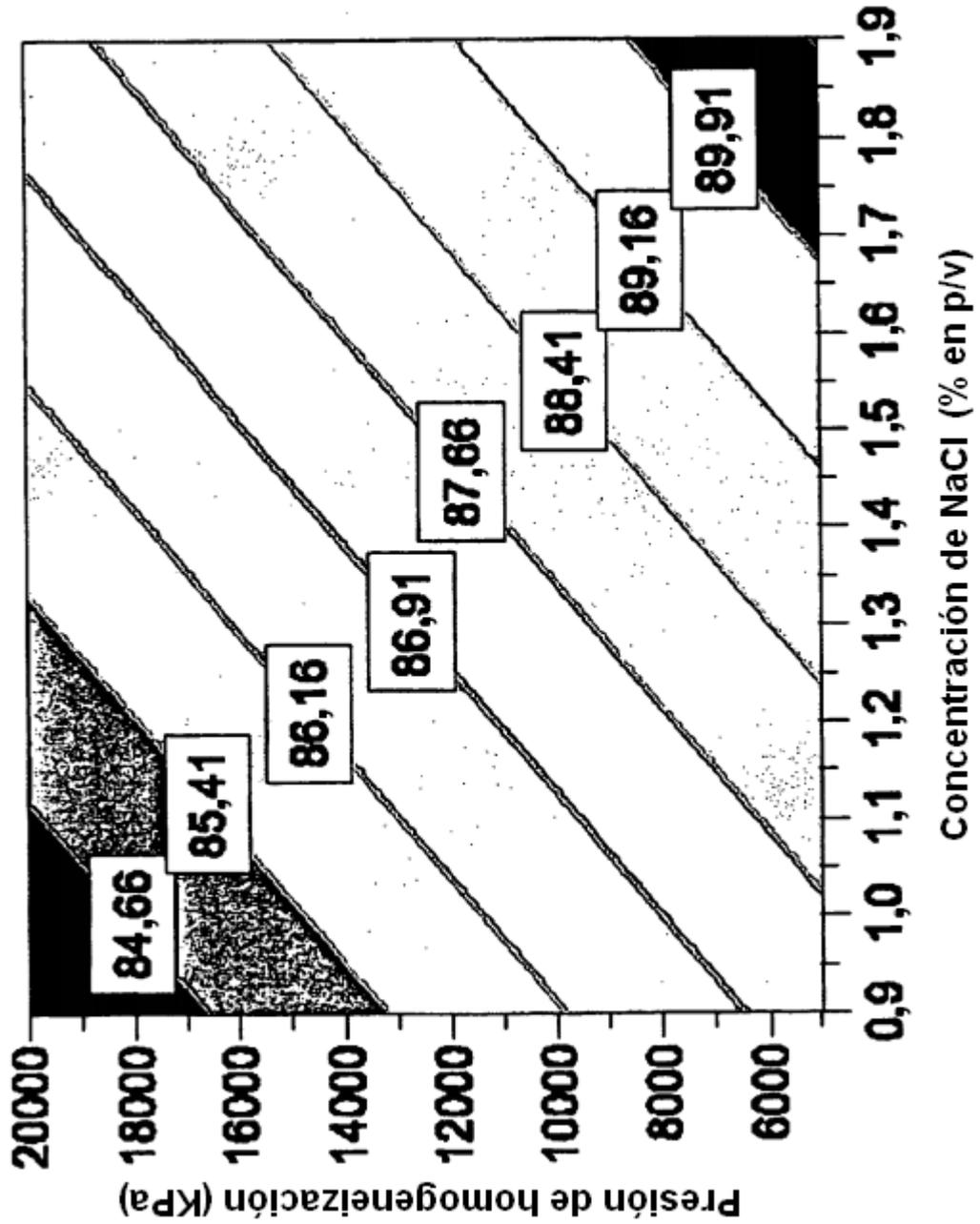


Figura 5

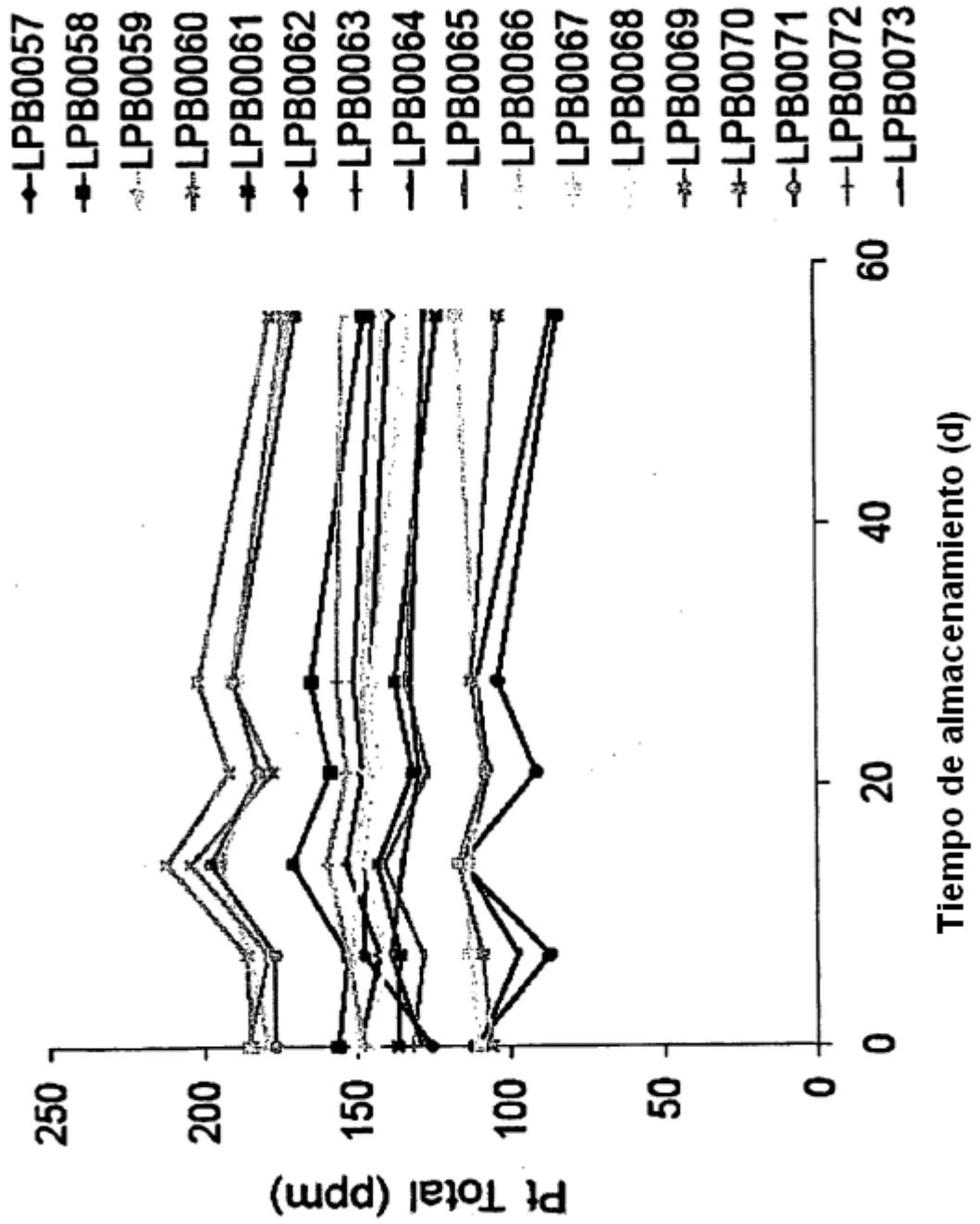


Figura 6

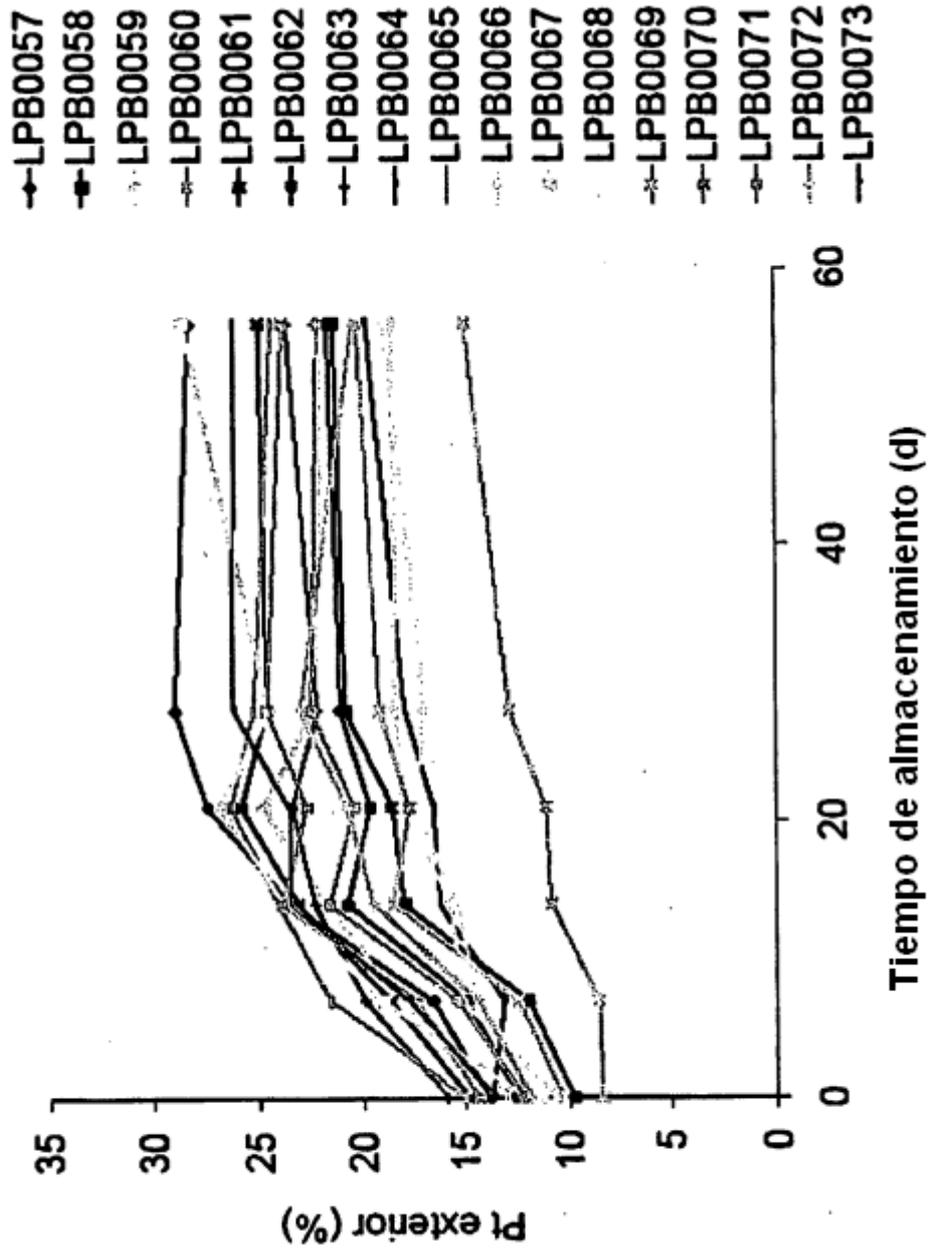


Figura 7

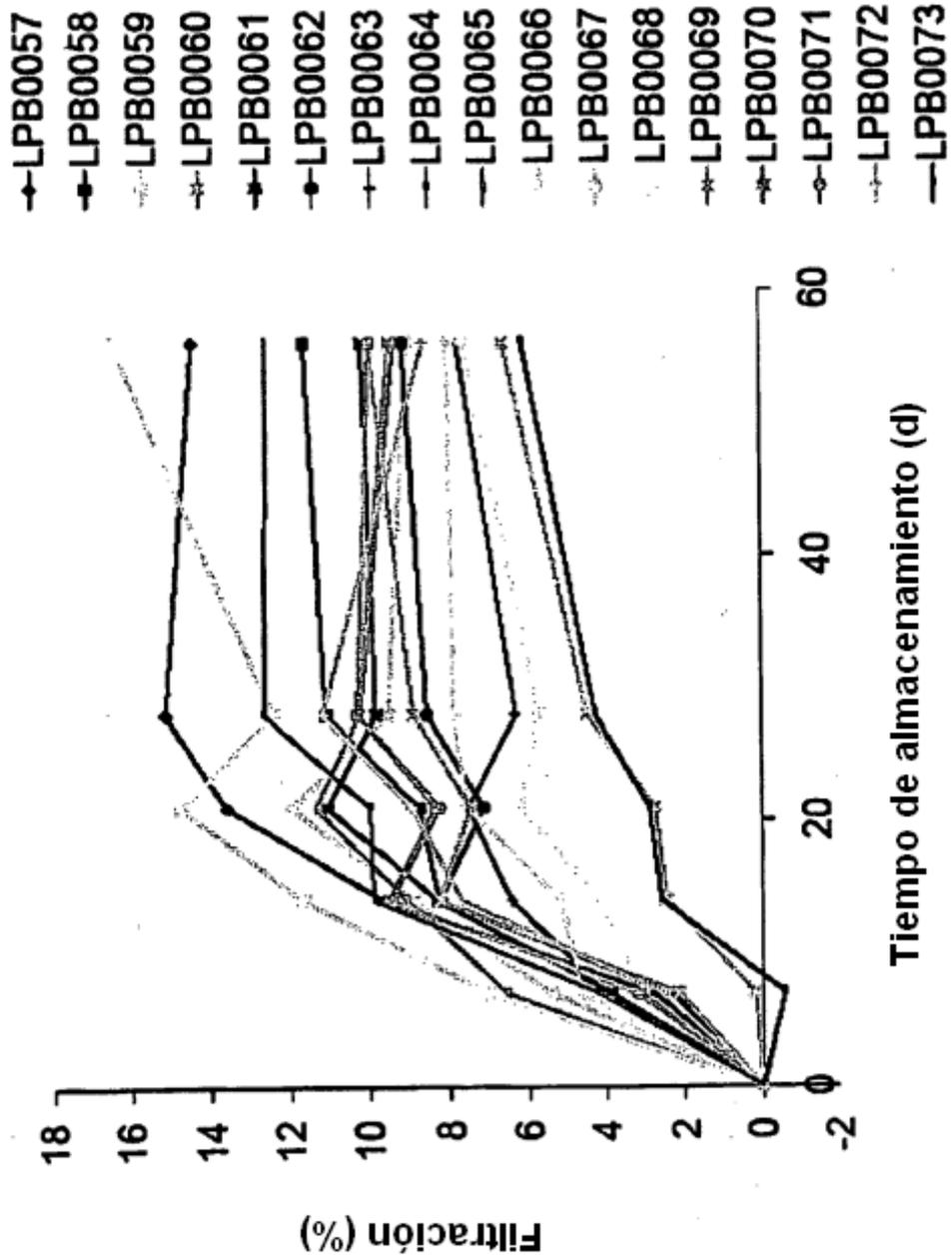


Figura 8

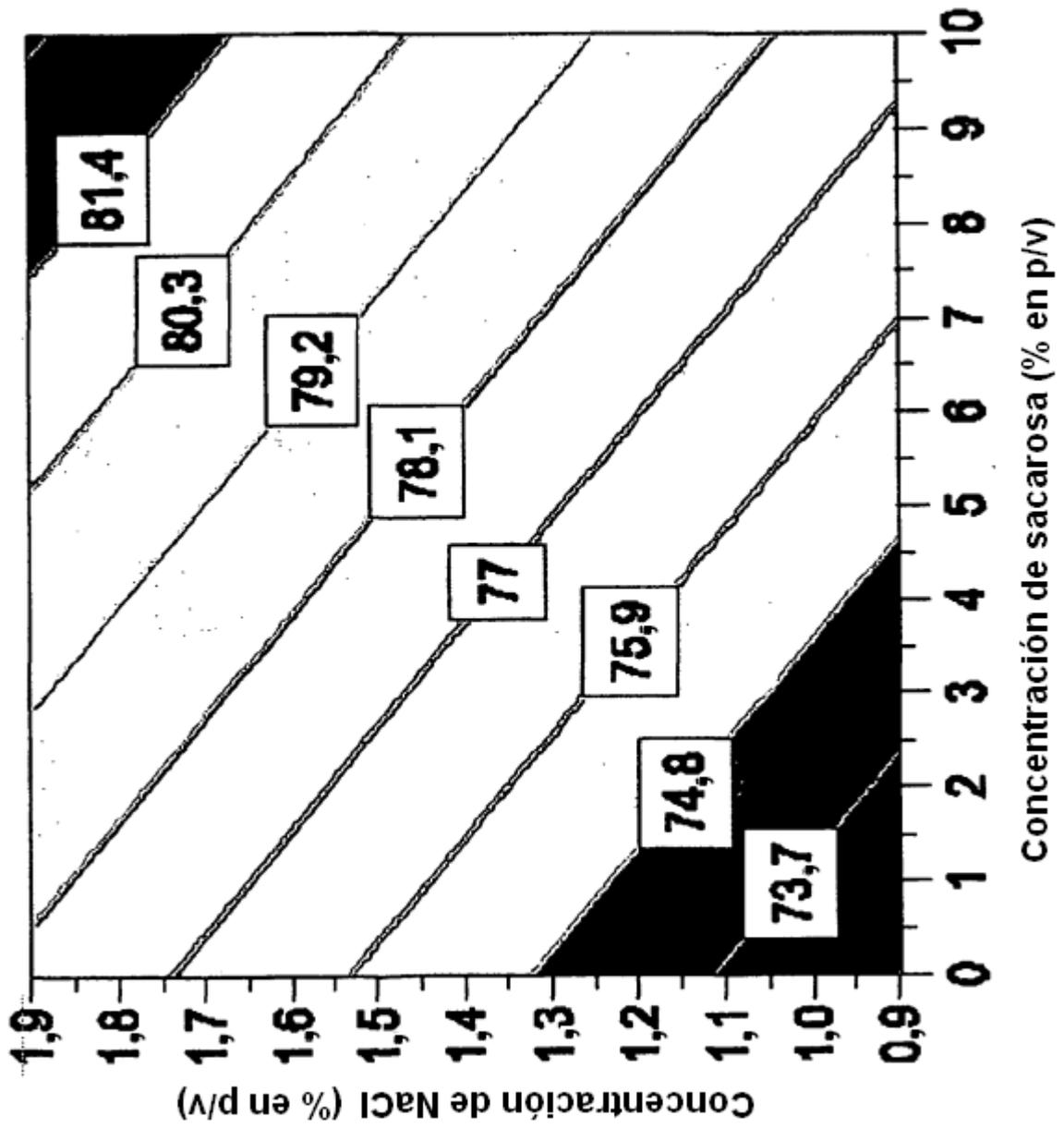


Figura 9

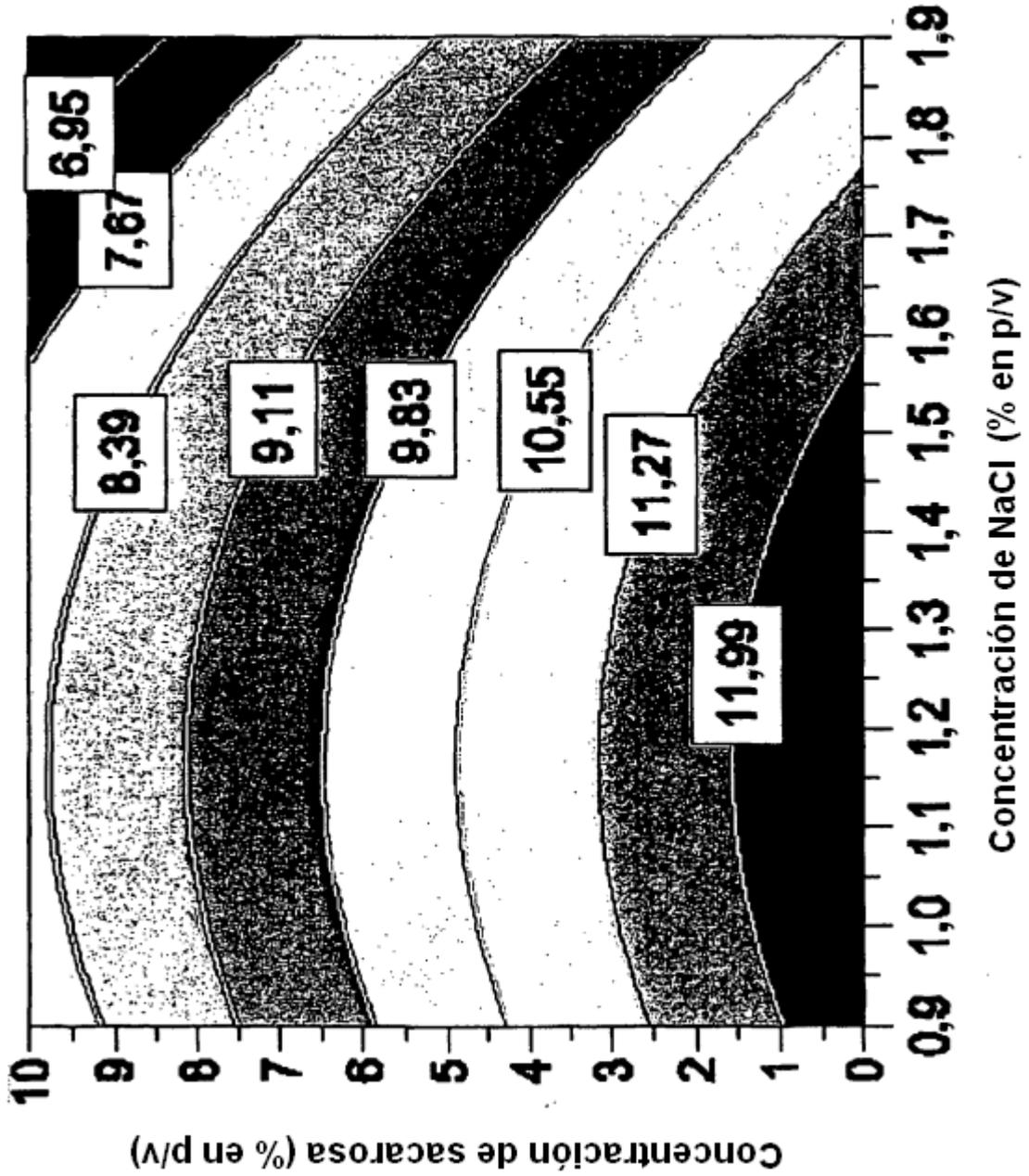


Figura 10

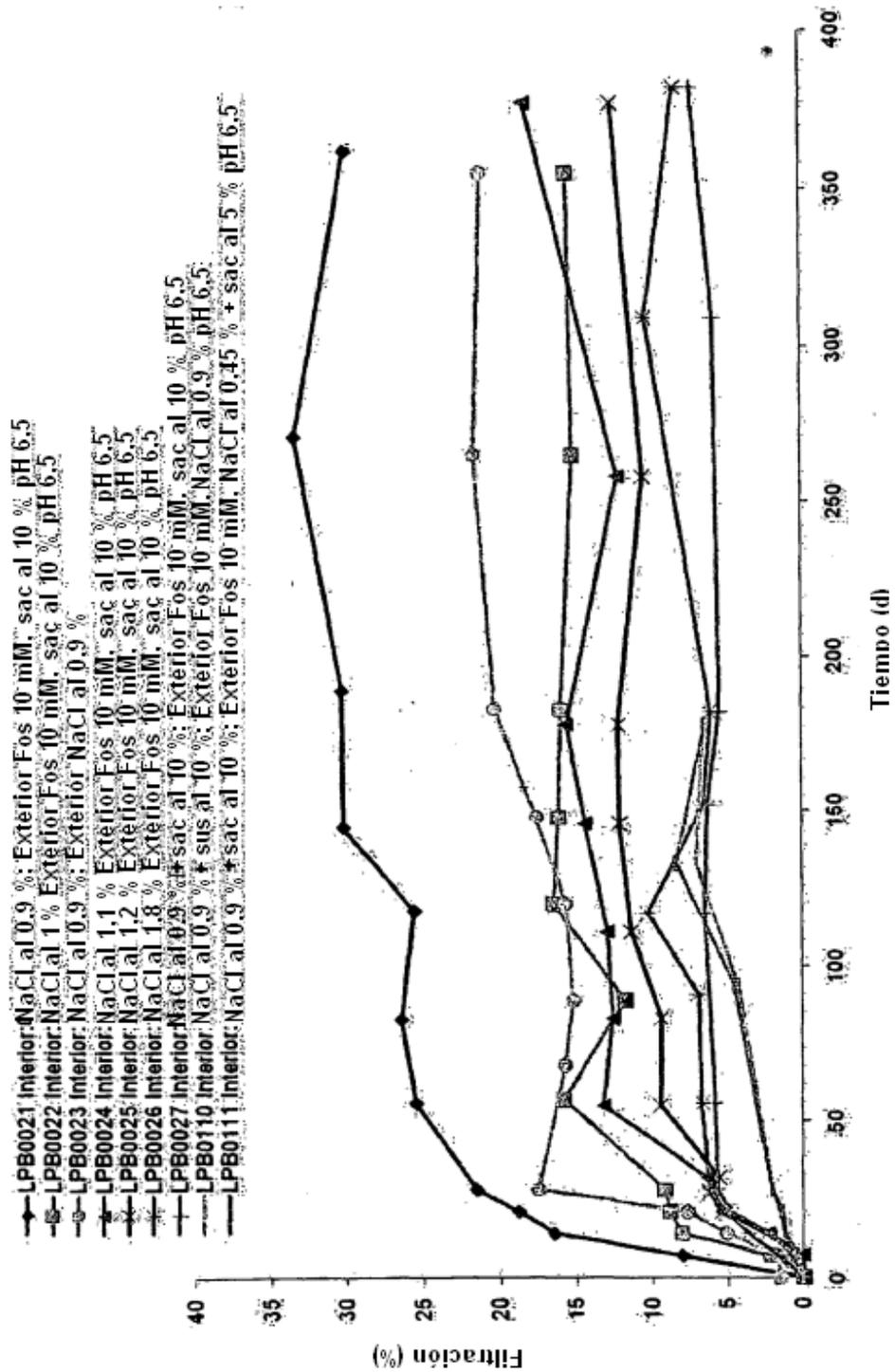


Figura 11

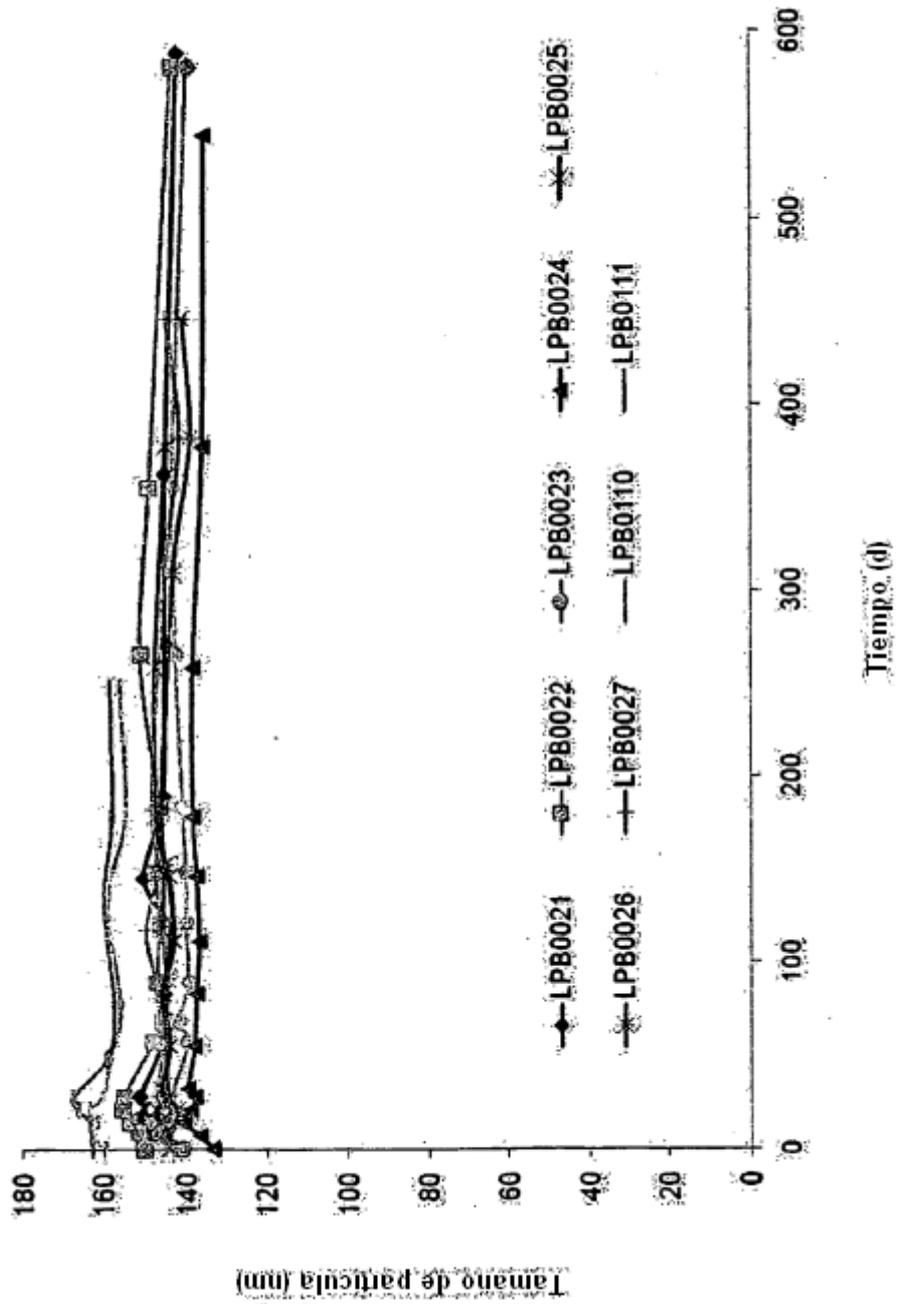


Figura 12

Tabla 1: Ajustes de factores experimentales reales y las respuestas

Nº de Exp	Nº de Lote	Conc. de NaCl (% en p/v)	Concentración de sacarosa (% en p/v)	Presión (KPa)	Tamaño de partícula inicial (nm)	% de DOE Día 0	% de DOE Día 56	% de filtración Día 0-56
1	LPB0057	0,9	0	5000	82,7	86,0	71,5	14,5
2	LPB0058	1,9	0	5000	86,5	90,1	78,4	11,7
3	LPB0059	0,9	10	5000	93,9	87,0	78,0	9,1
4	LPB0060	1,9	10	5000	88,1	91,5	84,9	6,6
5	LPB0061	0,9	0	20000	67,0	85,1	74,8	10,2
6	LPB0062	1,9	0	20000	65,7	86,8	77,2	9,6
7	LPB0063	0,9	10	20000	76,9	83,9	76,1	7,8
8	LPB0064	1,9	10	20000	67,3	86,4	80,4	6,0
9	LPB0065	0,9	5	12500	71,9	84,8	75,4	9,4
10	LPB0066	1,9	5	12500	75,5	89,3	81,2	8,1
11	LPB0067	1,4	0	12500	70,8	87,6	74,4	13,2
12	LPB0068	1,4	10	12500	80,8	88,5	80,8	7,7
13	LPB0069	1,4	5	5000	97,4	89,6	79,5	10,1
14	LPB0070	1,4	5	20000	65,5	85,4	75,8	9,6
15	LPB0071	1,4	5	12500	76,8	87,7	77,7	10,0
16	LPB0072	1,4	5	12500	76,4	88,1	79,4	8,6
17	LPB0073	1,4	5	12500	67,4	86,3	73,6	12,7

Figura 13

Tabla 2. Coeficientes de regresión y valores de significancia (P) del modelo después de eliminación inversa

Términos	Tamaño de partícula inicial		% de DOE inicial		% de DOE 56 días		Filtración (%)	
	Coefficiente de regresión	P	Coefficiente de regresión	P	Coefficiente de regresión	P	Coefficiente de regresión	P
Constante	74,2	$7,71 \cdot 10^{-16}$	87,3	$2,79 \cdot 10^{-30}$	77,6	$2,12 \cdot 10^{22}$	10,3	$1,78 \cdot 10^{-11}$
NaCl			1,73	$1,25 \cdot 10^{-6}$	2,63	$2,67 \cdot 10^{-4}$	-0,90	$2,89 \cdot 10^2$
Sac	3,43	$2,34 \cdot 10^2$	-	-	2,39	$5,85 \cdot 10^{-4}$	-2,19	$5,51 \cdot 10^{-6}$
Pre	-10,62	$2,40 \cdot 10^{**}$	-1,66	$1,95 \cdot 10^{-6}$	-0,80	$1,48 \cdot 10^{-1}$	-0,87	$3,31 \cdot 10^2$
NaCl*NaCl			-	-	-	-	-0,97	$1,12 \cdot 10^{-1}$
Sac*Sac			-	-	-	-	-	-
Pre*Pre	4,87	$3,59 \cdot 10^2$	-	-	-	-	-	-
NaCl*Sac	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl*Pre	-	-	-	-	-	-	-	-
Sac*Pre	-	-	-	-	-1,06	$9,08 \cdot 10^{-2}$	-	-
R2	0,852		0,855		0,816		0,812	
Q2	0,749		0,778		0,661		0,657	

Figura 14

Tabla 3. Visión de conjunto de formulaciones liposomales de cisplatino preparadas con gradiente osmótico variable

Nº de Lote	Fase acuosa interior		Fase acuosa exterior		Gradiente Interior-Exterior	Filtrante? Si/No [†]
	Composición [*]	Osmolaridad ^Δ	Composición [*]	Osmolaridad ^Δ		
LPB0021	8 mg/ml de Cis NaCl al 0,9 % en peso	313 mOsm	Sac al 10 % en peso Fos. 10.mM	317 mOsm	- 4 mOsm	Si
LPB0022	8 mg/ml de Cis NaCl al 1,0 % en peso	345 mOsm	Sac al 10 % en peso Fos. 10.mM	317 mOsm	+ 28 mOsm	Si
LPB0023	8 mg/ml de Cis NaCl al 0,9 % en peso	313 mOsm	NaCl al 0,9 % en peso	286 mOsm	+ 27 mOsm	Si
LPB0024	8 mg/ml de Cis NaCl al 1,1 % en peso	377 mOsm	Sac al 10 % en peso Fos. 10.mM	317 mOsm	+ 59 mOsm	Si
LPB0025	8 mg/ml de Cis NaCl al 1,2 % en peso	409 mOsm	Sac al 10 % en peso Fos. 10.mM	317 mOsm	+ 91 mOsm	Si
LPB0026	8 mg/ml de Cis NaCl al 1,8 % en peso	600 mOsm	Sac al 10 % en peso Fos. 10.mM	317 mOsm	+ 282 mOsm	No
LPB0027	8 mg/ml de Cis NaCl al 0,9 % en peso Sac al 10% en peso	611 mOsm	Sac al 10 % en peso Fos. 10.mM	317 mOsm	+ 294 mOsm	No
LPB0110	8 mg/ml de Cis NaCl al 0,9 % en peso Sac al 10% en peso	611 mOsm	NaCl al 0,9 % en peso Fos. 10.mM	306 mOsm	+ 306 mOsm	No
LPB0111	8 mg/ml de Cis NaCl al 0,9 % en peso Sac al 10% en peso	611 mOsm	Sac al 5 % en peso NaCl al 0,45 % en peso	292 mOsm	+ 319 mOsm	No

* Abreviaturas: Cis = cisplatino, Sac = Sacarosa, Fos = Fosfato sódico, NaCl = Cloruro sódico
^Δ Supone: 1) Todo el material en disolución,
2) aumentos insignificantes en los volúmenes interiores después de la diálisis, y
3) Uso de los coeficientes osmóticos disponibles, que de otro modo se asume que 1 corresponde a la idealidad.
[†] Definiciones: Si = Mayor que (>) un 10 % con respecto a la filtración de platino después de 150 días de almacenamiento.
No = Menor o igual que (≤) un 10 % con respecto a la filtración de platino después de 150 días de almacenamiento.

Figura 15

Tabla 4. Visión de conjunto de diferentes formulaciones farmacológicas liposomales preparadas con pesos moleculares variables

	Oxaliplatino liposomal	MTX Liposomal	Bleomicina Liposomal	Liposomal 5FU
Sustancia activa	Oxaliplatino	Metotrexato	Bleomicina	5FU
Medios de hidratación (Interior)	15 mg/ml de Oxaliplatino /sacarosa al 10 % /gluconato cálcico 1.mM	40 mg/ml de MTX/ Fosfato Na 10.mM	25 mg/ml de Bleomicina /sacarosa al 10 %	30 mg/ml de 5-FU/ NaCl al 0,9 %
Solución de diálisis (Exterior)	Sacarosa al 10 % / gluconato cálcico 1.mM	Sacarosa al 10 %/ Fosfato Na 10.mM	Sacarosa al 10 %/ gluconato cálcico 1.mM	Sacarosa al 10 %/ Fosfato Na 10.mM
Osmolaridad interior (mOsm)	338	270	315	517
Osmolaridad interior (mOsm)	300	317	3300	317
Gradiente osmótico (mOsm)	38	-47	15	200
Peso molecular de la sustancia activa (g/mol)	397	454	1516	130
Filtración (> 10 %)	No	No	No	Si

Figura 16