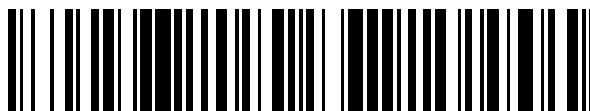


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 698**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2009 E 09851784 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2508170**

54 Título: **Liposoma de irinotecán o su clorhidrato y método de preparación del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.10.2015

73 Titular/es:

JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (50.0%)
145 Renmin Eastern Road Xinpu District
Lianyungang, Jiangsu 222002, CN y
SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO.
LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

TONG, XINYONG;
LEI, GUOFENG;
YU, CHENGXIA y
CHEN, LIANG

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 547 698 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 de irinotecán o su clorhidrato y método de preparación del mismo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un liposoma de irinotecán o su clorhidrato y método de preparación del mismo, y una inyección que comprende el citado liposoma y método de preparación de la misma.

Antecedentes de la invención

10 El irinotecán es un derivado semisintético de la camptotecina. La camptotecina se puede unir específicamente a la topoisomerasa I, que puede inducir roturas de una sola hebra de ADN reversibles, y luego desenvolver la estructura de hebra doble de ADN. El irinotecán y su metabolito SN-38 activo se puede unir al complejo ADN-topoisomerasa I, impidiendo de este modo la re-conexión de la fractura de una sola hebra. Se ha demostrado que la citotoxicidad del irinotecán se puede atribuir a la interacción de la replicasa y de los complejos triples topoisomerasa I-ADN-irinotecán (o SN-38), que rompe ADN de doble hebra en la síntesis de ADN.

15 El clorhidrato de irinotecán se utiliza ampliamente en el tratamiento de tumor maligno con las ventajas de los efectos farmacológicos obvios y la eficacia clínica. Sin embargo, tiene el mismo problema con otros derivados de la camptotecina: el anillo de lactona saturada en la estructura de irinotecán es dependiente del pH y se puede transformar en su forma carboxilato de forma reversible en condiciones fisiológicas, por lo cual se debilitaría la actividad anti-tumor. Las formulaciones comerciales existentes de clorhidrato de irinotecán son en inyección de líquido y polvo liofilizado para inyección. Después de la administración intravenosa en clínica, el fármaco libre perderá la actividad debido a que el anillo de lactona en su estructura es propenso a ser hidrolizado en la forma carboxilato en el ambiente fisiológico
20 alcalina, reduciendo así la eficacia del fármaco indirectamente. Y estas formulaciones tienen efectos secundarios graves, que son principalmente la neutropenia y diarrea tardía.

25 El liposoma es ampliamente estudiado como un portador de fármacos en los últimos años. Las principales características de los liposomas incluyen la protección del fármaco encapsulado, el aumento de la estabilidad del fármaco, cambiando el comportamiento de distribución in vivo del fármaco, y llevando el fármaco a la región enferma por orientación pasiva o activa. Como buen portador de fármacos contra el cáncer, el liposoma puede mejorar la eficacia del fármaco y reducir la toxicidad del fármaco.

30 La solicitud internacional WO2005/117878 revela una formulación de liposoma de irinotecán y el método de preparación de los mismos. Esta formulación comprende irinotecán o clorhidrato de irinotecán, fosfolípido seleccionado del grupo que consiste en fosfatidilcolina de soja hidrogenada, fosfatidiletanolamina, lecitina y cardiolipina, y el colesterol. Del mismo modo, la solicitud de patente china CN1994279A también revela una formulación de liposoma de irinotecán y el método de preparación de los mismos, en donde la fosfatidilcolina se utiliza como un fosfolípido para preparar un liposoma en el Ejemplo 5.

Chou et al (Effect of Composition on the Stability of Liposomal Irinotecan Prepared by a pH Gradient Method; Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol 95, No 4, 405-408, 2003) revela liposomas de irinotecán con HSPC/Col de 100:30.

35 Las formulaciones mencionadas en la literatura de patentes anteriores pueden lograr buenos resultados. Sin embargo, cuando se utilizan esas formulaciones en humanos, la estabilidad, tamaño de partícula y similares son todavía insatisfactorios.

Descripción de la invención

40 La presente invención proporciona un liposoma de irinotecán o clorhidrato de irinotecán, que tiene una mayor capacidad de carga del fármaco, alta eficiencia de encapsulación, una buena estabilidad y es apropiado para ser preparado en una formulación.

45 Hasta ahora, algunas publicaciones (por ejemplo, la solicitud internacional WO2005/117878 y CN1994279A) han descrito los métodos de composición y preparación de liposomas de irinotecán. En alguna formulación de ellos algunos índices tuvieron buen resultado. Sin embargo, no hay ninguna información acerca de la estabilidad y el control del tamaño de partícula. Después de otro estudio del liposoma, fue sorprendente encontrar que la cantidad del colesterol en particular tenía un impacto en el tamaño de las partículas y en la estabilidad del liposoma cuando el tipo seleccionado del ingrediente inactivo y la cantidad utilizada en la formulación cumplen algunas condiciones. Se preparó con éxito un liposoma con una distribución del tamaño de partícula pequeña y uniforme y se mejoró su estabilidad mediante el control de la relación entre el fosfolípido neutro y el colesterol. En comparación con otras formulaciones, el liposoma de
50 la presente solicitud tiene mayor estabilidad de almacenamiento, y otros indicadores también mejoraron significativamente, además, en comparación con las tecnologías descritas en la solicitud internacional WO2005/117878 y CN1994279A, estos productos no comprenden un compuesto con un grupo funcional básico y un lípido catiónico. Y el liposoma de la presente invención tiene un buen efecto anti-tumoral y algunas ventajas de formulación simple, de alta capacidad de carga del fármaco y una buena estabilidad de almacenamiento.

5 El liposoma de la presente invención comprende irinotecán o clorhidrato de irinotecán, un fosfolípido neutro y el colesterol, y la relación en peso del colesterol con el fosfolípido neutro es 1: 3 ~ 5, preferiblemente 1: 3.5 ~ 4.5, más preferiblemente 1: 4, caracterizado porque la citada relación en peso del fosfolípido neutro con el irinotecán o clorhidrato de irinotecán es de 2-5: 1, preferiblemente 2.5-4: 1 y porque el citado fosfolípido neutro comprende fosfatidilcolina de soja hidrogenada.

10 El fosfolípido neutro utilizado en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), fosfatidilcolina de huevo (EPC), fosfatidilcolina de soja (SPC) y similares. El efecto se convierte en el mejor cuando la fosfatidilcolina de soja hidrogenada se utiliza como un fosfolípido neutro. La capacidad de carga del fármaco del liposoma se puede mejorar en gran medida cuando la relación en peso del fármaco con el fosfolípido se ajusta adicionalmente de la siguiente manera:

irinotecán o clorhidrato de irinotecán	1
fosfolípido neutro	2~5, preferiblemente 2.5-4

15 El liposoma de la presente invención se puede preparar por métodos convencionales de preparación de liposomas en la técnica, preferiblemente por el método de gradiente iónico. Cuando se usa el método de gradiente de iones, no hay gradiente de iones, formado por una solución reguladora entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del citado liposoma. Preferiblemente, la fase acuosa interna del citado liposoma tiene una mayor concentración de iones de la fase acuosa externa, que puede mejorar la estabilidad del tamaño de partícula del liposoma durante el período de almacenamiento, mantener mejor la eficacia del fármaco, y ser capaz de controlar el tamaño medio de partícula del liposoma pequeño y uniforme, permitir que el cambio en el tamaño de partícula de liposoma se reduzca al mínimo durante el período de almacenamiento.

20 En la presente invención, el cambio en el tamaño de partícula del liposoma durante el período de almacenamiento se puede reducir al mínimo mediante la adición de un derivado lipídico de polímero hidrófilo a la formulación. Y, el tiempo de ciclo del liposoma in vivo se puede extender a través de la adición de un derivado de polietilenglicol en la formulación. El derivado de polietilenglicol se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol 2000-diestearoil fosfatidil etanolamina (DSPEPEG₂₀₀₀), polietilenglicol 5000-diestearoil fosfatidil etanolamina, polietilenglicol 2000-dipalmitoil fosfatidil etanolamina, polietilenglicol 5000-dipalmitoil fosfatidil etanolamina. Con el fin de mejorar la eficacia a largo plazo del fármaco, se prefiere que se adicione a los liposomas en la presente invención un derivado lipídico de polímero hidrófilo. Basándose en esta relación de terminación, DSPE-PEG₂₀₀₀ tiene el efecto más obvio. La relación en peso preferida del derivado lipídico con el irinotecán o clorhidrato de irinotecán es 0.2 ~ 0.4.

30 El liposoma puede comprender además un fosfolípido cargado seleccionado del grupo que consiste en fosfatidilglicerol dilaurilo, fosfatidilglicerol dipalmitoil, diestearoil fosfatidil glicerol, fosfatidilglicerol dimiristato, ácido dioleico fosfatidilserina, dioleoil fosfatidilglicerol, ácido dilaurilo fosfatídico, ácido fosfatídico dimiristato, ácido diestearoil fosfatídico y una mezcla de los mismos, y la relación en peso del fosfolípido cargado para el fosfolípido neutro es 1: 5 ~ 1: 100.

Preferiblemente, el liposoma de la presente invención comprende las siguientes relaciones en peso de ingredientes:

clorhidrato de irinotecán	1
fosfatidilcolina de soja hidrogenada	3.4-3.8
polietilenglicol 2000-diestearoil fosfatidil etanolamina	0.34-0.38
colesterol	0.8-0.95,
y la relación de colesterol a fosfatidilcolina de soja hidrogenada es	1: 4.

35 La presente invención también proporciona un método de preparación del liposoma de irinotecán o clorhidrato de irinotecán. El liposoma de la presente invención se puede preparar por un método convencional de preparación de liposomas. La persona experta en la técnica puede elegir una variedad de métodos para preparar el liposoma de acuerdo con la formulación proporcionada por la presente invención. Para la formulación del liposoma en la presente invención, preferiblemente se selecciona el método de preparación de gradiente iónico. El método de preparación comprende las siguientes etapas de:

1) Preparación de un liposoma blanco por uno cualquiera de los siguientes métodos A a D:

A. disolver un fosfolípido neutro y el colesterol en etanol anhidro o un solvente mixto de etanol anhidro y tert-butil alcohol de acuerdo con la formulación deseada, mezclar la mezcla con una solución reguladora para obtener un liposoma blanco en bruto, después retirar el etanol a través de destilación a presión reducida, y a continuación, preparar un

- liposoma blanco con el tamaño de partícula deseado, mediante el uso de homogeneizador de alta presión y/o un equipo de extrusión;
- 5 B. disolver un fosfolípido neutro y colesterol en cloroformo o un solvente mixto de cloroformo-metanol de acuerdo con la formulación deseada, formar una película de lípido a través de evaporador rotatorio, adicionar una solución reguladora de hidratación para obtener un liposoma blanco en bruto, y luego preparar un liposoma blanco con el tamaño de partícula deseado mediante el uso de un homogeneizador de alta presión y/o un equipo de extrusión:
- 10 C. mezclar un fosfolípido neutro, colesterol y una solución reguladora de acuerdo con la formulación deseada, a continuación, preparar el irinotecán o un liposoma blanco con el tamaño de partícula deseado, utilizando un homogeneizador de alta presión y/o un equipo de extrusión;
- 15 D. disolver un fosfolípido neutro y el colesterol en etanol anhidro o un solvente mixto de etanol anhidro y tert-butil alcohol de acuerdo con la formulación deseada, mezclar la mezcla con una solución reguladora, y luego preparar un liposoma blanco con el tamaño de partícula deseado mediante el uso de homogeneizador de alta presión y/o un equipo de extrusión;
- 2) formación del gradiente iónico entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del liposoma blanco: sustituir la fase acuosa externa del liposoma blanco para formar un gradiente iónico entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del liposoma blanco;
- 3) preparación de un liposoma cargado con un fármaco: preparar una solución acuosa de clorhidrato de irinotecán, adicionarla a la dispersión de liposomas blanco con gradiente iónico, y luego incubar la dispersión para obtener el liposoma cargado con un fármaco con calentamiento y agitación.
- 20 Después de la citada etapa 3) de preparación del liposoma cargado con un fármaco", el citado método también puede comprender la siguiente etapa de:
- 4) eliminación del fármaco libre y la concentración de la muestra: adicionar un medio de solución reguladora al liposoma de clorhidrato de irinotecán, eliminar el fármaco no encapsulado mediante el uso de dispositivo de flujo tangencial, y concentrar la muestra a un volumen apropiado.
- 25 La presente invención también proporciona una inyección de liposoma que comprende el liposoma anteriormente. Cuando un liposoma se prepara para una inyección apropiada para uso humano, es beneficioso adicionar un estabilizador. El estabilizador usado en la presente invención puede ser un estabilizador convencional, tal como la vitamina E, ácido etilendiaminatetracético, y así sucesivamente. El estabilizador es útil para la estabilidad de la formulación. Para la formulación descrita anteriormente, el estudio sobre el estabilizador muestra que el ácido etilendiaminotetraacético o su sal tienen el mejor efecto en relación con otros estabilizadores. Son beneficiosos para mejorar la estabilidad del liposoma. A tal grado el estabilizador puede ser el ácido etilendiaminatetracético, ácido etilendiamina tetraacético disódico y ácido etilendiamina tetraacético dicálcico o una mezcla de los mismos. La relación del estabilizador adicionado es 0 ~ 0.5% (peso/v), y el mínimo no es 0%.
- 30 La composición de la presente invención comprende preferiblemente un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en antioxidante soluble en agua y antioxidante soluble en aceite, en donde el citado antioxidante soluble en aceite se selecciona entre el grupo que consiste en α -tocoferol, α -tocoferol succinato, acetato de α -tocoferol y una mezcla de los mismos, en donde el citado antioxidante soluble en agua se selecciona entre el grupo constituido por ácido ascórbico, bisulfito de sodio, sulfito de sodio, pirosulfito de sodio, L-cisteína y una mezcla de los mismos. La relación del antioxidante adicionado es 0 ~ 0.5% (peso/v), y el mínimo no es 0%.
- 35 La inyección puede estar en la forma de líquido o polvo liofilizado para inyección. La formulación puede comprender un regulador de presión osmótica seleccionado del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, sorbitol, manitol, cloruro de sodio, glicerina, histidina y su clorhidrato, glicina y su clorhidrato, lisina, serina, ácido glutámico, arginina, valina y una mezcla de los mismos. La relación del regulador de presión osmótica adicionado es 0 ~ 5% (peso/v), y el mínimo no es 0%.
- 40 Para la formulación en forma de polvo liofilizado para inyección, la inyección comprende además un lioprotector, y después de la inyección se prepara a la potencia liofilizada para inyección después de la liofilización. El lioprotector se selecciona del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, trehalosa, manitol, dextrano, lactosa y una mezcla de los mismos.
- 45 La inyección de liposomas preferible de la presente invención comprende la siguiente relación en peso de los ingredientes:
- 50
- | | |
|--------------------------------------|---------|
| clorhidrato de irinotecán | 1 |
| fosfatidilcolina de soja hidrogenada | 3.4-3.8 |

ES 2 547 698 T3

polietilenglicol 2000-diestearoil fosfatidil etanolamina	0.34-0.38
colesterol	0.8 a 0.95
ácido etilendiamina tetraacético disódico	0.05-0.09,
y la relación de colesterol a fosfatidilcolina de soja hidrogenada es	1: 4.

El método de preparación de la inyección descrito anteriormente comprende las siguientes etapas de:

l) preparación del liposoma blanco por uno cualquiera de los siguientes métodos A a D:

5 A. disolver un fosfolípido neutro y el colesterol en etanol anhidro o un solvente mixto de etanol anhidro y tert-butil alcohol de acuerdo con la formulación deseada, mezclar la mezcla con una solución reguladora para obtener un liposoma blanco en bruto después de retirar el etanol a través de destilación a presión reducida, y a continuación, preparar el liposoma blanco con el tamaño de partícula deseado mediante el uso de homogeneizador de alta presión y/o un equipo de extrusión:

10 B. disolver un fosfolípido neutro y colesterol en cloroformo o un solvente mixto de cloroformo-metanol de acuerdo con la formulación deseada, formando una película de lípido a través de evaporador rotatorio, adicionar una solución reguladora de hidratación para obtener un liposoma blanco en bruto, y luego preparar un liposoma blanco con el tamaño de partícula deseado mediante el uso de un homogeneizador de alta presión y/o un equipo de extrusión;

15 C. mezclar un fosfolípido neutro, colesterol y una solución reguladora de acuerdo con la formulación deseada, a continuación, preparar un liposoma blanco con el tamaño de partícula deseado utilizando un homogeneizador de alta presión y/o un equipo de extrusión:

20 D. disolver un fosfolípido neutro y el colesterol en etanol anhidro o un solvente mixto de etanol anhidro y tert-butil alcohol de acuerdo con la formulación deseada, mezclar la mezcla con una solución reguladora, y luego preparar un liposoma blanco con el tamaño de partícula deseado mediante el uso de homogeneizador de alta presión y/o un equipo de extrusión;

2) formación de gradiente iónico entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del liposoma blanco: sustituir la fase acuosa externa del liposoma blanco para formar un gradiente iónico entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del liposoma blanco:

25 3) preparación de un liposoma cargado con un fármaco: preparar una solución acuosa de clorhidrato de irinotecán, adicionarla a la dispersión de liposomas blanco con gradiente iónico, y luego incubar la dispersión para obtener el liposoma cargado con un fármaco con calentamiento y agitación. Después de la citada etapa 3) de preparación del liposoma cargado con un fármaco, el citado método también puede comprender la siguiente etapa de:

4) eliminación del fármaco libre y la concentración de la muestra: adicionar un medio de solución reguladora al liposoma de clorhidrato de irinotecán, eliminar el fármaco no encapsulado mediante el uso de dispositivo de flujo tangencial y concentrar la muestra a un volumen apropiado.

30 Después de que se obtuvo el liposoma, la concentración del fármaco se ajusta diluyendo a volumen medido: el liposoma se esteriliza por filtración, luego se llena y se sella para obtener la inyección de liposomas. O después se adiciona un lioprotector a la muestra de fármaco de liposoma, la concentración del fármaco se ajusta diluyendo al volumen medido, el liposoma se esteriliza por filtración, luego se llena, se sella y se liofiliza para obtener el polvo liofilizado para inyección de liposomas.

35 Los efectos beneficiosos de la presente invención:

40 La formulación de liposomas de irinotecán o clorhidrato de irinotecán ha superado muchas deficiencias de los productos y las tecnologías existentes. La estabilidad del fármaco se puede mejorar mediante la encapsulación de fármacos en la fase acuosa interna de los liposomas. Debido a que el fármaco está en forma de anillo de lactona in vivo, la concentración del metabolito activo SN-38 se mantiene durante mucho tiempo en el plasma. En términos generales, la formulación de liposomas de irinotecán o clorhidrato de irinotecán puede aumentar la eficacia de la formulación y reducir los efectos secundarios de los fármacos.

45 La formulación de liposomas de irinotecán o clorhidrato de irinotecán de la presente invención ha resuelto el problema de la baja capacidad de carga del fármaco en los liposomas mediante el control de la relación específica entre el fármaco, fosfolípidos y colesterol. La relación del fármaco con el lípido en la inyección de liposomas es más de 0.25 (peso/peso), y la eficiencia de encapsulación es superior al 90%, preferiblemente más del 95%. El liposoma preparado por la presente invención tiene un tamaño de partícula más pequeño y mejora la estabilidad mediante la optimización de la dosis de colesterol y fosfolípido. Mediante la selección del estabilizador, un cierto porcentaje de sales de ácido

5 etilendiaminotetraacético se adiciona preferiblemente a la formulación para mejorar la estabilidad del liposoma de manera significativa, y la distribución del tamaño de partícula del liposoma es uniformemente en el intervalo de 10 nm ~ 220 nm. Los resultados del experimento factor de influencia en la inyección de liposomas de irinotecán o clorhidrato de irinotecán muestran que el tamaño de las partículas y la eficiencia de encapsulación de la muestra no tiene cambio significativo cuando se colocaron a 40 °C, durante 10 días, y los índices de todos cumplen con los requisitos. En comparación con las formulaciones disponibles comercialmente, la inyección de liposomas de irinotecán o clorhidrato de irinotecán tiene un aumento significativo en la tasa de inhibición tumoral y una disminución significativa en su toxicidad.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 muestra la distribución de tamaño de partícula de la inyección de liposomas de irinotecán o clorhidrato de irinotecán, de acuerdo con la presente invención.

La figura 2 muestra la morfología de la inyección de liposomas de irinotecán o clorhidrato de irinotecán, de acuerdo con la presente invención.

La figura 3 muestra los resultados de la prueba in vivo de efecto contra el cáncer de la inyección de liposomas de irinotecán o clorhidrato de irinotecán, de acuerdo con la presente invención.

15 Realizaciones preferidas

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar adicionalmente la invención, pero de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1

Formulación:

clorhidrato de irinotecán	0.28g	0.28g	0.28g	0.28g	0.28g
fosfatidilcolina de soja hidrogenada	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g
colesterol	0.4g	0.33g	0.25g	0.2g	0.167g
DSPE-PEG ₂₀₀₀	0.1g	0.1g	0.1g	0.1g	0.1g
sulfato de amonio	5g	5g	5g	5g	5g
cloruro de sodio	0.45 g	0.45 g	0.45 g	0.45 g	0.45 g
colesterol: fosfolípido	1:2.5	1:3	1:4	1:5	1:6
agua inyectable	hasta el volumen requerido				

20

Método de preparación;

25 La fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) y el colesterol (CHOL) de la cantidad de formulación se disolvieron en una cantidad adecuada de etanol anhidro, la solución de lípidos resultante se mezcló con solución de sulfato de amonio (100 ml), el etanol se eliminó por destilación a presión reducida, y luego se obtuvo el liposoma blanco en bruto. Después de 5 ciclos de homogeneización en un homogeneizador de alta presión (1000 bar), el tamaño de partícula de los liposomas se controló mediante la extrusión de los liposomas en el equipo de extrusión (dos membranas de extrusión de 0.1 μm en un equipo de extrusión, extrusión de cinco veces), y luego se adicionó solución acuosa de DSPE-PEG₂₀₀₀. Bajo agitación, la mezcla se incubó durante 20 minutos. El liposoma blanco fue dializado, utilizando un dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial con complementario continuo de agua inyectable en el curso, a continuación, se obtiene finalmente el liposoma blanco.

30

35 La solución acuosa de clorhidrato de irinotecán se preparó con agua inyectable y se adicionó a la dispersión de liposomas blanco con gradiente de iones anterior de acuerdo con la relación en peso de clorhidrato de irinotecán a HSPC 1: 3.5. Bajo agitación, la mezcla se calentó a 60 °C y se incubó durante 20 minutos, y luego se obtuvo el liposoma cargado con un fármaco. El fármaco no encapsulado se eliminó mediante el uso del dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial. Se adicionaron 0.45 g de cloruro de sodio para ajustar la presión osmótica, después la muestra se concentró a aproximadamente 50 ml. Después la concentración del fármaco se ajustó por dilución al volumen medido, el liposoma se esterilizó por filtración con filtro de 0.22 μm, se llenó bajo la protección de nitrógeno, y se selló en una botella pequeña. Finalmente se obtuvo la inyección de liposomas de clorhidrato de irinotecán.

ES 2 547 698 T3

El cambio en el tamaño de partícula de cada formulación se muestra en la tabla a continuación. Los resultados indicaron que el tamaño de partícula de la muestra era la más pequeña cuando la relación en peso del fosfolípido con el colesterol era 4: 1,

HSPC:CHOL	Procedimiento de Preparación	tamaño medio de partícula
	Tiempos en directo de la extrusión	
6: 1	Después de la homogeneización	138.7
	0.1µm, extrusión de cinco veces	92.26
5: 1	Después de la homogeneización	136.2
	0.1µm, extrusión de cinco veces	89.5
4: 1	Después de la homogeneización	123.4
	0.1µm, extrusión de cinco veces	87.26
3: 1	Después de la homogeneización	145.1
	0.1 µm	93.4
2.5: 1	Después de la homogeneización	142
	0.1µm, extrusión de cinco veces	98.56

5 La estabilidad de la muestra preparada se investigó a 25 °C en diferentes relaciones en peso del fosfolípido con el colesterol. Los resultados se mostraron en la siguiente tabla. Después se almacenó a 25 °C, durante 60 días, el tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación de la muestra no tenía cambios significativos cuando la relación en peso del fosfolípido con el colesterol era 4: 1. Sin embargo, para las muestras que tengan otras relaciones en peso del fosfolípido con el colesterol, el tamaño de la muestra aumenta y la eficiencia de encapsulación se redujo. Por lo tanto, la estabilidad de la muestra fue mejor cuando la relación en peso del fosfolípido con el colesterol era 4: 1.

10

HSPC : CHOL	Tiempo de almacenamiento (25 °C, día)	Apariencia	Eficiencia de encapsulación %	Tamaño de partículas (z-v) nm	Potencial (mv)	Contenido (mg/ml)	Impurezas totales %	Lisofosfolípido
6:1	0	Blanco crema suspensión	98.86	92.3	-30.5	5.05	0.58	0.39
	30	Blanco crema suspensión	98.56	94.3	-26.8	5.04	0.75	0.56
	60	Blanco crema suspensión	98.20	95.9	-24.9	5.06	0.85	0.66
4:1	0	Blanco crema suspensión	99.37	87.3	-32.1	5.10	0.55	0.40
	30	Blanco crema suspensión	99.25	87.5	-30.9	5.11	0.64	0.50
	60	Blanco crema suspensión	99.18	87.8	-28.6	5.09	0.70	0.62
2.5:1	0	Blanco crema suspensión	99.27	98.5	-35.8	5.12	0.60	0.38

ES 2 547 698 T3

HSPC : CHOL	Tiempo de almacenamiento (25 °C, día)	Apariencia	Eficiencia de encapsulación %	Tamaño de partículas (z-v) nm	Potencial (mv)	Contenido (mg/ml)	Impurezas totales %	Lisofosfolípido
	30	Blanco crema suspensión	98.75	100.2	-28.6	5.09	0.73	0.51
	60	Blanco crema suspensión	98.19	101.7	-25.3	5.07	0.84	0.67

Conclusiones:

Teniendo en cuenta todos los índices, se pueden obtener mejores resultados cuando la relación del colesterol con el fosfolípido era de 1: 3 ~ 5, más preferible 1: 4.

5 Ejemplo 2

Formulación:

clorhidrato de irinotecán	0.28g
fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC)	1 g
polietilenglicol 2000-diestearoil	0.1 g
fosfatidiletanolamina (DSPE-PEG ₂₀₀₀)	0.1g
colesterol	0.25 g
DSPE-PEG ₂₀₀₀	0.1g
sulfato de amonio	5g
ácido etilendiaminotetraacético disódico	0.02 g
cloruro de sodio	0.45 g
agua inyectable	hasta el volumen requerido

Método de preparación:

10 La fosfatidilcolina de soja hidrogenada y el colesterol de la cantidad de formulación se disolvieron en una cantidad adecuada de etanol anhidro, la solución de lípidos resultante se mezcló con solución de sulfato de amonio (100 ml), el etanol anhidro se eliminó por destilación a presión reducida, y luego se obtuvo el liposoma blanco en bruto. Después de 5 ciclos de homogeneización en un homogeneizador de alta presión (1000 bar), el tamaño de partícula de los liposomas se controló mediante la extrusión de los liposomas en un equipo de extrusión (dos membranas de extrusión de 0.1µm en un equipo de extrusión, tiempos de extrusión en directo) y, a continuación se adicionó solución acuosa DSPE-PEG₂₀₀₀. Bajo agitación, la mezcla se incubó durante 20 minutos. El liposoma blanco fue dializado utilizando un dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial con complementario continuo de agua inyectable en el curso, entonces 15 finalmente se obtuvo el liposoma blanco.

20 Se preparó una solución acuosa de clorhidrato de irinotecán con agua inyectable y se adicionó a la dispersión de liposomas blanco con el anterior gradiente de iones de acuerdo con la relación en peso de clorhidrato de irinotecán con la HSPC 1: 3,5. Bajo agitación, la mezcla se calentó a 60 °C y se incubó, durante 20 minutos, y luego se obtuvo el liposoma cargado con un fármaco. El fármaco no encapsulado se elimina mediante el uso de dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial. Se adicionaron 0.45 g de cloruro de sodio para ajustar la presión osmótica después la muestra se concentró a aproximadamente 50 ml. Después la concentración del fármaco se ajustó por dilución con el volumen constante, el liposoma se esterilizó por filtración con filtro de 0.22 µm, se llenó bajo la protección de nitrógeno, y se selló en una botella pequeña. Finalmente se obtuvo la inyección de liposomas de clorhidrato de irinotecán.

Ejemplo 3

5 El método de formulación y preparación de liposomas blanco fue el mismo que el del Ejemplo 2, excepto que la relación en peso de clorhidrato de irinotecán con HSPC fue de 1:1.5, 1:2, 1:3.5, 1:4 y 1:5, en el proceso de preparación de liposoma. La eficiencia de encapsulación y tamaño de partícula de la muestra de liposoma de clorhidrato de irinotecán se muestra en la tabla a continuación:

CPT11: HSPC	Eficiencia encapsulación (%)	Contenido de fármaco cargado (mg/ml)	Tamaño de partícula (nm)
1:1.5	83.2	5.11	87.1
1:2	90.8	5.15	86.5
1:3.5	99.4	5.08	85.9
1:4	99.1	4.81	85.4
1:5	99.4	4.25	86.7

10 Se demostró que la eficiencia de encapsulación se redujo significativamente cuando la relación en peso de clorhidrato de irinotecán con HSPC fue de 1: 1.5, y el contenido de carga del fármaco disminuyó notablemente cuando la relación era de 1: 5. No es apropiado preparar formulaciones utilizadas en la aplicación clínica en ambas condiciones. La eficiencia de encapsulación y el contenido de carga del fármaco eran más altos cuando la relación era de 1: 2 ~ 1: 4.

Ejemplo 4

15 El método de formulación y preparación de liposomas blanco y liposoma cargado con un fármaco fue el mismo que el del Ejemplo 2, excepto que la HSPC en la formulación fue sustituida por fosfatidilcolina de huevo (EPC) de alta pureza, fosfatidilcolina de soja de alta pureza (SPC), respectivamente. La estabilidad de la muestra resultante de liposomas se investigó a 25 °C y los resultados se muestran en la tabla a continuación. Los resultados de las pruebas mostraron que la estabilidad de la muestra de liposomas preparada por HSPC era la mejor y los principales índices no tuvieron ningún cambio notable cuando se almacena a 25 °C, durante 2 meses.

Tiempo	Composición PC	Eficiencia de encapsulación (%)	contenido de fármaco cargado (mg/ml)	Tamaño de partícula (nm)
0M	HSPC	99.4	5.08	85.9
	EPC	99.5	5.10	87.5
	SPC	99.2	5.01	86.9
1M	HSPC	99.5	5.10	85.5
	EPC	92.4	5.07	88.2
	SPC	93.9	5.05	87.3
2M	HSPC	98.7	5.07	86.5
	EPC	85.8	5.06	93.2
	SPC	89.6	5.02	91.5

Ejemplo 5

Formulación:

clorhidrato de irinotecán	0.28g
fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC)	1 g
polietilenglicol 2000-diestearoil	0.1 g
fosfatidiletanolamina (DSPE-PEG ₂₀₀₀)	
colesterol	0.25 g
solución salina	50ml
agua inyectable	hasta el volumen requerido

Método de preparación <1>:

5 Método de inyección etanol: fosfatidilcolina de soja hidrogenada, DSPE-PEG₂₀₀₀ y colesterol de la cantidad de formulación se disolvieron en una cantidad adecuada de etanol anhidro, la solución de lípidos resultante se inyectó en solución salina de clorhidrato de irinotecán. El etanol se eliminó por destilación a presión reducida, y luego se obtuvo el liposoma blanco en bruto. El tamaño de partícula del liposoma fue controlado mediante la extrusión de los liposomas en un equipo de extrusión (dos membrana de extrusión de 0.1 µm en un equipo de extrusión, extrusión de cinco veces) después de 5 ciclos de homogeneización en un homogeneizador de alta presión (1000 bar). La concentración del fármaco se ajustó por dilución a volumen medido, el liposoma se esterilizó por filtración con filtro de 0.22 µm, se llenó bajo la protección de nitrógeno, y se selló en una botella pequeña. Finalmente se obtuvo la inyección de liposomas de clorhidrato de irinotecán.

Método de preparación <2>:

15 Método de dispersión de película: fosfatidilcolina de soja hidrogenada, DSPE-PEG₂₀₀₀ y colesterol de la cantidad de formulación se disolvieron en una cantidad adecuada de cloroformo y la solución de lípidos resultante se preparó para la película mediante evaporador rotatorio después se eliminó el cloroformo. La solución salina de clorhidrato de irinotecán se adicionó y la mezcla se incubó durante 1 h. El tamaño de partícula del liposoma fue controlado mediante la extrusión de los liposomas en un equipo de extrusión (dos membranas de extrusión de 0.1 µm en un equipo de extrusión, cinco veces de extrusión) después de 5 ciclos de homogeneización en un homogeneizador de alta presión (1000 bar). La concentración del fármaco se ajustó por dilución al volumen medido, el liposoma se esterilizó por filtración con filtro de 0.22 µm, se llenó bajo la protección de nitrógeno, y se selló en una botella pequeña. Finalmente se obtuvo la inyección de liposomas de clorhidrato de irinotecán.

Se determinaron la eficiencia de encapsulación y tamaño de partícula del liposoma de clorhidrato de irinotecán preparado por el método de preparación <1>, <2> y el Ejemplo 2.

25

Muestra	Eficiencia de encapsulación (%)	Tamaño de partícula (nm)
Ejemplo 2	99.4	85.9
Método de preparación <1>	15.3	87.9
Método de preparación <2>	17.8	90.2

30

Se demostró que el producto diana podría ser preparado por métodos de carga del fármaco pasivos, tales como método de inyección de etanol y método de dispersión de película cuando se prepara el liposoma de clorhidrato de irinotecán. Pero el liposoma preparado por estos métodos tenía baja eficiencia de encapsulación y sólo una pequeña cantidad del fármaco puede ser cargado en el liposoma. En contraste, la muestra preparada por el método de carga del fármaco activo (Ejemplo 2) tenía una alta eficiencia de encapsulación y el contenido de carga del fármaco. Además, la muestra preparada por el método de carga del fármaco activo tenía tamaño de partícula pequeño y uniforme. Así, en la presente invención, se utilizó el método de carga del fármaco activo para preparar el liposoma. Este tuvo muy buenos resultados para preparar el liposoma de clorhidrato de irinotecán por el método de gradiente iónico.

35

Ejemplo 6

Formulación	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Formulación 4
HSPC	1 g	1 g	1 g	1 g
Colesterol	250 mg	250 mg	250 mg	250 mg
PEG ₂₀₀₀ -DSPE	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Vitamina E	/	0.02	/	0.02
EDTA-2Na	/	/	0.02 g	0.02 g
Solución de sulfato de amonio (300 mM)	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Clorhidrato de irinotecán	0.3 g	0.3 g	0.3 g	0.3 g

Método de preparación:

5 Liposoma blanco: la solución de etanol de lípidos se inyectó, y la solución se homogeneizó bajo 1000 bar, 6 veces; extruido 3 veces en 200 nm, 5 veces en 100 nm; se adicionó PEG₂₀₀₀-DSPE y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 60 °C. A continuación, la mezcla se dializó 3 veces con dispositivo de flujo tangencial, 50 ml cada vez, en donde se adicionó vitamina E (VE) al solvente orgánico fosfolípido y se adicionó EDTA a la solución de sulfato de amonio.

10 Liposoma cargado con el fármaco: se prepararon aproximadamente 10 mg/ml de solución acuosa de clorhidrato de irinotecán y se adicionaron a los liposomas blanco, entonces la mezcla se incubó a 60 °C, durante 15 min. La muestra se concentró hasta aproximadamente 50 ml, mediante el uso de dispositivo de flujo tangencial y se obtuvieron 5 mg/ml de la muestra.

Los resultados de estabilidad se muestran en la siguiente tabla. Todos los índices de la muestra no tuvieron un cambio notable cuando se adicionó EDTA solo. Se mejoró la estabilidad del liposoma de manera significativa. Sin embargo, otros estabilizadores no mejoraron significativamente la estabilidad del liposoma.

15

ES 2 547 698 T3

Muestra	Tiempo de almacenamiento (25 °C, día)	Apariencia	Eficiencia de encapsulación %	Tamaño de partículas (z-v) nm	Contenido (mg/ml)	Impurezas totales %	Lisofosfolípido (mg/ml)
HSPC	0	Blanco crema suspensión	99.70	85.6	5.42	0.65	0.40
	30	Blanco crema suspensión	91.51	87.7	5.40	0.74	0.65
HSPC+ VE	0	Blanco crema suspensión	97.10	89.0	5.01	0.48	0.35
	30	Blanco crema suspensión	93.49	93.4	5.03	0.56	0.43
HSPC+ EDTA	0	Blanco crema suspensión	95.67	87.2	4.94	0.56	0.38
	30	Blanco crema suspensión	95.67	86.5	4.98	0.60	0.40
HSPC+ VE+ EDTA	0	Blanco crema suspensión	98.92	89.2	5.55	0.61	0.39
	30	precipitación de partículas	87.31	99.7	5.51	0.61	0.47

Ejemplo 7

Formulación (1):

clorhidrato de irinotecán	0.5g
fosfatidilcolina de soja hidrogenada	1.5 g
colesterol	0.4 g
sulfato de manganeso	10 g
manitol	2.5 g
agua inyectable	hasta el volumen requerido

5 Método de preparación:

Se disolvieron la fosfatidilcolina de soja hidrogenada y el colesterol de la cantidad de formulación en una cantidad adecuada de etanol anhidro y la solución de lípidos resultante se mezcló con solución de sulfato de manganeso (100 ml). Después el etanol anhidro se eliminó por destilación a presión reducida, se obtuvo el liposoma blanco en bruto. El tamaño de partícula del liposoma fue controlada mediante la extrusión de los liposomas en un equipo de extrusión (dos membranas de extrusión de 0.1µm en un equipo de extrusión de extrusión de cinco veces). El liposoma blanco fue dializado utilizando un dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial con complementario continuo de agua inyectable en el curso, se obtuvo entonces el liposoma blanco. La solución acuosa de clorhidrato de irinotecán se preparó con agua inyectable y se adicionó a la dispersión de liposomas blanco con gradiente iónico. Bajo agitación, la mezcla se calentó a 50 °C y se incubó durante 20 minutos, y luego se obtuvo el liposoma cargado con un fármaco. El fármaco no encapsulado se retiró mediante el uso de dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial y luego se adicionaron 2.5 g de manitol para ajustar la presión osmótica. Después la concentración del fármaco se ajustó por dilución con el volumen constante, el liposoma se esterilizó por filtración con filtro de 0.22 µm, y luego se llenó bajo la protección de nitrógeno, y se selló en una botella pequeña. Finalmente se obtuvo la inyección de liposomas de clorhidrato de irinotecán. El tamaño de partícula del liposoma se midió por el analizador de tamaño de nano partículas (89.3nm), y la eficiencia de encapsulación fue del 97.5%.

ES 2 547 698 T3

Formulación (2):

clorhidrato de irinotecán	1 g
lecitina de huevo hidrogenada (HEPC)	3.45 g
colesterol	0.8 g
sulfato de magnesio	10 g
histidina	2.5 g
agua inyectable	hasta el volumen requerido

Método de preparación:

5 Se disolvieron la lecitina de huevo hidrogenada y el colesterol de la cantidad de formulación en una cantidad adecuada de etanol anhidro y la solución de lípidos resultante se mezcló con solución de sulfato de manganeso (100 ml). El tamaño de partícula del liposoma fue controlado mediante la extrusión de los liposomas en un equipo de extrusión (dos membranas de extrusión de 0.1 μm en un equipo de extrusión, extrusión de cinco veces). El liposoma blanco fue dializado utilizando un dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial con complementario continuo de agua inyectable en el curso, a continuación, se obtuvieron los liposomas blanco. La solución acuosa de clorhidrato de irinotecán se preparó con agua inyectable y se adicionó a la dispersión de liposomas blanco con gradiente iónico. Bajo agitación, la mezcla se calentó a 50 °C y se incubó durante 20 minutos, y luego se obtuvo el liposoma cargado con un fármaco. El fármaco no encapsulado se retiró mediante el uso de dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial y la muestra se concentró a aproximadamente 50 ml. A continuación se adicionaron 2.5 g de histidina para ajustar la presión osmótica. Después la concentración del fármaco se ajustó por dilución para el volumen medido, el liposoma se esterilizó por filtración con filtro de 0.22 μm , y luego se llenó bajo la protección de nitrógeno, y se selló en una botella pequeña. Finalmente se obtuvo la inyección de liposomas de clorhidrato de irinotecán. El tamaño de partícula del liposoma se midió por el analizador de tamaño de nanopartículas (87.6nm), y la eficiencia de encapsulación fue del 98.1%.

Formulación (3):

clorhidrato de irinotecán	0.3 g
fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC)	1 g
polietilenglicol 2000-diestearoil fosfatidiletanolamina (DSPE-PEG ₂₀₀₀)	0.05 g
colesterol	0.25 g
sulfato de amonio	5 g
cloruro de sodio	0.45 g
agua inyectable	hasta el volumen requerido

Método de preparación:

20 Se disolvieron fosfatidilcolina de soja hidrogenada y el colesterol de la cantidad de formulación en una cantidad adecuada de etanol anhidro y la solución de lípidos resultante se mezcló con solución de sulfato de amonio (100 ml). Después el etanol anhidro se eliminó por destilación a presión reducida, se obtuvo el liposoma blanco en bruto. Después de 5 ciclos de homogeneización en un homogeneizador de alta presión (1000 bar), se adicionó solución acuosa DSPE-13EG₂₀₀₀. Bajo agitación, la mezcla se incubó durante 20 minutos. El liposoma blanco fue dializado utilizando un dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial con complementario continuo de agua inyectable en el curso, se obtuvo entonces el liposoma blanco. La solución acuosa de clorhidrato de irinotecán se preparó con agua inyectable y se adicionó a la dispersión de liposomas blanco con gradiente iónico. Bajo agitación, la mezcla se calentó a 60 °C y se incubó durante 20 minutos, y luego se obtuvo el liposoma cargado con un fármaco. El fármaco no encapsulado se retiró mediante el uso de dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial y la muestra se concentró a aproximadamente 50 ml. A continuación se adicionó 0.45 g de cloruro de sodio para ajustar la presión osmótica. Después la concentración del fármaco se ajustó por dilución para el volumen medido, el liposoma se esterilizó por filtración con filtro de 0.22 μm , y luego se llenó bajo la protección de nitrógeno, y se selló en una botella pequeña. Finalmente se obtuvo la inyección de liposomas de clorhidrato de irinotecán. El tamaño de partícula del liposoma se midió por el analizador de tamaño de nanopartículas (87.3nm), y la eficiencia de encapsulación fue del 99.2%.

Ejemplo 8 (no de acuerdo con las reivindicaciones)

Formulación:

clorhidrato de irinotecán	0.5 g
fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC)	1 g
fosfolípidos de miocardio (CL)	0.5 g
polietilenglicol 5000-diestearoil fosfatidiletanolamina (DSPE-PEG ₅₀₀₀)	0.5 g
α -tocoferol	0.05 g
colesterol	0.35 g
ácido cítrico	5.76 g
cloruro de sodio	aproximadamente 3.6 g
agua inyectable	hasta el volumen requerido

Método de preparación:

- 5 Fosfatidilcolina de soja hidrogenada, fosfolípidos del miocardio. DSPE-PEG₅₀₀₀, colesterol y α -tocoferol de la cantidad de formulación se disolvieron en una cantidad adecuada de etanol anhidro y la solución de lípidos resultante se mezcló con solución de ácido cítrico (100 ml). Después el etanol anhidro se eliminó por destilación a presión reducida, se obtuvo el liposoma blanco en bruto. Después de 5 ciclos de homogeneización en un homogeneizador de alta presión (1000 bar), el liposoma blanco se dializó mediante el uso de dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial con complementario continua de solución de cloruro de sodio (0.9%. 400 ml) en el curso, a continuación, se obtuvo el
- 10 liposoma blanco. La solución acuosa de clorhidrato de irinotecán se preparó con agua inyectable y se adicionó a la dispersión de liposomas blanco con gradiente iónico. Bajo agitación, la mezcla se calentó a 60 °C y se incubó durante 20 minutos, y luego se obtuvo el liposoma cargado con un fármaco. El fármaco no encapsulado se retiró mediante el uso de dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial y la muestra se concentró a aproximadamente 50 ml. Después la concentración del fármaco se ajustó por dilución con el volumen constante, el liposoma se esterilizó agua inyectable
- 15 hasta el volumen requerido por filtración con filtro de 0.22 μ m, y luego se llenó bajo la protección de nitrógeno, y se selló en una pequeña botella. Finalmente se obtuvo la inyección de liposomas de clorhidrato de irinotecán. El tamaño de partícula del liposoma se midió por el analizador de tamaño de nanopartículas (85.8nm), y la eficiencia de encapsulación fue del 98.6%.

Ejemplo 9 (no de acuerdo con las reivindicaciones)

20 Formulación:

clorhidrato de irinotecán	0.8 g
dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC)	2g
fosfatidilglicerol dipalmitoil (DPPG)	0.2 g
colesterol	0.5 g
ácido cítrico	0.05 g
ácido etilendiaminotetraacético disódico	0.05 g
sulfato de amonio	5 g
cloruro de sodio	aproximadamente 3.6 g
agua inyectable	hasta el volumen requerido

Método de preparación:

5 DPPC, DPPG y colesterol de la cantidad de formulación se disolvieron en una cantidad adecuada de etanol anhidro y la solución de lípidos resultante se mezcló con solución de sulfato de amonio (100 ml, que contiene ácido etilendiamina tetraacético disódico). Después el etanol se eliminó por destilación a presión reducida, se obtuvo el liposoma blanco en bruto. Después de 5 ciclos de homogeneización en un homogeneizador de alta presión (1000 bar), el liposoma blanco se dializó mediante el uso de dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial con complementario continua de solución de cloruro de sodio (0.9%. 400 ml) en el curso, a continuación, se obtuvo el liposoma blanco. La solución acuosa de clorhidrato de irinotecán se preparó con agua inyectable y se adicionó a la dispersión de liposomas blanco con gradiente iónico. Bajo agitación, la mezcla se calentó a 60 °C y se incubó durante 20 minutos, y luego se obtuvo el liposoma cargado con un fármaco. El fármaco no encapsulado se retiró mediante el uso de dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial y la muestra se concentró a aproximadamente 50 ml. Después la concentración del fármaco se ajustó por dilución con el volumen constante, el liposoma se esterilizó por filtración con filtro de 0.22 μm , y luego se llenó bajo la protección de nitrógeno, y ampliarse en una pequeña botella. Finalmente se obtuvo la inyección de liposomas de clorhidrato de irinotecán. El tamaño de partícula del liposoma se midió por el analizador de tamaño de nanopartículas (89.4nm), y la eficiencia de encapsulación fue del 97.2%.

15 Ejemplo 10 (no de acuerdo con las reivindicaciones)

Formulación:

clorhidrato de irinotecán	0.5 g
fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC)	1 g
polietilenglicol 5000-diestearoil fosfatidiletanolamina (DSPE-PEG ₅₀₀₀)	0.1 g
α - tocoferol	0.05 g
colesterol	0.3 g
sulfato de amonio	5 g
cloruro de sodio	aproximadamente 3.6 g
sacarosa	2 g
manitol	1 g
agua inyectable	hasta el volumen requerido

Método de preparación:

20 Se disolvieron fosfatidilcolina de soja hidrogenada, el colesterol y α -tocoferol de la cantidad de formulación en una cantidad adecuada de etanol anhidro y la solución de lípidos resultante se mezcló con solución de sulfato de amonio (100 ml). Después el etanol se eliminó por destilación a presión reducida, se obtuvo el liposoma blanco en bruto. Después de los ciclos de homogeneización en un homogeneizador de alta presión (1000 bar), el liposoma se extruyó en equipo de extrusión (cinco membranas de extrusión de 100 nm en un equipo de extrusión, extrusión de cinco veces). A continuación, se le adicionó una solución acuosa de DSPE-PEG₅₀₀₀, y la mezcla se incubó con agitación durante 20 minutos. El liposoma blanco fue dializado utilizando un dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial con complementario continua de una solución de cloruro de sodio (0.9%. 400 ml) en el curso, se obtuvo entonces el liposoma blanco. La solución acuosa de clorhidrato de irinotecán se preparó con agua inyectable y se adicionó a la dispersión de liposomas blanco con gradiente iónico. Bajo agitación, la mezcla se calentó a 60 °C y se incubó durante 20 minutos, y luego se obtuvo el liposoma cargado con un fármaco. El fármaco no encapsulado se retiró mediante el uso de dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial y la muestra se concentró a aproximadamente 50 ml. A continuación, se añadieron sacarosa y manitol a la mezcla y se mezclaron homogéneamente. Después la concentración del fármaco se ajustó por dilución con el volumen constante, el liposoma se esterilizó por filtración con filtro de 0.22 μm , y luego se llenó en la botella de penicilina y se liofilizó. Finalmente se obtuvo el polvo liofilizado para inyección de liposomas de clorhidrato de irinotecán. El tamaño de partícula del liposoma se midió (90.8nm) después de la hidratación del polvo liofilizado para inyección, y la eficiencia de encapsulación fue del 97.5%.

35 Experimento 1

Tomar el producto del Ejemplo 2, como un ejemplo para estudiar las características fisicoquímicas o el producto obtenido de acuerdo con la presente invención:

[Distribución del tamaño de partícula]: La cantidad apropiada de la muestra se diluyó con agua y después se midió por método de dispersión dinámica de la luz (DLS). Longitud de onda de detección: $\lambda = 633 \text{ nm}$: Ángulo de detección: 173 °;

temperatura de detección: 25 °C. Tamaño de partícula fue representado por intensidad. La distribución del tamaño de partícula se muestra en la figura 1. El tamaño medio de las partículas fue 85.9 nm.

5 [Morfología]: La cantidad adecuada de la muestra diluida fue dibujada, una malla de cobre se colocó sobre un papel de filtro limpio, la muestra se deja caer sobre la malla de cobre, se tiñó con ácido fosfotúngstico, y se observó con el microscopio electrónico de transmisión (TEM, JEM2010, Japón Electronics Co., Ltd.) después de seco. La morfología se muestra en la figura 2. La aparición de liposoma clorhidrato de irinotecán fue estructura de bicapa típica y la mayoría del tamaño de partícula fue por debajo de 200 nm. Es coherente con el resultado medido por dispersión de luz dinámica.

10 [Eficiencia de encapsulación]: Método para la determinación del contenido de fármacos: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.63150 mm, 5 μm); fase móvil: acetonitrilo - solución reguladora KH₂PO₄ 0.05 M (el valor de pH se ajustó a 4, que contiene 1% de trietilamina) = 20: 80; temperatura de la columna: 40 °C; volumen de inyección: 20 μl; velocidad de flujo: 1.0 ml/min.

Método para la detección de eficiencia de encapsulación:

15 1 mL de solución de muestra se pipetearon en un matraz aforado de 10 ml y se diluyó con agua hasta la marca. Luego se agitó homogéneamente y ultrafiltró con el ultrafiltro 8010 (empresa MILLIPORE). El filtrado inicial se desechó y el filtrado subsiguiente se reservó como la solución de muestra. 20 μl de solución de la muestra y el control se inyectaron por cromatografía de líquidos y se registró el cromatograma. El contenido del fármaco libre de la formulación se calculó por el método de normalización externa, registrado como W. La cantidad total de fármaco en este producto se calculó mediante un método de determinación del contenido, registrado como W₀. La eficiencia de encapsulación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{W_0 - W}{W_0} \times 100\%$$

20

Resultados de la determinación: La eficiencia de encapsulación del producto fue de 99.4%.

[Prueba de factores de impacto]: Los factores de impacto fueron investigados colocando el producto en diferentes condiciones.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Condiciones	Tiempo de almacenamiento (días)	Apariencia	pH	Tamaño de partículas (nm)	Contenido (%)	Eficiencia de encapsulación %	impurezas totales %	Lisofosfolípido (mg/ml)
Iluminación 4500l±6500l x	0	Blanco crema suspensión	6.39	85.9	98.14	99.40	0.43	0.19
	5	Amarillo tierra suspensión	6.30	86.3	78.99	99.11	14.4	0.23
	10	Amarillo tierra suspensión	6.40	86.5	76.39	99.20	19.5	0.30
40°C	0	Blanco crema suspensión	6.39	85.9	98.14	99.40	0.43	0.19
	5	Blanco crema suspensión	6.35	87.1	98.77	99.29	0.45	0.29
	10	Blanco crema suspensión	6.47	88.7	98.86	96.82	0.55	0.44

ES 2 547 698 T3

Condiciones	Tiempo de almacenamiento (días)	Apariencia	pH	Tamaño de partículas (nm)	Contenido (%)	Eficiencia de encapsulación %	impurezas totales %	Lisofosfolípido (mg/ml)
Temperatura baja	3 ciclos	Blanco crema suspensión	6.41	89.1	100.07	99.16	0.44	0.38
Congelar y descongelar	3 ciclos	Blanco suspensión	6.38	110.5	95.22	99.28	0.46	0.23

- 5 El resultado se demostró que la muestra fue sensible a la luz. Bajo una luz brillante, la aparición de la muestra se volvió de color amarillo, el contenido disminuyó y las sustancias relacionadas se incrementaron significativamente. La eficiencia de encapsulación y el tamaño de partícula de la muestra no tuvieron cambio notable a los 40 °C, mientras que las sustancias relacionadas se incrementaron un poco. Partículas de gran tamaño se han generado en la muestra a condiciones de baja temperatura o de congelación-descongelación. Teniendo en cuenta la inestabilidad del fosfolípido a alta temperatura y los resultados de la prueba de la prueba de factores de impacto, el producto debe ser almacenado bajo condiciones de baja temperatura y oscuridad.

[Prueba de eficacia terapéutica antitumoral in vivo]

- 10 Nombre del medicamento: El liposoma de clorhidrato de irinotecán (CPT-11 liposoma) (preparado de acuerdo con el Ejemplo 2) fue proporcionado por Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., LTD.. La inyección de clorhidrato de irinotecán (CPT-11) fue proporcionada por Jiangsu Hengrui Medicina Co., LTD ..

Métodos de preparación: El fármaco se diluyó con solución salina a la concentración requerida.

- 15 Animales de experimentación: ratones BALB/ca-desnudos, 6-7 semanas, ♀, comprados a Shanghai Slac Laboratorio Animal Co., LTD.. Certificado No.: SCXK (Shanghai) 2.007-0.005. Ambiente: nivel de SPF.

Protocolo experimental

Los ratones desnudos fueron inoculados subcutáneamente con células de cáncer de colon humano Ls-174T. Después de que los tumores crecieron a la 150-300mm³, los ratones fueron divididos aleatoriamente en equipos (d0). Dosificación y dosificación regímenes se muestran en la tabla de abajo.

- 20 El volumen de los tumores y el peso de los ratones fueron medidos y registrados durante 2-3 veces por semana. El volumen del tumor se calculó (V) por la siguiente ecuación:

$$V = 1/2 \times a \times b^2$$

en donde a, b representan la longitud y anchura respectivamente.

Fármaco	Administración	Ruta	Volumen medio del tumor (mm ³) D0	SD	Volumen medio del tumor (mm ³) D12	SD	RTV D12	SD	% T/C D12	Tasa de inhibición del tumor (%) D12	Valor P D12	Regresión parcial	Número de animales
Vehículo	D0,3	IV	219.8	±37.2	2013.7	±303.1	9.4	±2.3	100	0	-	0	8
liposomas CPT-11 1.0mg/kg	D0,3	IV	212.2	±42.1	732.2	±162.6	3.5	±0.7	38	62	0.000	0	13
liposomas CPT-11 3.0mg/kg	D0,3	IV	205.0	±49.0	265.1	±122.9	1.3	±0.4	13	87	0.000	4	13
CPT-11 10mg/kg	D0,3	IV	204.6	±44.7	844.4	±197.5	4.2	±0.9	45	55	0.000	0	14

D0: la primera vez de administración; RTV: volumen tumoral relativo; P Valor medio en relación con el control. Grupo de control n = 12, Grupo de tratamiento n = 6.

Resultados:

5 Ambos liposoma CPT-11 y CPT-11 inhibieron el crecimiento de cáncer de colon humano Ls-174T en ratones desnudos de manera significativa. El liposoma CPT-11 fue dependiente de la dosis en la inhibición del crecimiento de Ls-174T. Regresión parcial tumoral 4/14 cuando se administró el liposoma CPT-11 en dosis alta (3 mg/kg). La eficacia terapéutica de liposoma CPT-11 fue equivalente a CPT-11 (10 mg/kg) cuando se administró el liposoma CPT-11 en dosis baja (1 mg/kg). Se indicó que la eficacia terapéutica del liposoma CPT-11 puede haber impulsado al menos 10 veces que la inyección de CPT-11. Los resultados detallados se muestran en la Figura 3.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un liposoma de irinotecán o clorhidrato de irinotecán, caracterizado porque el citado liposoma comprende irinotecán o clorhidrato de irinotecán, un fosfolípido neutro y el colesterol, y la relación en peso del colesterol con el fosfolípido neutro es 1: 3~5, caracterizado porque la citada relación en peso del fosfolípido neutro con el irinotecán o clorhidrato de irinotecán es de 2~5: 1, preferiblemente 2.5 ~ 4: 1 y porque el citado fosfolípido neutro comprende la fosfatidilcolina de soja hidrogenada.
2. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el citado fosfolípido neutro es la fosfatidilcolina de soja hidrogenada.
- 10 3. El liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la citada relación del colesterol con el fosfolípido neutro es 1: 3.5-4.5. preferiblemente 1 : 4.
4. El liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el citado liposoma se prepara mediante el método de gradiente iónico.
- 15 5. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el citado liposoma tiene gradiente iónico formado por una solución reguladora entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del liposoma, preferiblemente la fase acuosa interna del citado liposoma tiene una mayor concentración de iones que la fase acuosa externa.
6. El liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el citado liposoma comprende además un derivado lipídico del polímero hidrófilo, preferiblemente DSPE-PEG₂₀₀₀.
7. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque la citada relación en peso del derivado lipídico de polímero hidrófilo con el irinotecán o clorhidrato de irinotecán es 0.2 ~ 0.4.
- 20 8. El liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el citado liposoma comprende además un fosfolípido cargado, en donde el citado fosfolípido cargado se selecciona del grupo que consiste en dilaurilo fosfatidilglicerol, dipalmitoil fosfatidilglicerol, diestearoil fosfatidil glicerol, dimiristato de fosfatidilglicerol, ácido dioleico fosfatidilserina, dioleoil fosfatidilglicerol, ácido dilaurilo fosfatídico, dimiristato ácido fosfatídico, ácido diestearoil fosfatídico y una mezcla de los mismos, y la relación en peso del fosfolípido cargado con el fosfolípido neutro es 1: 5 ~ 1: 100.
- 25 9. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el citado liposoma comprende las siguientes relaciones en peso de ingredientes:
- | | |
|---|--------------|
| clorhidrato de irinotecán | 1. |
| fosfatidilcolina de soja hidrogenada | 3.4 - 3.8. |
| polietilenglicol 2000 diestearoil fosfatidil etanolamina | 0.34 - 0.38. |
| colesterol | 0.8 - 0.95. |
| y la relación de colesterol a fosfatidilcolina de soja hidrogenada es | 1: 4. |
10. Un método de preparación del citado liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el citado método de preparación comprende las siguientes etapas de:
- 30 1) preparación de un liposoma blanco por uno cualquiera de los siguientes métodos A a D:
- A. disolver un fosfolípido neutro y el colesterol en etanol anhidro o un solvente mixto de etanol anhidro y tert-butil alcohol de acuerdo con la formulación deseada, mezclar la mezcla con una solución reguladora para obtener un liposoma blanco en bruto después retirar el etanol a través de destilación a presión reducida, y a continuación, preparar un liposoma blanco con el tamaño de partícula deseado, utilizando un homogeneizador de alta presión y/o un equipo de extrusión;
- 35 B. disolver un fosfolípido neutro y colesterol en cloroformo o un solvente mixto de cloroformo-metanol de acuerdo con la formulación deseada, formar una película de lípido a través de un evaporador rotatorio, adicionar una solución reguladora de hidratación para obtener un liposoma blanco en bruto, y luego preparar un liposoma blanco con el tamaño de partícula deseado mediante el uso de un homogeneizador de alta presión y/o un equipo de extrusión;
- 40 C. mezclar un fosfolípido neutro, colesterol y una solución reguladora de acuerdo con la formulación deseada, a continuación, preparar un liposoma blanco con el tamaño de partícula deseado utilizando un homogeneizador de alta presión y/o un equipo de extrusión;

D. disolver un fosfolípido neutro y el colesterol en etanol anhidro o un solvente mixto de etanol anhidro y tert-butil alcohol de acuerdo con la formulación deseada, mezclar la mezcla con una solución reguladora, y luego preparar un liposoma blanco con el tamaño de partícula deseado mediante el uso de homogeneizador de alta presión y/o un equipo de extrusión;

5 2) formación de gradiente iónico entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del liposoma blanco: sustituir la fase acuosa externa del liposoma blanco para formar un gradiente iónico entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del liposoma blanco;

10 3) preparación un liposoma cargado con un fármaco: preparar una solución acuosa de clorhidrato de irinotecán, adicionarla a la dispersión de liposomas blanco con gradiente iónico, y luego incubar la dispersión para obtener el liposoma cargado con un fármaco con calentamiento y agitación.

11. El método de preparación de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque después de la etapa 3) de preparación del liposoma cargado con un fármaco, el citado método comprende también la siguiente etapa de:

15 4) eliminación del fármaco libre y la concentración de la muestra: adicionar un medio de solución reguladora al liposoma de clorhidrato de irinotecán, eliminar el fármaco no encapsulado mediante el uso de dispositivo de flujo tangencial, y concentrar la muestra a un volumen apropiado.

12. El método de preparación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, caracterizado porque la citada solución reguladora se selecciona del grupo que consiste en una solución reguladora que comprende sales de iones de Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Li^+ , NH_4^+ , H^+ y una mezcla de los mismos.

20 13. Una inyección de liposoma que comprende el liposoma de irinotecán o clorhidrato de irinotecán, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

25 14. La inyección de liposomas de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizada porque la citada inyección comprende un estabilizador, en donde el citado estabilizador se selecciona del grupo que consiste en ácido etilendiaminotetraacético, ácido etilendiaminotetraacético disódico, ácido etilendiaminatetracético dicálcico y una mezcla de los mismos, preferiblemente ácido etilendiaminatetracético disódico; la relación del estabilizador adicionado es 0 - 0.5% (peso/v), y el mínimo no es 0%.

15. La inyección de liposomas de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizada porque la citada inyección es una inyección de líquido o polvo liofilizado para inyección.

30 16. La inyección de liposomas de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizada porque la citada inyección comprende un regulador de presión osmótica, en donde dicho regulador de presión osmótica se selecciona entre el grupo que consiste en glucosa, sacarosa, sorbitol, manitol, cloruro de sodio, glicerina, histidina y su clorhidrato, glicina y su clorhidrato, lisina, serina, ácido glutámico, arginina, valina y una mezcla de los mismos: la relación de dicho regulador de presión osmótica adicionado es 0 ~ 5% (peso/v), y el mínimo no es 0% .

35 17. La inyección de liposomas de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizada porque la citada inyección comprende además un antioxidante, en donde el citado antioxidante se selecciona entre el grupo que consiste en un antioxidante soluble en agua y un antioxidante soluble en aceite: en donde el citado antioxidante soluble en aceite es seleccionado del grupo que consiste en α -tocoferol, succinato de α -tocoferol, acetato de α -tocoferol y una mezcla de los mismos: en donde el citado antioxidante soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en ácido ascórbico, bisulfito de sodio, sulfito de sodio, pirosulfito de sodio. L-cisteina y una mezcla de los mismos: la relación del antioxidante adicionado es 0 - 0.5% (peso/v), y el mínimo no es 0%.

40 18. La inyección de liposomas de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizada porque la citada inyección es polvo liofilizado para inyección que comprende un lioprotector, y se prepara mediante liofilización.

19. La inyección de liposomas de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque la citada inyección comprende las siguientes relaciones en peso de los ingredientes:

clorhidrato de irinotecán	1.
fosfatidilcolina de soja hidrogenada	3.4 - 3.8.
polietilenglicol 2000-diestearoil fosfatidil etanolamina	0.34 - 0.38.
colesterol	0.8 - 0.95.
y la relación del colesterol con la fosfatidilcolina de soja hidrogenada es	1: 4.

20. Un procedimiento de preparación de la citada inyección de liposomas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, caracterizado porque el citado proceso comprende el método de preparación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11.

5 21. El proceso de preparación de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizado porque el proceso de la citada preparación comprende además las siguientes etapas de:

medición del volumen, la esterilización y subenvase: ajustar la concentración del fármaco de liposoma, medir el volumen, esterilización por filtración, llenado en los viales y sellado para obtener la inyección de liposomas; o

10 adición de un lioprotector a la muestra de fármacos de liposoma, ajustar de la concentración del fármaco, medir el volumen, esterilización por filtración, llenado en los viales, sellado, a continuación, liofilización para obtener el polvo liofilizado para inyección.

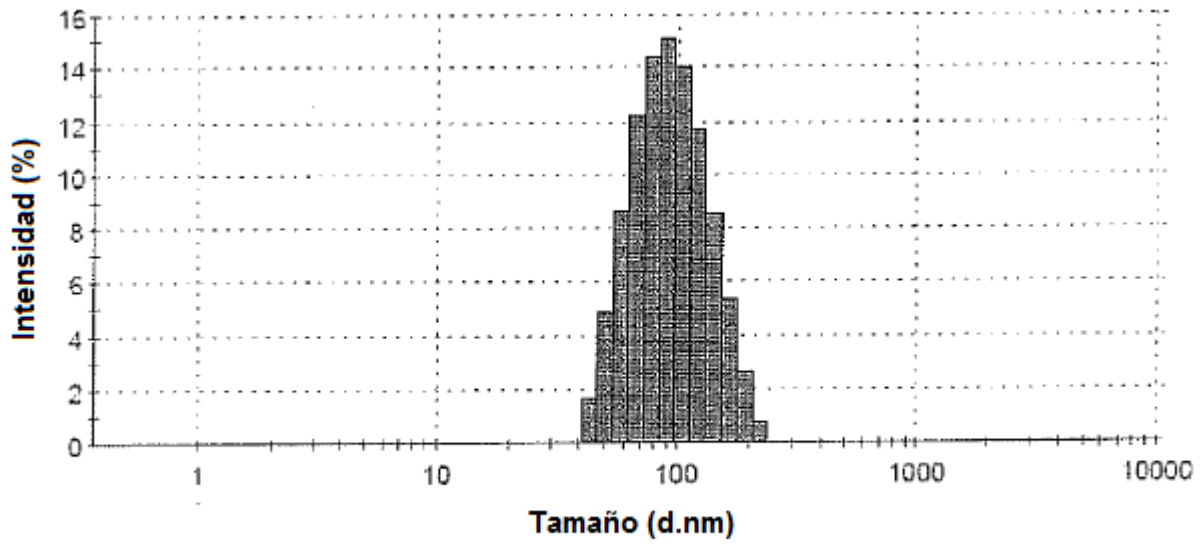


FIG. 1

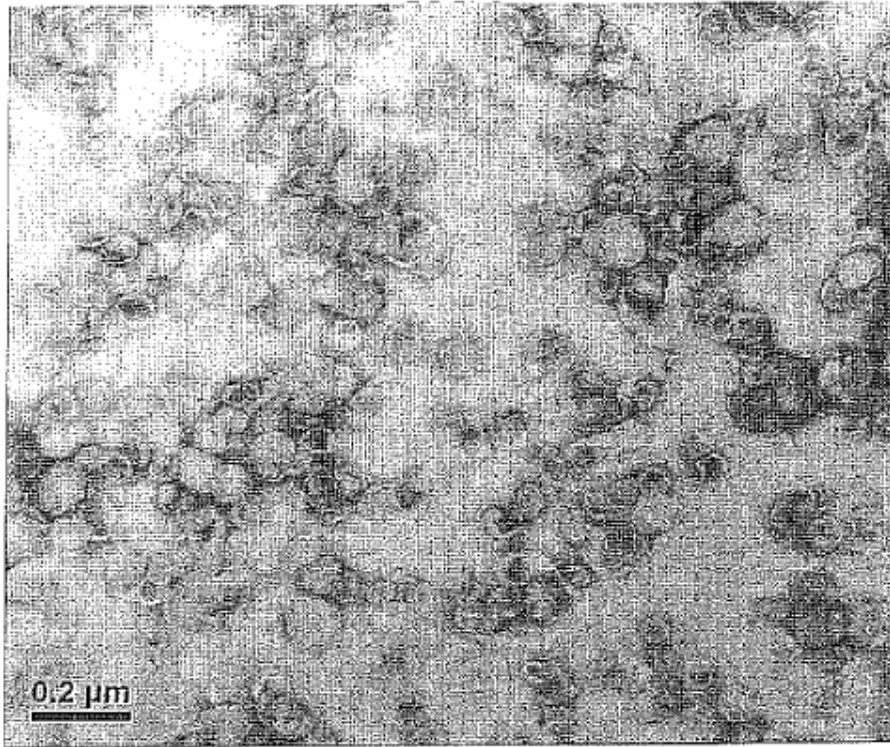


FIG. 2

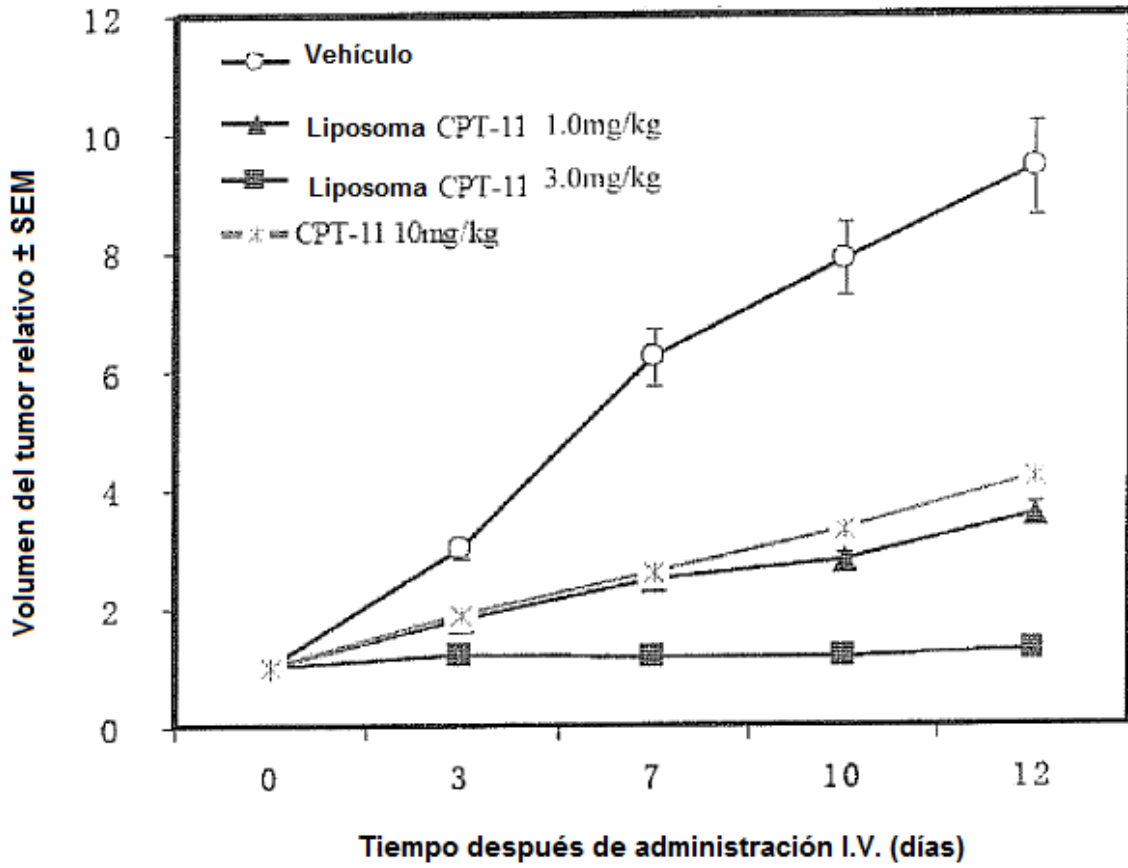


FIG. 3