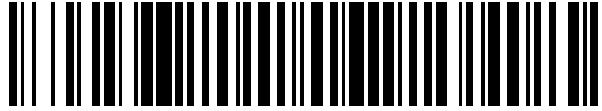


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 178**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2002** **E 02716784 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014** **EP 1359901**

54 Título: **Liposoma termolábil con temperatura de liberación regulada**

30 Prioridad:

**15.02.2001 DE 10107165**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.02.2015**

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.  
(100.0%)  
HOFGARTENSTRASSE 8  
80539 MÜNCHEN, DE**

72 Inventor/es:

**EIBL, HANSJÖRG y  
LINDNER, LARS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 529 178 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

Liposoma termolábil con temperatura de liberación regulada

La invención se refiere a un liposoma termolábil con temperatura de liberación regulada para el contenido del liposoma, en particular a un liposoma estable a 37°C en suero con una temperatura de liberación regulada entre 40 y 80°C.

Los liposomas son vesículas formadas artificialmente a base de dobles capas de lípidos que incluyen un compartimiento acuoso (Bangham et al. 1965). Utilizados originalmente todavía como sistema modelo para una membrana celular, los liposomas han sido perfeccionados en los últimos tiempos ante todo para el transporte de sustancias medicamentosas. En este caso, los liposomas pueden aumentar la compatibilidad de principios activos (reducción de la toxicidad activa de anfotericina B mediante la formulación liposomal (AmBisome®) en un factor de 75 (Proffitt et al. 1991). Sin embargo, también abren la posibilidad de transportar de manera preestablecida sustancias medicamentosas al tejido enfermo (Forssen et al. 1992). Después de la aplicación intravenosa, los liposomas son absorbidos principalmente en células del sistema retículo-endotelial (RES - siglas en alemán) del hígado y el bazo (Gregoriadis y Nerunhun 1974). Con el fin de poder aprovechar a los liposomas como soportes de sustancias medicamentosas para células fuera del RES, se intentó aumentar el tiempo de circulación de los liposomas en la sangre. Ante todo en tumores que a menudo están muy bien vascularizados (Jain 1996) y cuyos vasos son particularmente permeables por parte de compuestos inter-endoteliales ensanchados, un gran número de fenestraciones así como membranas basales discontinuas (Murray y Carmichael 1995), se podría aumentar masivamente con ello la probabilidad de absorción de liposomas.

Maruyama et al., Int. J. Pharm., 111 (1994) 103-107, describe liposomas con contenido en colesterol, cuyo tiempo de circulación pueden ser ligeramente influenciados por dipalmitoilfosfatidilpoliglicerol con diferente longitud de cadena. Los liposomas allí descritos no presentan temperatura de transformación de fases ni termosensibilidad.

El documento DE 196 22 224 A1 describe fosfatidiloligoglicerol y liposomas formados con éstos. Los liposomas allí descritos no presentan, en virtud del colesterol contenido, temperatura de transformación de fases alguna y, por consiguiente, termosensibilidad.

Zellmer et al., J. Lip. Res. 4 (3) (1994) 1091-1113 describe liposomas formados a partir de dipalmitoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilglicerol y diferentes alcoholes grasos de cadena larga. No se mencionan fosfatidiloligoglicerol.

El documento WO 99/52505 describe agentes de contraste en forma de partículas para la formación de imágenes diagnóstica. El material en forma de partículas puede contener un material de membrana tal como, por ejemplo, fosfolípidos que pueden formar liposomas. En el documento WO 99/52505 no se mencionan fosfatidiloligoglicerol.

Un primer problema en el caso de utilizar liposomas para el transporte de principios activos o sustancias de marcaje en fluidos corporales estriba, por lo tanto, en el aumento del tiempo de circulación en suero. Ciertamente, ya se ha encontrado que mediante el enlace covalente de metoxipolietilenglicoles a la membrana de los liposomas se impide el reconocimiento prematuro de los liposomas por parte del RES y, con ello, se puede mejorar el tiempo de circulación. Junto a una mejora del tiempo de circulación existe, sin embargo, gran interés en la posibilidad de alcanzar, mediante la acción de la temperatura, una liberación preestablecida de las sustancias constitutivas de los liposomas a una temperatura determinada.

Por lo tanto, la invención tiene por misión crear un liposoma que presente un tiempo de semivida en el suero esencialmente mejorado, comparado con el tiempo de semivida habitual de liposomas conocidos de un orden de magnitud en torno a 4 horas y que esté constituido de manera que el contenido de los liposomas se libere rápidamente a una temperatura determinada.

Este problema se resuelve conforme a la invención mediante un liposoma con una temperatura de liberación regulada para el contenido del liposoma, el cual se caracteriza por que esencialmente está formado por al menos una fosfatidilcolina con una temperatura de transformación principal que se encuentra en el intervalo de 0 a 80°C, y 2 a 15% en peso de fosfatidiloligoglicerol, y está exento de colesterol.

Liposomas constituidos conforme a la invención presentan tiempos de semivida esencialmente mejorados de hasta 20 horas en el suero y pueden, mediante la elección adecuada de los componentes y las cantidades de los componentes en función de su temperatura de transformación principal, liberar de forma rápida y completa la o las sustancias constitutivas a una temperatura predeterminada, previamente elegida.

Preferiblemente, el liposoma de acuerdo con la invención se compone de 65 a 75% de dipalmitoil-lecitina (1,2-dipalmitoilglicerol-3-fosfolina), 10 a 30% de diestearoil-lecitina (1,2-diestearoilglicerol-3-fosfolina) y 5 a 10% de

dipalmitoilfosfogliceroglicerol. Esta composición preferida es estable a 37°C en el suero, pero libera rápidamente el contenido al rebasar una temperatura de 40°C.

La composición del liposoma de acuerdo con la invención preferida, precedentemente mencionada, se puede adaptar a medida para otros intervalos de temperaturas mediante la elección de componentes con la temperatura de transformación principal en cada caso adecuada. En la Tabla 1 se indican las temperaturas de transformación principal ( $T_M$ ) de fosfatidilcolinas, cuya temperatura de transformación principal se encuentra en el intervalo de 0 a 80°C. Las temperaturas de transformación principal dependen, tal como se puede reconocer por la Tabla, de la longitud de cadena y de la distribución a lo largo de las posiciones 1 y 2 de glicero-3-fosfocolina o 1 y 3 de glicero-2-fosfocolina.

Tabla 1

$T_M$	Fosfatidilcolina
5°C	1-palmitoil-2-oleoil-
7°C	1-esteraroil-2-oleoil-
11°C	1-palmitoil-2-lauroil-
14°C	1-behenoil-2-oleoil-
17°C	1-esteraroil-2-lauroil-
19°C	1,3-dimiristoil-
23°C	1,2-dimiristoil-
27°C	1-palmitoil-2-miristoil-
33°C	1-estearoil-2-miristoil-
37°C	1-miristoil-2-palmitoil-
39°C	1,3-dipalmitoil-
41°C	1,2-dipalmitoil-
42°C	1-miristoil-2-estearoil-
46°C	1-estearoil-3-miristoil-
48°C	1-esteraroil-2-palmitoil-
52°C	1-palmitoil-2-estearoil-
53°C	1,3-diestearoil-
56°C	1,2-diestearoil-
66°C	1,2-diarquinoil-
75°C	1,2-dibehenoil-
80°C	1,2-dilignoceroil-

Los valores recogidos en la Tabla 1 demuestran que mediante el uso de ácidos grasos con una longitud de cadena no lineal y una distribución adecuada a lo largo de toda la estructura principal del glicerol, se puede ajustar prácticamente cualquier temperatura deseada en el intervalo indicado de 0 a 80°C.

El contenido en fosfatidiloligogliceroles en el liposoma de acuerdo con la invención es esencial para el largo tiempo de circulación requerido en el suero. Fosfatidiloligogliceroles y su preparación se conocen del documento DE 196 22 224. Preferiblemente, se utiliza dipalmitoilfosfogliceroglicerol (DPPG2).

Los liposomas termolábiles de acuerdo con la invención se adecúan extraordinariamente para la aplicación en diferentes sectores, pero en particular en el marco de la hipertermia profunda regional. La hipertermia profunda regional, la cual se aplica en combinación con una quimioterapia sistémica en centros clínicos especializados, se ofrece como técnica ideal para el transporte liposomal específico para el tumor y la subsiguiente liberación de una sustancia medicamentosa a partir de la envuelta liposomal. Así, la hipertermia fomenta, por un lado, la extravasación de liposomas a partir de capilares del tumor en el intersticio (Gaber et al. 1996). Por otra parte, mediante el calentamiento se puede inducir una liberación de la sustancia medicamentosa a partir de liposomas termosensibles especiales (Magin y Niesman 1984). Adicionalmente, existen numerosos indicios para un efecto citotóxico incrementado de agentes citostáticos (Hahn et al. 1975), así como de una inmunomodulación (activación de células NK; Multhoff et al. 1999) mediante hipertermia profunda regional.

La termolabilidad de los liposomas de acuerdo con la invención viene condicionada por la transformación de fases de los fosfolípidos dentro de la membrana de los liposomas. Si se recorre la temperatura de transformación de fases, entonces se produce una breve inestabilidad de la membrana y una subsiguiente liberación del contenido liposomal.

En el caso de la hipertermia regional arriba mencionada, el tumor es sobrecalentado específicamente de forma regional, de manera que la temperatura aumenta por encima de la temperatura límite para la liberación del contenido de los liposomas. Como contenido de los liposomas entran en este caso en consideración, en particular sustancias activas aplicables en oncología tales como, p. ej., citostáticos. Sin embargo, también pueden liberarse agentes de

5 contraste, por ejemplo gadolinio, carboxifluoresceína o similares, solos o junto con una sustancia activa. Mediante el uso de agentes de contraste tal como gadolinio se posibilita una termometría no invasiva a la que la temperatura alcanzada puede ser determinada mediante MRC que mide el gadolinio liberado. En el caso de esta aplicación de los liposomas de acuerdo con la invención se emplea convenientemente un aparato de hipertermia acoplado con un aparato de MRC.

Otro tipo de aplicación para los liposomas de acuerdo con la invención se encuentra en oftalmología. En el caso del encapsulamiento de una sustancia de marcaje fluorescente se puede detectar, p. ej., en el caso de un tratamiento con láser mediante la liberación de la sustancia activa fluorescente tal como, p. ej., carboxifluoresceína donde se ha presentado realmente el sobrecalentamiento pretendido.

10 Análogamente a la posibilidad de empleo explicada en el ojo, los liposomas de acuerdo con la invención pueden por lo tanto utilizarse en general para hacer determinables con posterioridad las temperaturas alcanzadas p. ej., cuando deban comprobarse determinadas temperaturas de calentamiento o similar.

15 Los liposomas de acuerdo con la invención se componen esencialmente de las sustancias arriba indicadas que se presentan preferiblemente en forma pura. Las impurezas deberían mantenerse en un nivel lo más bajo posible, en particular debería estar presente un contenido en colesterol lo más bajo posible. Se prefieren liposomas que estén totalmente exentos de colesterol, dado que el colesterol conduce a un embadurnamiento de la temperatura de transformación de fases y, con ello, a un intervalo de transición térmico amplio.

20 La producción de los liposomas termolábiles de acuerdo con la invención tiene lugar de manera habitual mediante disolución de los lípidos, p. ej., en cloroformo o cloroformo/agua/isopropanol, eliminación del disolvente, convenientemente en vacío en el evaporador rotatorio, maleabilización de los lípidos con disoluciones acuosas de las sustancias constitutivas a encapsular a temperaturas que se encuentran por encima de la temperatura de transformación de fases. La duración de este tratamiento de maleabilización asciende convenientemente a 30 hasta 60 minutos, pero también puede ser menor o superior. Mediante procesos de congelación-descongelación repetidos varias veces, por ejemplo congelación durante 2 a 5 veces y nueva descongelación, tiene lugar una  
25 homogeneización. Finalmente, la suspensión de lípidos obtenida puede extrudirse a través de una membrana de un tamaño de poros definido a una temperatura por encima de la temperatura de transformación de fases, con el fin de alcanzar el tamaño de los liposomas pretendido. Como membrana se adecúan, por ejemplo, membranas de policarbonato de un tamaño de poros definido tal como de 100 a 200 nm. Finalmente, la sustancia constitutiva eventualmente no encapsulada puede ser separada, por ejemplo mediante cromatografía en columna o similar.

30 Los siguientes Ejemplos explican adicionalmente la invención.

Ejemplo 1

a) Del modo arriba descrito se preparan liposomas que están compuestos de 70% de DPPC, 20% de DSPC y 10% de DPPG2. Contienen carboxifluoresceína encapsulada. La carboxifluoresceína libre se separó previamente mediante cromatografía en columna con Sephadex G75.

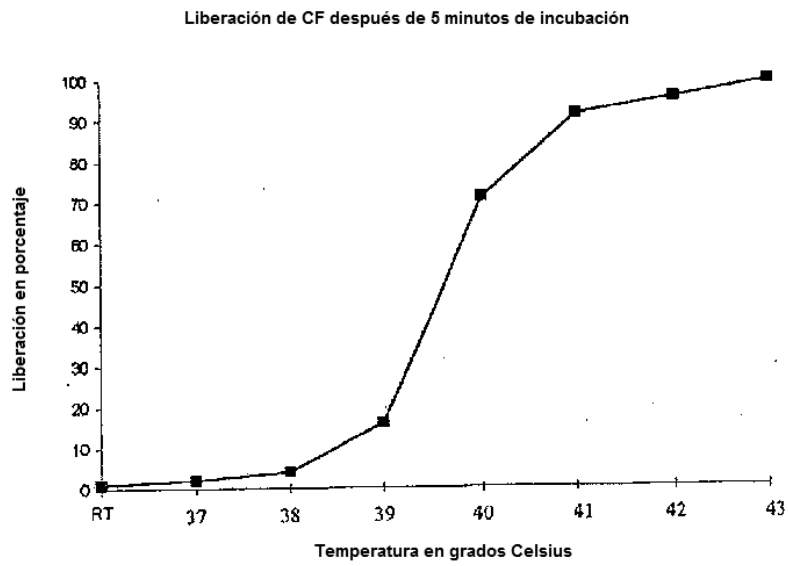
35 b) Modelo de cámara:

Para la detección intravital al microscopio de la liberación de CF a partir de liposomas termolábiles en el campo de la hipertermia se adecúa el modelo de cámara (melanoma A-Mel-3 del hámster sirio) del hámster sirio. En este caso, se implanta a un hámster dorado sirio una cámara en la piel dorsal transparente. Después de la implantación de la cámara en la piel tiene lugar la implantación de células del melanoma A-Mel-3 del hámster al tejido subcutáneo que se encuentra en la cámara. En el espacio de unos pocos días se desarrolla dentro de la piel del lomo del hámster un tumor de varios milímetros de tamaño. La microcirculación así como la acumulación de fluorescencia dentro del tumor puede observarse con un microscopio vital modificado. Los animales reciben adicionalmente un catéter venoso central. Con ayuda de un intercambiador de calor que se encuentra por debajo de la cámara de la piel se puede alcanzar  
40 localmente un calentamiento del tumor hasta 42°C. La temperatura del tumor puede medirse directamente con ayuda de una sonda de temperatura (Endrich 1988).

Junto a la microscopía vital está también establecido el proceso de la medición MRT en el Modelo de cámara (Pahernik et al. 1999). En este caso, se pueden tomar imágenes de MRT análogamente a la microscopía.

Los valores obtenidos los muestra in vitro la Tabla 2.

50 **A) in-vitro**



*Composición de liposomas:*

DPPG:DSPC:DPPG-G2 = 7:2:1

Gran estabilidad en presencia de suero a 37°C (liberación de CF después de 12 horas < 7%).

**REIVINDICACIONES**

1. Liposoma termolábil con una temperatura de liberación regulada para el contenido del liposoma, caracterizado por que esencialmente está formado por al menos una fosfatidilcolina con una temperatura de transformación principal que se encuentra en el intervalo de 0 a 80°C, y 2 a 15% en peso de fosfatidiloligoglicerol, y está exento de colesterol.
- 5 2. Liposoma según la reivindicación 1, caracterizado por que contiene al menos una fosfatidilcolina elegida del grupo que se compone de 1-palmitoil-2-olioilglicero-3-fosfocolina, 1-estearoil-2-olioil-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-lauroilglicero-3-fosfocolina, 1-behenoil-2-olioilglicero-3-fosfocolina, 1-estearoil-2-lauroilglicero-3-fosfocolina, 1,3-dimiristoilglicero-2-fosfocolina, 1,2-dimiristoilglicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-miristoilglicero-3-fosfocolina, 1-estearoil-2-miristoilglicero-3-fosfocolina, 1-miristoil-2-palmitoilglicero-3-fosfocolina, 1,3-palmitoilglicero-2-fosfocolina, 1,2-dipalmitoilglicero-3-fosfocolina, 1-miristoil-2-estearoilglicero-3-fosfocolina, 1-estearoil-3-miristoilglicero-2-fosfocolina, 1-estearoil-2-palmitoilglicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-estearoilglicero-3-fosfocolina, 1,3-diestearoilglicero-2-fosfocolina, 1,2-diestearoilglicero-3-fosfocolina, 1,2-diarquinoilglicero-3-fosfocolina, 1,2-dibehenoilglicero-3-fosfocolina y 1,2-dilignoceroilglicero-3-fosfocolina.
- 10
3. Liposoma según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que en calidad de fosfatidiloligoglicerol contiene dipalmitoilfosfoglicerol-glicerol.
- 15
4. Liposoma según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que se compone esencialmente de 65 a 75% de dipalmitoil-lecitina (DPPC), 15 a 25% de diestearoil-lecitina (DSPC) y 5 a 10% de dipalmitoilfosfogliceroglicerol (DPPG2).
- 20
5. Liposoma según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que contiene un principio activo y/o una sustancia de marcaje.