

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 027**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/357** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 47/02** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2006.01)  
**A61K 47/24** (2006.01)  
**A61K 47/28** (2006.01)  
**A61K 47/34** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2010 PCT/JP2010/055770**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2010 WO10113984**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2010 E 10758755 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2415470**

54 Título: **Composición liposomal**

30 Prioridad:

**30.03.2009 JP 2009082521**  
**30.03.2009 US 164653 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.12.2016**

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)**  
**6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku**  
**Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

**KIKUCHI, HIROSHI;**  
**HYODO, KENJI y**  
**ISHIHARA, HIROSHI**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 593 027 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

Composición liposomal

Campo técnico

- 5 El presente invento se refiere a una composición liposomal que contiene eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisibles. El presente invento se refiere también a un método de producir la composición liposomal.

Técnica de antecedentes

- 10 Los liposomas son unas vesículas cerradas microscópicas que tienen una fase interna encerrada por una o más bicapas lipídicas, y son capaces de retener a un material soluble en agua en la fase interna, y un material lipófilo en la bicapa lipídica. Cuando se atrapa un compuesto activo en un liposoma y se le suministra a un tejido diana, constituyen unas cuestiones importantes saber cómo atrapar el compuesto activo en el liposoma con alta eficiencia, y como asegurar una retención estable del compuesto activo por el liposoma.

- 15 Cuando se atrapan compuestos lipófilos en un liposoma, se puede conseguir con relativa facilidad una alta relación de atrapamiento pero, excepto en los casos de compuestos que tienen una muy alta afinidad con las membranas, tales como la anfotericina B (que es el agente principal en el fármaco liposomal AmBisome), la retención de estabilidad en un plasma sanguíneo es ordinariamente baja, y es difícil obtener suficiente mejoramiento en la farmacocinética. Con respecto a los métodos para atrapar compuestos solubles en agua en liposomas, existen diversos métodos tales como el método de la película lipídica (el método Vortex), el método de evaporación en fase inversa, el método de retirada de agentes tensioactivos, el método de congelación y descongelación y los métodos de carga remota (método del gradiente de pH, método del gradiente de iones). Sin embargo, solamente los métodos de carga remota son los que proporcionan una relación de atrapamiento cercana a 100 %, se obtiene con los otros métodos una relación de atrapamiento del orden de solamente 5 a 30 %.

- 20 Como métodos de carga remota, son conocidos los que usan un gradiente de pH y un gradiente de iones de sulfato de amonio. El método del gradiente de pH, que es un método de carga remota que usa un gradiente de pH, es una técnica para incorporar compuestos en un liposoma por uso del movimiento del equilibrio de disociación molecular/iónica debido al pH del compuesto diana.

- 25 Como un ejemplo de un compuesto atrapado en un liposoma mediante el método del gradiente de pH, se puede citar, por ejemplo, la doxorubicina (DOX, pKa: 8,2). Después de haber preparado una solución liposomal con una solución tamponadora de pH 4, la fase externa liposomal es reemplazada por una solución tamponadora de pH 7. En el caso de que se añada DOX a esta solución liposomal, puesto que la DOX molecular en la solución de pH 7 es lipófila, ella ha emigrado a la membrana liposomal en vez de a la fase acuosa. En el caso en el que la DOX, que ha emigrado a la membrana liposomal, entre en contacto adicionalmente con la fase interna de pH 4 del liposoma, ella se vuelve iónica y es incorporada en la fase interna liposomal. De esta manera, la DOX es transportada desde la fase externa a la fase interna de un liposoma mediante un desplazamiento del equilibrio de disociación (véase Bibliografía no de patentes 1, Bibliografía no de patentes 2, y Bibliografía de patentes 1).

- 30 Se ha informado acerca de una diversidad de técnicas para mejorar este tipo de método de carga remota. En la Bibliografía no de patentes 3, se divulga una técnica para mejorar la relación de atrapamiento de compuestos activos por adición de etanol conjuntamente con el compuesto activo a la fase externa liposomal, cuando el método del gradiente de pH es realizado en un liposoma que tiene una composición especial, que se denomina liposoma exento de colesterol.

- 35 En la Bibliografía de patentes 2, además de la del gradiente de pH, se divulga una técnica para mejorar la relación de atrapamiento haciendo que existan iones de cobre en la fase interna liposomal.

- 40 En vez de un gradiente de pH en el método del gradiente de pH, el método del sulfato de amonio, que es un método de carga remota que usa un gradiente de iones de sulfato de amonio, es una técnica para incorporar compuestos activos dentro de la fase interna de un liposoma por uso de un gradiente de iones tal como los de sulfato de amonio bivalente (véase Bibliografía no de patentes 1 y Bibliografía de patentes 3).

- 45 Además de un gradiente de iones basados en sulfato de amonio, la Bibliografía de patentes 4 divulga una técnica para incorporar compuestos activos en un liposoma por adición de ácido borónico juntamente con el compuesto activo a la fase externa del liposoma.

En lugar de un gradiente de iones basado en sulfato de amonio, la Bibliografía de patentes 5 divulga una técnica en la que, comparada con el caso en el que se usa sulfato de amonio, la tasa de liberación del compuesto activo se mejora incorporando el compuesto activo en un liposoma por uso de un gradiente de iones del anión de ácido glucurónico.

5 Por lo tanto, desde el punto de vista de la relación de atrapamiento, los métodos de carga remota son unos excelentes métodos de atrapamiento. Sin embargo, en el caso de que se usen métodos de carga remota, excepto en casos especiales tales como el Doxil (un preparado liposomal de DOX) en donde se cristaliza el compuesto activo atrapado en la fase interna liposomal, se presenta el problema de que el compuesto activo tiende a salirse desde el liposoma en un plasma sanguíneo y es baja la estabilidad de retención del compuesto activo.

10 Como se ha descrito anteriormente, con métodos técnicos convencionales la situación actual consiste en que es difícil conseguir una coexistencia de una alta relación de atrapamiento del compuesto activo en un liposoma y una alta estabilidad de retención del compuesto activo en un liposoma.

#### Bibliografía de la técnica anterior

#### 15 Bibliografía de patentes

Bibliografía de patentes 1: Patente de los Estados Unidos de América N° 5192549, Memoria descriptiva

Bibliografía de patentes 2: Publicación internacional PCT WO 2006/037230, Folleto

Bibliografía de patentes 3: Patente de los Estados Unidos de América N° 5316771, Memoria descriptiva

Bibliografía de patentes 4: Patente de los Estados Unidos de América N° 6051251, Memoria descriptiva

20 Bibliografía de patentes 5: Publicación internacional PCT WO 2005/046643, Folleto

#### Bibliografía no de patentes

Bibliografía no de patentes 1: Yasuyuki Sazuka, "Método de preparación de liposomas" "Nuevos desarrollos en la aplicación de liposomas: Hacia el desarrollo de células artificiales" (Kazunari Akiyoshi, Shigeru Tsujii, supervisión editorial) NTS, (2005), páginas 33-37.

25 Bibliografía no de patentes 2: Mayer LD y colaboradores, Biochimica et Biophysica Acta, (1986), 857: páginas 123-126.

Bibliografía no de patentes 3: N. Dos Santos y colaboradores, Biochimica et Biophysica Acta, (2004), 1661(1): páginas 47-60.

#### Bosquejo del invento

30 Problema que ha de ser resuelto por el invento

El objetivo del presente invento es proporcionar una composición liposomal con una alta relación de atrapamiento y una alta estabilidad de retención del compuesto activo.

#### Medios para resolver el problema

35 Como resultado de una diligente investigación con la meta de resolver los problemas antes mencionados, los autores del presente invento descubrieron, con respecto a una composición liposomal cuyo compuesto activo es eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisibles, que la relación de atrapamiento y la estabilidad de retención del compuesto activo en la composición liposomal son extremadamente altas, perfeccionando de esta manera el presente invento

40 Concretamente, el presente invento es como sigue.

(1) Una composición liposomal que contiene un liposoma, y que contiene (i) un compuesto activo, (ii) una sal de amonio y (iii) una sal, un ácido, una base y/o un aminoácido en la fase interna liposomal, en la que el compuesto activo es eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisibles.

45 (2) La composición liposomal de acuerdo con 1, en el que la composición liposomal está en una forma sólida o líquida.

(3) La composición liposomal de acuerdo con 1 ó 2, en la que la concentración de la sal de amonio antes mencionada es de 10 mM o más alta.

50 (4) La composición liposomal de acuerdo con 1 hasta 3, en la que la concentración de la sal antes mencionada es de 1 a 300 mM.

- (5) La composición liposomal de acuerdo con 1 hasta 4, en la que la concentración del ácido antes mencionado es de 1 a 300 mM.
- (6) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 5, en la que la concentración del aminoácido antes mencionado es de 1 a 300 mM.
- 5 (7) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 6, en la que la concentración de la base antes mencionada es de 1 a 300 mM.
- (8) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 7, en la que la concentración del compuesto activo antes mencionado es de 0,01 a 300 mg/ml.
- 10 (9) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 8, en la que el compuesto activo antes mencionado es mesilato de eribulina.
- 15 (10) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 9, en la que la fase interna liposomal contiene además sulfato de amonio, ácido cítrico, y un compuesto activo.
- (11) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 10, en la que la fase externa liposomal contiene un azúcar, un electrólito, y/o un aminoácido.
- 20 (12) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 11, en la que la fase externa liposomal contiene un azúcar o un electrólito, y un aminoácido.
- (13) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 10, en la que la fase externa liposomal contiene un azúcar, un electrólito, y un aminoácido.
- 25 (14) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 11 hasta 13, en la que la concentración del azúcar antes mencionado es de 2 a 20 %.
- (15) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 11 hasta 14, en la que la concentración del aminoácido antes mencionado es de 1 a 300 mM.
- 30 (16) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 15, en la que la fase externa liposomal contiene un azúcar o cloruro de sodio, e histidina.
- 35 (17) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 16, en la que la fase interna liposomal antes mencionada no contiene sustancialmente nada de ciclodextrina.
- (18) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 17, en la que el liposoma contiene fosfatidilcolina hidrogenada.
- 40 (19) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 18, en la que el liposoma contiene colesterol
- 45 (20) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 19, en la que el liposoma contiene un condensado de metoxipolietilen glicol.
- (21) La composición liposomal de acuerdo con 20, en la que el condensado de metoxipolietilen glicol antes mencionado es un condensado de diestearoílfosfatidil etanolamino polietilen glicol.
- 50 (22) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 21, en la que el liposoma contiene fosfatidilcolina hidrogenada, colesterol y un condensado de diestearoílfosfatidil etanolamino polietilen glicol.
- (23) La composición liposomal de acuerdo con 22, que contiene de 10 a 80 % de la fosfatidilcolina hidrogenada antes mencionada, de 1 a 60 % del colesterol antes mencionado, y de 0 a 50 % del condensado de diestearoílfosfatidil etanolamino polietilen glicol antes mencionado.
- 55 (24) La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 23, en la que el liposoma contiene fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol y polietilen glicol 2.000-fosfatidiletanolamina.
- 60 (25) Un método de producción de la composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de 1 hasta 24, que incluye: una etapa en la que se proporciona un liposoma que contiene un líquido para dispersión de liposomas; una etapa en la que el líquido para dispersión de liposomas antes mencionado se mezcla con el compuesto activo antes mencionado y
- 65 una etapa en la que el compuesto activo antes mencionado se introduce en la fase interna liposomal del líquido para dispersión de liposomas antes mencionado

en la que la etapa en la que se proporciona el líquido para dispersión de liposomas antes mencionado incluye: una etapa en la que se proporciona una solución para la preparación de liposomas que contiene un liposoma que contiene una sal de amonio en la fase interna liposomal y en la fase externa liposomal;

5 una etapa en la que la fase externa liposomal de la solución para la preparación de liposomas antes mencionada es sustituida o diluida, y

en la que la etapa en la que la fase externa liposomal antes mencionada es sustituida o diluida es una etapa en la que el pH de la fase externa liposomal se hace más alto que el pH de la fase interna liposomal.

10 (26) El método de acuerdo con 25, en el que el líquido para dispersión de liposomas antes mencionado no contiene sustancialmente nada de una sal de amonio en la fase externa liposomal.

(27) El método de acuerdo con 25 ó 26, en el que el pH de la fase externa liposomal del líquido para dispersión de liposomas antes mencionado es de 3 a 10.

15 (28) El método de acuerdo con una cualquiera de 25 hasta 27, en el que el pH de la fase externa liposomal del líquido para dispersión de liposomas antes mencionado es de 7 a 10.

20 (29) El método de acuerdo con 27 ó 28, en el que el pH antes mencionado es el pH de la fase externa liposomal del líquido para dispersión de liposomas antes mencionado en la etapa en la que se mezclan el líquido para dispersión de liposomas antes mencionado y el compuesto activo antes mencionado.

25 (30) El método de acuerdo con una cualquiera de 25 hasta 29, en el que la etapa en la que la fase externa liposomal antes mencionada es sustituida o diluida es una etapa en la que la diferencia entre el pH de la fase interna liposomal y el pH de la fase externa liposomal es de 1 hasta 5.

(31) El método de acuerdo con una cualquiera de 25 hasta 30, en el que el pH de la fase interna liposomal antes mencionada es de 3 a 9.

30 (32) El método de acuerdo con una cualquiera de 25 hasta 31, en el que el pH de la fase interna liposomal antes mencionada es de 4 a 9.

(33) El método de acuerdo con una cualquiera de 25 hasta 32, en el que el pH de la fase interna liposomal antes mencionada es de 5 a 8.

35 (34) El método de acuerdo con una cualquiera de 25 hasta 33, en el que fase externa liposomal es una solución que contiene un electrólito en la etapa en la que se introduce el compuesto activo antes mencionado.

40 (35) El método de acuerdo con una cualquiera de 25 hasta 34, en el que el líquido para dispersión de liposomas antes mencionado no contiene sustancialmente nada de ciclodextrina en la fase interna liposomal.

(36) El método de acuerdo con una cualquiera de 25 hasta 35, que contiene además una etapa en la que el pH de la fase externa liposomal es neutralizado.

#### Efecto del invento

45 De acuerdo con el presente invento es posible ofrecer una nueva composición liposomal. La composición liposomal del presente invento atrapa un compuesto activo en la fase interna liposomal con un alto grado de eficiencia y tiene una alta estabilidad de retención del compuesto activo.

#### Breve descripción de los dibujos

50 (Fig. 1) muestra los cambios *in vitro* en la concentración del mesilato de eribulina en una composición liposomal en un plasma sanguíneo de rata (a 37°C).

(Fig. 2) muestra la actividad antitumoral *in vivo* del mesilato de eribulina debida a un liposoma en un ratón desnudo portador de un cáncer FaDu.

(Fig. 3) muestra la actividad antitumoral *in vivo* de mesilato de eribulina debida a un liposoma en un ratón desnudo portador de un cáncer ACHN.

55 Mejor modo de llevar a cabo el invento

El presente invento se describe específicamente mediante unos modos para llevar a cabo el invento, pero el presente invento no está limitado a los siguientes modos para llevar a cabo el invento, y se puede llevar a cabo con una diversidad de modificaciones.

El contenido divulgado en la bibliografía a la que se hace referencia en el presente invento se incorpora en el presente invento como referencia.

(Definiciones)

5 Un "liposoma" significa unas vesículas microscópicas cerradas que tienen una fase interna encerrada por una bicapa lipídica. En el presente invento, un liposoma incluye un liposoma de una única membrana pequeña (SUV: vesícula unilaminar pequeña), un liposoma de una única membrana grande (LUV: vesícula unilaminar grande), un liposoma de una única membrana todavía mayor (GUV: vesícula unilaminar gigante), un liposoma de capas múltiples que tiene múltiples membranas concéntricas (MLV: vesícula multilaminar), un liposoma que tiene múltiples membranas que no son concéntricas, sino irregulares (MVV: vesícula multivesicular), etc.

10 "Fase interna liposomal" significa una región acuosa encerrada en la bicapa lipídica del liposoma, y se usa con el mismo significado que "fase de agua interna" y "fase de agua interna liposomal", "fase externa liposomal" significa la región que no está encerrada por la bicapa lipídica del liposoma (es decir, la región alejada de la fase interna y de la bicapa lipídica) en el caso de que el liposoma sea dispersado en un líquido.

15 "Composición liposomal" significa una composición que contiene un liposoma y que además contiene mesilato de eribulina en la fase interna liposomal. En el presente invento, la composición liposomal incluye unas formas tanto sólidas como líquidas.

"Líquido para dispersión de liposomas" significa una composición que contiene un liposoma y es una composición que precede a la introducción del compuesto activo dentro de la fase interna liposomal.

20 "Solución para la preparación de liposomas" significa una composición que contiene un liposoma y es una composición que precede al ajuste de una fase externa liposomal para finalidades de atrapar al mesilato de eribulina en la fase interna liposomal.

25 "Reactivo liposomal" significa un líquido para dispersión de liposomas en el caso de que él esté en una forma líquida. En el caso de que él esté en una forma sólida, significa un reactivo a partir del cual el líquido para dispersión de liposomas se puede obtener por disolución o suspensión en un disolvente prescrito. El disolvente se describirá más adelante. Tal como se describirá más adelante, un reactivo liposomal sólido se puede obtener, por ejemplo, secando un líquido para dispersión de liposomas.

30 En la presente memoria descriptiva, "la mezcladura de un sólido y un líquido" incluye la disolución y la suspensión del sólido en el líquido y la mezcladura, la disolución y la suspensión se usan de una manera mutuamente intercambiable. Similarmente, el disolvente y el medio de dispersión se usan también de una manera mutuamente intercambiable.

35 Por lo demás, la composición liposomal, el líquido para dispersión de liposomas, la solución para la preparación de liposomas y el reactivo liposomal del presente invento no contienen sustancialmente nada de ciclodextrina. "El concepto no contiene sustancialmente nada de ciclodextrina" significa que no hay adición de ciclodextrina. Es suficiente que la ciclodextrina no esté contenida en una cantidad en la que sea significativamente observable una mejoría de la solubilidad (solubilidad nominal) del compuesto activo debida a la ciclodextrina, e incluso en el caso de que ésta se añada en una cantidad en la que no sea observable significativamente una mejoría en la solubilidad del compuesto activo, no ha de excluirse de la ejecución del presente invento.

40 Además de ello, como un modo preferido del presente invento, el concepto "el líquido para dispersión de liposomas no contiene sustancialmente nada de una sal de amonio en la fase externa liposomal" significa que no se añade una sal de amonio a la fase externa liposomal del líquido para dispersión de liposomas. La adición de una sal de amonio en una cantidad que esté dentro de un intervalo en el que se pueda conseguir el objetivo del presente invento, no ha de ser excluida de la realización del presente invento. En el caso en el que una sal de amonio esté contenida en la fase externa liposomal de una solución para la preparación de liposomas, es posible preparar un líquido para dispersión de liposomas que no contenga sustancialmente una sal de amonio sustituyendo o diluyendo la fase externa liposomal de la solución para la preparación de liposomas por uso de una solución que no contenga sustancialmente una sal de amonio.

(Compuesto activo)

50 El compuesto activo del presente invento es eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisibles (a lo que en lo sucesivo del presente texto algunas veces se hace referencia como "eribulina, etc."). No hay limitación particular ninguna de la sal farmacológicamente permisible siempre que se formen eribulina y una sal, independientemente de que esta sea una sal de un ácido inorgánico o una sal de un ácido orgánico. Por ejemplo, pueden citarse la sal de ácido clorhídrico, la sal de ácido sulfúrico, el citrato, la sal de ácido bromhídrico, la sal de

ácido yodhídrico, la sal de ácido nítrico, el bisulfato, la sal de ácido fosfórico, la sal de súper ácido fosfórico, la sal de ácido nicotínico, la sal de ácido acético, la sal de ácido láctico, la sal de ácido salicílico, la sal de ácido tartárico, la sal de ácido pantoténico, la sal de ácido ascórbico, la sal de ácido succínico, la sal de ácido maleico, la sal de ácido fumárico, la sal de ácido glucónico, la sal de ácido sacarínico, la sal de ácido fórmico, la sal de ácido benzoico, la sal de ácido glutámico, la sal de ácido metanosulfónico, la sal de ácido etanosulfónico, la sal de ácido bencenosulfónico, la sal de ácido p-toluenosulfónico, la sal de ácido pamoico (el pamoato) etcétera. Son preferibles entre éstas la sal de ácido clorhídrico, la sal de ácido sulfúrico, la sal de ácido acético, la sal de ácido fosfórico, el citrato, la sal de ácido mesílico, y es sumamente preferible entre todas ellas es la sal de ácido mesílico. Esto quiere decir que el compuesto activo preferible del presente invento es el mesilato de eribulina. Por lo demás, como sal farmacológicamente permisible de eribulina es aceptable usar eribulina y una sal de aluminio, calcio, litio, magnesio, calcio [sic], sodio, zinc y dietanolamina. La eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisibles es el compuesto o una de sus sales que se registra en el folleto de la publicación internacional de PCT WO 99/65894 o la patente de los Estados Unidos de América 6214865 (el contenido registrado en estas patentes se incorpora a la presente por su referencia) y tiene una acción farmacológica que incluye una acción antitumoral y una acción antimetabólica. La eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisibles exhibe una acción antitumoral con respecto a un melanoma, un fibrosarcoma, una leucemia monocítica, un cáncer de colon, un cáncer de ovario, un cáncer de mama, un cáncer de hueso, un cáncer de próstata, un cáncer de pulmón y fibroblastos transformados con el gen ras.

Sin embargo, como compuestos activos que se pueden combinar con eribulina, etc., se pueden escoger, entre otros compuestos usados en los sectores de medicinas (incluyendo fármacos para diagnóstico), productos cosméticos, productos alimenticios, etcétera. Con respecto a los compuestos activos, es aceptable combinar uno o más compuestos distintos de eribulina, etc.

Como compuestos activos se pueden citar compuestos de bajo peso molecular, etc., Entre éstos son apropiados los compuestos usados como agentes antitumorales, agentes antibacterianos, agentes antiinflamatorios, agentes contra un infarto de miocardio, y agentes de contraste.

Con respecto al peso molecular del compuesto activo, es preferible un intervalo de 100 a 2.000, es más preferible un intervalo de 200 a 1.500 y es incluso más preferible un intervalo de 300 a 1.000. Dentro de estos intervalos, la permeabilidad de las membranas de liposomas del compuesto activo es generalmente satisfactoria y el presente invento puede ser aplicado apropiadamente.

Los compuestos activos incluyen unos compuestos solubles en agua y unos compuestos lipófilos y, siempre y cuando que ellos sean más o menos solubles en agua o en disolventes acuosos, se puede aplicar el presente invento.

No hay limitaciones particulares acerca de los agentes antitumorales del presente invento y se pueden citar, por ejemplo, derivados de camptotecina tales como hidroclicloruro de irinotecán, hidroclicloruro de nogitecán, exatecán, RFS-2.000, lurtotecán, BNP-1350, Bay-383441, PNU-166148, IDEC-132, BN-80915, DB-38, DB-81, DB-90, DB-91, CKD-620, T-0128, ST-1480, ST-1481, DRF-1042, DE-310; derivados de taxano tales como docetaxel hidrato, docetaxel, paclitaxel, IND-5109, BMS-184476, BMS-188797, T-3782, TAX-1011, SB-RA-31012, SBT-1514, y DJ-927; ifosfamida, hidroclicloruro de nimstina, carvocon, ciclofosfamida, dacarbazina, tiotepa, busulfano, melfarano, ranimustina, estramustina fosfato de sodio, 6-mercaptopurina ribósido, enocitabina, hidroclicloruro de gemcitabina, carmfur, citarabina, citarabina ocfosfato, tegafur, doxilfluridina, hidroxycarbamida, fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, fosfato de fludarabina, actinomicina D, hidroclicloruro de aclarrubicina, hidroclicloruro de idarrubicina, hidroclicloruro de pirarrubicina, hidroclicloruro de epirrubicina, hidroclicloruro de daunorrubicina, hidroclicloruro de doxorubicina, epirrubicina, pirarrubicina, daunorrubicina, doxorubicina, hidroclicloruro de pirarrubicina, hidroclicloruro de bleomicina, zinostatina estimalamer, neocarzinostatina, mitomicina C, sulfato de bleomicina, sulfato de peplomicina, etoposido, tartrato de vinorelbina, sulfato de vincristina, sulfato de vindesina, sulfato de vinblastina, hidroclicloruro de amrubicina, gefinitib, exemestano, capecitabina, TNP-470, TAK-165, KW-2401, KW-2170, KW-2871, KT-5555, KT-8391, TZT-1027, S-3304, CS-682, YM-511, YM-598, TAT-59, TAS-101, TAS-102, TA-106, FK-228, FK-317, E7070, (8E, 12E, 14E)-7-[(4-cicloheptilpiperazin-1-il)carbonil]oxi-3,6,16,21-tetrahidroxi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epoxitricosa-8,12,14-trien-11-olida (E7107), KRN-700, KRN-5500, J-107088, HMN-214, SM-11355, ZD-0473, etc., Con respecto a los compuestos registrados como sales entre los agentes tumorales antes mencionados, es aceptable cualquier sal y son aceptables también compuestos libres. Con respecto a los compuestos registrados como compuestos libres, es aceptable cualquier sal.

No hay limitaciones particulares acerca de agentes antibacterianos, y pueden citarse, por ejemplo, amfotericina B, cefotiam hexilo, cefalosporina, cloramfenicol, diclofenaco, etc., Con respecto a los compuestos de los agentes antibacterianos antes mencionados, es aceptable cualquier sal.

No hay limitaciones particulares acerca de agentes antiinflamatorios, y pueden citarse, por ejemplo, prostaglandinas (PGE1, PGE2), dexametasona, hidrocortisona, piroxicam, indometacina, prednisolona, etc., Con respecto a los compuestos de los agentes antiinflamatorios antes mencionados, es aceptable cualquier sal.

5 No hay limitaciones particulares acerca de agentes contra infartos de miocardio, y pueden citarse, por ejemplo, adenosina, atenolol, pilsicainida, etc., y como agentes de contraste, pueden citarse, por ejemplo, iopamidol, ácido ioxáglico, iohexol, iomeprol, etc., Con respecto a los compuestos de agentes contra infartos de miocardio y agentes de contraste antes mencionados, es aceptable cualquier sal.

(Lípidos)

10 Es preferible que los constituyentes de las membranas de liposomas del presente invento incluyan fosfolípidos y/o derivados de fosfolípidos. Como fosfolípidos y derivados de fosfolípidos pueden citarse, por ejemplo, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, fosfatidil glicerol, cardiolipina, esfingomielina, ceramida fosforiletanolamina, ceramida fosforil glicerol, ceramida fosforil glicerol fosfato, 1,2-dimiristoil-1,2-desoxifosfatidilcolina, plasmalógeno, ácido fosfatídico, etc., Es también aceptable combinar uno o más de estos fosfolípidos y derivados de fosfolípidos.

15 No hay limitaciones particulares entre los residuos de ácidos grasos en los fosfolípidos y derivados de fosfolípidos y pueden citarse, por ejemplo, un residuo de ácido graso saturado o insaturado con un número de carbonos de 12 hasta 20. Específicamente, se pueden citar unos grupos acilo que se derivan de unos ácidos grasos tales como ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico. Pueden usarse también los fosfolípidos que se derivan de sustancias naturales tales como lecitina de yema de huevo y lecitina de soja, lecitina de yema de huevo parcialmente hidrogenada, lecitina de yema de huevo (completamente) hidrogenada, lecitina de soja parcialmente hidrogenada y lecitina de soja (completamente) hidrogenada, cuyos residuos de ácidos grasos insaturados están parcial o completamente hidrogenados, etc.

20 No hay limitaciones particulares en la cantidad (fracción molar) a mezclar de los fosfolípidos y/o derivados de fosfolípidos que se usan cuando se prepara el liposoma, pero es preferible una de 10 a 80 % con relación a toda composición de membrana liposomal, y es más preferible una de 30 a 60 %.

25 Con respecto a los constituyentes de membranas, aparte de fosfolípidos y/o derivados de fosfolípidos, el liposoma del presente invento puede incluir también esteroides tales como colesterol y colesteno como agentes estabilizadores de membranas, unos ácidos grasos que tienen grupos acilo saturados o insaturados con un número de carbonos de 8 hasta 22, y unos antioxidantes tales como  $\alpha$ -tocoferol.

30 No hay limitaciones particulares acerca de la cantidad (fracción molar) a mezclar de estos esteroides, que se usan cuando se prepara el liposoma, pero es preferible una de 1 a 60 % con relación a toda composición de membranas de liposomas, es más preferible una de 10 a 50 % y es incluso más preferible una de 30 a 50 %.

35 Por lo demás, no hay limitaciones particulares acerca de la cantidad (fracción molar) a mezclar de los ácidos grasos, pero es preferible una de 0 a 30 % con relación a toda la composición de membrana liposomal, es más preferible una de 0 a 20 % y es incluso más preferible una de 0 a 10 %. Con respecto a la cantidad (fracción molar) a mezclar de los antioxidantes, es suficiente que se añada una cantidad con la que se pueda obtener el efecto antioxidante, pero es preferible una de 0 a 15 % de toda la composición de membrana liposomal, es más preferible una de 0 a 10 % y es incluso más preferible una de 0 a 5 %.

El liposoma del presente invento puede contener también lípidos funcionales y lípidos modificados como constituyentes de membranas.

40 Como lípidos funcionales se pueden citar unos derivados lipídicos retenidos en sangre, unos derivados lipídicos sensibles a la temperatura, unos derivados lipídicos sensibles al pH, etc., Como lípidos modificados, pueden citarse lípidos con PEG, lípidos con azúcares, lípidos modificados con anticuerpos, lípidos modificados con péptidos.

45 Como derivados lipídicos retenidos en sangre pueden citarse, por ejemplo glicoforina, el gangliósido GM1, el gangliósido GM3, derivados de ácido glucurónico, derivados de ácido glutámico, derivados de poliglicerol fosfolípidos, derivados de polietilén glicol (condensados de metoxi polietilén glicol, etc.) tales como N-[carbonil-metoxi polietilén glicol-2.000]-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, N-[carbonil-metoxi polietilén glicol-5000]-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, N-[carbonil-metoxi polietilén glicol-750]-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, N-[carbonil-metoxi polietilén glicol-2.000]-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (MPEG 2.000-diestearoil fosfatidiletanolamina) y N-[carbonil-metoxi polietilén glicol-5000]-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, que son condensados de fosfoetanolamina y metoxi polietilén glicol. Haciendo que el liposoma contenga derivados lipídicos con propiedades de retención en la sangre, es posible mejorar la retención del liposoma en la sangre, puesto que el liposoma resulta difícil de capturar en el hígado, etc., como una impureza ajena.

50 Como derivados lipídicos sensibles a la temperatura se puede citar, por ejemplo, la dipalmitoil fosfatidilcolina. Haciendo que el liposoma contenga derivados lipídicos sensibles a la temperatura, es posible provocar la destrucción de un liposoma a unas temperaturas específicas. y provocar cambios en las propiedades superficiales



del liposoma. Además de ello, combinando esto con un aumento en la temperatura en el sitio diana de un tumor, etc., es posible destruir el liposoma en el sitio diana, y liberar el compuesto activo en el sitio diana.

5 Como derivados lipídicos sensibles al pH, puede citarse, por ejemplo, la dioleoil fosfatidil etanolamina, etc., Haciendo que el liposoma contenga derivados lipídicos sensibles al pH, es posible favorecer la fusión de membranas de un liposoma y de un endosoma, cuando el liposoma está incorporado en células, debido a la endocitosis, y mejorar la transmisión del compuesto activo al citoplasma.

10 Como lípidos con azúcares, lípidos modificados con anticuerpos, lípidos modificados con péptidos, pueden citarse unos lípidos que están unidos con azúcares, anticuerpos o péptidos, que son compatibles con las células objetivos o el tejido diana. Usando unos lípidos modificados, el liposoma puede ser transmitido activamente a las células dianas o al tejido diana.

No hay limitaciones particulares acerca de la cantidad (fracción molar) a mezclar de los derivados lipídicos con propiedades de retención en la sangre que se usan cuando se prepara el liposoma, pero es preferible una de 0 a 50 % de la totalidad de los lípidos constituyentes de membranas del liposoma, es más preferible una de 0 a 30 % es incluso más preferible una de 0 a 20 %.

15 (Liposoma)

Como se ha mencionado anteriormente, un liposoma es una vesícula microscópica cerrada que tiene una fase interna encerrada por una bicapa lipídica.

20 Idealmente, con respecto al liposoma, a) es preferible que el liposoma tenga una función de barrera que impida la fuga de eribulina, etc., a la fase externa liposomal después de que la eribulina, etc., haya sido atrapada en la fase interna liposomal. En el caso de que éste se use como una medicina, es preferible que el liposoma exhiba una estabilidad *in vivo*, y que el liposoma tenga una función de barrera que impida la fuga de eribulina, etc., a la fase externa liposomal en la sangre cuando el liposoma se administre *in vivo*.

25 La composición de los constituyentes de membranas para un liposoma que tiene dicha permeabilidad de membranas en un nivel que permite la aplicación práctica, se puede seleccionar apropiadamente por los expertos en la especialidad de acuerdo con el compuesto activo, el tejido diana y similares, haciendo referencia, cuando sea necesario, a las formas de realización que se describen seguidamente (Hiroshi Kikuchi, y colaboradores, "Método de preparación del liposoma I - método de preparación y método de ensayo -," Cell Technology (1983), 2(9): páginas 1136-1149, y a la bibliografía de referencia citada en dicha bibliografía.

30 Cuando se usa como una medicina, es preferible que la eribulina, etc., sea liberada desde el liposoma después de que el liposoma haya llegado al tejido diana, a las células o los orgánulos intracelulares. Con respecto al liposoma, los constituyentes de la membrana, propiamente dichos, son ordinariamente biodegradables, y finalmente se descomponen en el tejido diana o similar. Se cree que la eribulina atrapada, etc., es liberada de esta manera. Por lo demás, es aceptable también que el liposoma propiamente dicho se incorpore dentro de células.

35 La composición liposomal no solamente puede ser dirigida al tejido diana tal como un cáncer sólido, sino que también se puede usar para transmitir compuestos activos a un cáncer hematológico, etcétera. También se puede usar como una formulación de liberación lenta, como una formulación de liberación controlada, etc., en sangre.

40 El tamaño de partículas de un liposoma se puede ajustar de acuerdo con el objetivo establecido. Por ejemplo cuando se pretende transmitir un liposoma a un tejido canceroso o a un tejido inflamado por el efecto EPR (Enhanced Permeability and Retention = de permeabilidad y retención aumentadas) como un producto inyectable o similar, es preferible que el tamaño de partículas del liposoma sea de 30 a 400 nm y es más preferible que este tamaño de partículas sea de 50 a 200 nm. En el caso de que la intención sea transmitir un liposoma a un macrófago, es preferible que el tamaño de partículas del liposoma sea de 30 a 1000 nm, y es más preferible que este tamaño de partículas sea de 100 a 400 nm. En el caso de que la composición liposomal se haya de usar como una preparación oral o una preparación transdérmica, el tamaño de partículas del liposoma se puede ajustar en varios micrómetros.

45 Deberá señalarse que (1) en un tejido normal, las paredes vasculares sirven como barreras (puesto que las paredes vasculares están constituidas densamente por células endoteliales vasculares), y unas micropartículas, tales como supermoléculas, y un liposoma de tamaño especificado no se pueden distribuir dentro del tejido. Sin embargo, en un tejido enfermo, las paredes vasculares están descohesionadas (puesto que existen intersticios entre células endoteliales vasculares), aumentando la permeabilidad vascular, y las supermoléculas y las micropartículas pueden ser distribuidas a un tejido extravascular (permeabilidad aumentada). Por lo demás, (2) el sistema linfático está bien desarrollado en un tejido normal, pero es conocido que el sistema linfático no es desarrollado en un tejido enfermo y que las supermoléculas o las micropartículas, una vez que han sido incorporadas, no son recicladas a través del sistema general y son retenidas en el tejido enfermo (retención aumentada) - esto se denomina el efecto EPR (Matsumura, Maeda, Cancer Research, (1986), 46: páginas 6387-6392). Consiguientemente, es posible controlar la

55 farmacocinética ajustando el tamaño de partículas del liposoma.

En el presente invento, el tamaño de partículas de un liposoma significa el tamaño medio ponderado de partículas de acuerdo con el método de dispersión dinámica de la luz (método de dispersión casi elástica de la luz). En el presente caso se muestra que el tamaño de partículas se mide por instrumentos de dispersión dinámica de la luz (p.ej., el Zetasizer Nano ZS modelo fabricado por Malvern Instruments Ltd. y el ELS-8000 fabricado por Otsuka Electronics Co., Ltd.). Los instrumentos miden el movimiento Browniano de las partículas y el tamaño de partículas se determina basándose en la teoría metodológica consagrada de dispersión dinámica de la luz.

No hay limitaciones particulares acerca del disolvente de la fase interna liposomal y pueden citarse, por ejemplo, unas soluciones tamponadoras tales como una solución tamponadora de fosfato, una solución tamponadora de citrato y una solución salina fisiológica tamponada con fosfato, agua salina fisiológica, unos medios de cultivo para cultivar células, etc., Como disolvente en el caso de que se use una solución tamponadora es preferible que la concentración del agente tamponador sea de 5 a 300 mM, y es más preferible la de 10 a 100 mM. No hay limitaciones particulares acerca del pH de la fase interna liposomal pero es preferible uno de 3 a 11 y es más preferible uno de 4 a 9.

(Composición liposomal)

Una composición liposomal es ofrecida de acuerdo con el presente invento. La composición liposomal contiene un liposoma, y además contiene eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisibles, una sal de amonio, y una sal, un ácido, una base y/o un aminoácido en la fase interna liposomal. Como se ha mencionado más arriba, la composición liposomal incluye tanto una forma sólida como una forma líquida. En el caso de que el liposoma esté en una forma sólida, se puede convertir en una forma líquida disolviéndola o suspendiéndola en un disolvente prescrito tal como se describirá más adelante. En el caso de que la composición liposomal sea un sólido congelado, éste puede convertirse en una forma líquida fundiéndolo y dejándolo reposar a la temperatura ambiente.

La concentración de un liposoma y la concentración del compuesto activo en la composición liposomal se pueden ajustar apropiadamente de acuerdo con el objetivo de la composición liposomal, la formulación, etc., En el caso de que la composición liposomal sea una formulación líquida, la concentración de un liposoma como la concentración de todos los lípidos que constituyen el liposoma se puede ajustar a 0,2 hasta 100 mM, y preferiblemente a 1 hasta 30 mM. El proceso de concentración (dosificación) del compuesto activo, en el caso de que la composición liposomal se use como una medicina, se describirá más adelante. Con respecto a la cantidad de ciclodextrina en la composición liposomal, es preferible que ella sea de menos que 0,1 equivalentes molares con relación a la eribulina, etc., y es más preferible que ella sea menor que el límite de detección.

En la composición liposomal del presente invento, la eribulina, etc., se puede aportar a la bicapa lipídica.

No hay limitaciones particulares acerca del disolvente (medio de dispersión) de la composición liposomal en el caso de que la composición liposomal sea una formulación líquida, y se pueden citar, por ejemplo, unas soluciones tamponadoras, tales como una solución tamponadora de fosfato, una solución tamponadora de citrato y una solución salina fisiológica tamponada con fosfato, agua salina fisiológica y unos medios de cultivo para cultivar células. No hay limitaciones particulares para el pH de la fase externa liposomal de la composición liposomal, pero es preferible uno de 3 a 11 y es más preferible uno de 4 a 9.

Se pueden añadir también a la composición liposomal las siguientes sustancias: unos monosacáridos tales como glucosa, galactosa, manosa, fructosa, inositol, ribosa y xilosa; unos disacáridos tales como lactosa, sacarosa, celobiosa, trehalosa y maltosa; unos trisacáridos tales como rafinosa y melecitosa; unos polisacáridos tales como ciclodextrina; y unos alcoholes de azúcares tales como eritritol, xilitol, sorbitol, manitol y maltitol; unos alcoholes polivalentes tales como glicerol, diglicerol, poliglicerol, propilen glicol, polipropilen glicol, etilen glicol, dietilen glicol, trietilen glicol, polietilen glicol, un monoalquil-éter de etilen glicol, un monoalquil-éter de dietilen glicol y 1,3-butilen glicol. Se pueden usar también combinaciones de un azúcar y un alcohol.

Para finalidades de almacenamiento a largo plazo del liposoma que es dispersado en el disolvente (medio de dispersión), desde el punto de vista de la estabilidad física incluyendo una coagulación, etc., es preferible eliminar el electrólito en la mayor cantidad que sea posible en el disolvente (medio de dispersión). Por lo demás, desde el punto de vista de la estabilidad química de los lípidos, es preferible ajustar el pH del disolvente (medio de dispersión) desde un valor ácido hasta la proximidad de un valor neutro (pH de 3,0 a 8,0), y retirar el oxígeno disuelto mediante borboteo de nitrógeno.

No hay limitaciones particulares acerca de la concentración del azúcar o del alcohol polivalente contenido en la composición liposomal, pero en un estado en el que el liposoma está dispersado en un disolvente, por ejemplo, es preferible que la concentración del azúcar sea de 2 a 20 % (P/V = peso/volumen), y es más preferible una 5 a 10 % (P/V). Con respecto a la concentración del alcohol polivalente, es preferible una de 1 a 5 % (P/V) y es más preferible una de 2 a 2,5 % (P/V). Estos disolventes se pueden usar también como la fase externa liposomal del líquido para dispersión de liposomas, y sustituyendo o diluyendo con estos disolventes a la fase externa liposomal de la solución para la preparación de liposomas es posible cambiar las soluciones de la fase externa liposomal por estas soluciones.

Es preferible que las formulaciones sólidas de la composición liposomal incluyan, por ejemplo, unos monosacáridos tales como glucosa, galactosa, manosa, fructosa, inositol, ribosa y xilosa; unos disacáridos tales como lactosa, sacarosa, celobiosa, trehalosa y maltosa; unos trisacáridos tales como rafinosa y melecitosa; unos polisacáridos tales como ciclodextrina; y unos alcoholes de azúcares tales como eritritol, xilitol, sorbitol, manitol y maltitol. Son más preferibles unas mezclas de glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa y sorbitol. Son incluso más preferibles unas mezclas de lactosa, sacarosa y trehalosa. Por estos medios, las formulaciones sólidas pueden ser almacenadas establemente durante largos periodos de tiempo. Cuando están congeladas, es preferible que las formulaciones sólidas contengan unos alcoholes polivalentes (soluciones acuosas) tales como glicerol, diglicerol, un poliglicerol, propilen glicol, un polipropilen glicol, etilen glicol, dietilen glicol, trietilen glicol, polietilen glicol, un monoalquil-éter de etilen glicol, un monoalquil-éter de dietilen glicol y 1,3-butilen glicol. Con respecto a los alcoholes polivalentes (soluciones acuosas), son preferibles glicerol, propilen glicol y un polietilen glicol, y son más preferibles glicerol y propilen glicol. Por estos medios, es posible almacenar establemente la formulación sólida durante largos períodos de tiempo. Unos azúcares y unos alcoholes polivalentes se pueden usar en combinación.

(Método de producción de la composición liposomal)

De acuerdo con el presente invento, se proporciona un método de producción para la producción de una composición liposomal que contiene eribulina o una de sus sales permisibles farmacológicamente. El método para producir la composición liposomal incluye: una etapa en la que se proporciona el líquido para dispersión de liposomas que contiene un liposoma; una etapa en la que el líquido para dispersión de liposomas antes mencionado se mezcla con el compuesto activo antes mencionado (eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisibles); y una etapa en la que el compuesto activo antes mencionado se introduce en la fase interna liposomal del líquido para dispersión del liposoma antes mencionado.

En el presente contexto, la etapa en la que se proporciona el líquido para dispersión de liposomas antes mencionado incluye: una etapa en la que se proporciona una solución para la preparación de liposomas que contiene un liposoma y que contiene una sal de amonio en la fase interna liposomal y en la fase externa liposomal; y una etapa en la que la fase externa liposomal de la solución para la preparación de liposoma antes mencionada es sustituida o diluida, y la etapa en la que fase externa liposomal antes mencionada es sustituida o diluida es una etapa en la que el pH de la fase externa liposomal se hace más alto que el pH de la fase interna liposomal.

La solución para la preparación de liposomas se puede proporcionar, por ejemplo, preparando un liposoma en una solución que contiene una sal de amonio. Por preparación de la solución para la preparación de liposomas en una solución que contiene una sal de amonio, es posible producir un líquido para dispersión de liposomas que también contiene una sal de amonio en la fase interna liposomal.

No hay limitaciones particulares acerca de la solución que contiene una sal de amonio, que se usa cuando se prepara la solución para la preparación de liposomas, y se puede usar cualquier solución que contenga una sal de amonio.

Como una sal de amonio, se pueden citar, por ejemplo, cloruro de amonio, borato de amonio, sulfato de amonio, formiato de amonio, acetato de amonio, citrato de amonio, tartrato de amonio, succinato de amonio y fosfato de amonio. Son preferibles entre éstas, sulfato de amonio, acetato de amonio, citrato de amonio, tartrato de amonio y fosfato de amonio, son más preferibles sulfato de amonio, citrato de amonio y tartrato de amonio y es sumamente preferible el sulfato de amonio.

Pueden usarse estas sales de amonio en combinaciones de dos o más de ellas.

La concentración de la sal de amonio en la solución que contiene una sal de amonio se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con la cantidad de eribulina, etc., que ha de ser atrapada, y es mejor una concentración más alta; es preferible la de 10 mM o más, es más preferible la de 20 mM o más y es incluso más preferible la de 50 mM. Con respecto al pH de la solución que contiene una sal de amonio es preferible el de 3 a 9, es más preferible el 4 a 9 desde el punto de vista de equilibrar la relación de atrapamiento y la estabilidad, y el de 5 a 8 es incluso más preferible.

Un agente ajustador del pH se puede usar con el fin de ajustar el pH de la solución que contiene una sal de amonio. No hay limitaciones particulares acerca de la concentración de los agentes ajustadores del pH individuales en la solución que contiene una sal de amonio, pero es preferible la de 1 a 300 mM y es más preferible la de 5 a 100 mM.

Como el agente ajustador del pH pueden citarse, por ejemplo, unos aminoácidos tales como arginina, histidina, y glicina; unos ácidos tales como ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glutámico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido propiónico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido láctico, ácido bórico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido adípico, ácido clorhídrico, y ácido sulfúrico; unas sales de los ácidos antes mencionados tales como una sal de sodio, una sal de potasio y una sal de amonio; y unos compuestos alcalinos (bases) tales como tris-hidroximetil-amino metano, agua amoniaca (amoníaco), hidróxido de sodio e

5 hidróxido de potasio. Como agentes ajustadores del pH, son más preferibles hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, agua amoniacal, ácido acético, ácido láctico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido cítrico y ácido fosfórico; son más preferibles hidróxido de sodio, agua amoniacal, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido cítrico y ácido fosfórico; y son incluso más preferibles hidróxido de sodio, agua amoniacal, ácido clorhídrico, ácido cítrico y ácido fosfórico. Los agentes ajustadores del pH se pueden usar en combinaciones de o más de las sales de amonio. Además de ello, unas soluciones tamponadoras se pueden usar también como agentes ajustadores del pH, tal como una solución tamponadora de fosfato, una solución tamponadora de citrato y una solución salina fisiológica tamponada con fosfato.

10 Como la solución para la preparación de liposomas, lo mejor es usar una solución que se obtiene preparando un liposoma sin inclusión sustancial de ciclodextrina. Como la solución para la preparación de liposomas la fase interna liposomal también contiene una sal, un ácido, una base y/o un aminoácido. En este caso, es preferible que la fase interna liposomal contenga el compuesto activo, una sal de amonio y un ácido. Como la sal de amonio, se puede citar sulfato de amonio como el ejemplo preferido; como el ácido se puede citar ácido cítrico como el ejemplo preferido.

15 Con respecto a la preparación de liposomas pueden citarse el método de la película lipídica (método Vortex), el método de evaporación en fase inversa, el método ultrasónico, el método pre-vesicular, el método de inyección de etanol, el método de la prensa French, el método de retirada de ácido cólico, el método de carga de Triton X-100, el método de fusión de  $\text{Ca}^{2+}$ , el método de inyección de un éter, el método de reanillamiento, el método de congelación y descongelación, etc.

20 Las diversas condiciones (cantidades de constituyentes de la membrana, temperatura, etc.) en la preparación de liposomas se pueden seleccionar apropiadamente de acuerdo con el método de preparación de liposomas, la composición liposomal diana, el tamaño de partículas, etc., (véase Op. cit, Kikuchi (1983), etc.).

25 El tamaño de partículas de un liposoma se puede ajustar opcionalmente como sea necesario. El tamaño de partículas se puede ajustar, por ejemplo, realizando una extrusión (filtración con extrusión) bajo una alta presión usando un filtro de membrana con un diámetro regular de poros. El ajuste del tamaño de partículas se puede realizar con cualquier temporización durante la producción de la composición liposomal del presente invento. Por ejemplo, se puede realizar antes del ajuste de la fase externa liposomal en la solución para la preparación de liposomas, después del ajuste de la fase externa liposomal en la solución para la preparación de liposomas, o después de la introducción del compuesto activo en la fase interna liposomal. Es preferible realizar el ajuste del tamaño de partículas antes de haber introducido el compuesto activo dentro de la fase interna liposomal, y es más preferible realizarlo antes de ajustar la fase externa liposomal en la solución para la preparación de liposomas.

35 El líquido para dispersión de liposomas se puede obtener sustituyendo o diluyendo la fase externa de la solución obtenida para la preparación de liposomas. La sustitución o dilución de la fase externa liposomal se puede realizar una sola vez, o una combinación de diversos tipos de métodos de sustitución o dilución se puede realizar múltiples veces.

40 Como un método para sustituir la fase externa liposomal de la solución para la preparación de liposomas pueden citarse una diálisis, una separación centrífuga y una filtración en gel. Por sustitución de la fase externa liposomal, el presente invento se puede ejecutar de manera tal que fase externa liposomal no contenga sustancialmente ni ciclodextrina ni una sal de amonio. Por lo demás, por sustitución o dilución de la fase externa liposomal, es posible atrapar eficientemente la eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisibles en la fase interna liposomal.

La diálisis se puede realizar, por ejemplo usando una membrana de diálisis. Como membrana de diálisis, se puede citar una membrana con una fracción de corte de pesos moleculares, tal como un tubo de celulosa o Spectra/Por.

45 Con respecto a la separación centrífuga, la aceleración centrífuga se puede realizar preferiblemente a 100.000 g o más alta, y más preferiblemente a 300.000 g o más alta. Sustituyendo la fase externa liposomal por centrifugación se puede también realizar el proceso de concentración del liposoma en unión con la sustitución de la fase externa liposomal.

La filtración en gel se puede llevar a cabo por ejemplo, realizando un fraccionamiento basado en el peso molecular usando una columna tal como Sephadex o Sepharose.

50 Como el disolvente (medio de dispersión) usado cuando se sustituye y/o diluye la fase externa liposomal se pueden citar, por ejemplo, una solución de sacarosa, una solución salina y un medio de cultivo para cultivar células. Por uso de estos disolventes es posible preparar una composición liposomal estable.

No hay limitaciones particulares acerca el pH de dicho disolvente, pero se puede ajustar un intervalo de 2 a 11; es preferible el de 3 a 10, es más preferible el de 6 a 10, y es incluso más preferible el de 7 a 10. Tal como se describirá

más adelante, se puede usar un gradiente de pH para introducir la eribulina, etc., dentro de la fase interna liposomal. En este caso el pH del disolvente se puede ajustar de manera tal que la fase externa liposomal alcance el pH diana.

5 Un agente ajustador del pH se puede usar con el fin de ajustar el pH de dicho disolvente. No hay limitaciones particulares acerca de la concentración de uso, pero es preferible la de 1 a 300 mM y es más preferible la de 5 a 100 mM.

10 Como el agente ajustador del pH se pueden citar, por ejemplo amino ácidos tales como arginina, histidina y glicina: unos ácidos tales como ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glutámico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido propiónico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido láctico, ácido bórico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido adípico, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico; unas sales de los ácidos antes  
15 mencionados tales como una sal de sodio, una sal de potasio y una sal de amonio; y unos compuestos alcalinos (unas bases) tales como tris-hidroximetil-amino metano, agua amoniaca, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio. Son preferibles hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, histidina, ácido tartárico, ácido succínico, ácido cítrico y ácido fosfórico; son más preferibles hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, histidina, ácido tartárico, ácido succínico, ácido cítrico y ácido fosfórico; y son incluso más preferibles hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, histidina y ácido fosfórico. Los agentes ajustadores del pH se pueden usar en combinaciones de o más de las sales de amonio.

20 Con el fin de mejorar la relación de atrapamiento de la eribulina o de una de sus sales farmacológicamente permisibles en un liposoma, esta relación de atrapamiento se puede aumentar añadiendo a la fase externa liposomal una solución (solución de sal) que contiene un electrólito con el fin de aumentar la intensidad iónica. No hay limitaciones particulares en el electrólito (la sal) contenido(a) en la fase externa liposomal, pero son preferibles cloruro de sodio y cloruro de potasio y es más preferible cloruro de sodio. Se puede usar también una solución salina fisiológica. Por lo demás, como la fase externa liposomal del líquido para dispersión de liposomas o similar se pueden incluir un azúcar, un electrólito y/o un aminoácido y se pueden incluir también un azúcar o un electrólito, y un aminoácido. Como un azúcar, se puede citar sacarosa como el ejemplo preferido; como un electrólito se pueden  
25 citar una solución salina fisiológica y cloruro de sodio como ejemplos preferidos, y como un aminoácido se puede citar histidina como el ejemplo preferido.

30 Es preferible que el líquido para dispersión de liposomas no contenga sustancialmente nada de ciclodextrina ni de una sal de amonio en la fase externa liposomal ni en la fase interna liposomal, pero en el presente invento la eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisibles se puede introducir en la fase interna liposomal incluso en el caso de que se haya añadido por alguna razón ciclodextrina o una sal de amonio a la fase externa liposomal o al líquido para dispersión de liposomas, e incluso en el caso de que la fase externa liposomal del líquido para dispersión de liposomas contenga ciclodextrina o una sal de amonio.

35 Con respecto a la concentración lipídica del liposoma en el líquido para dispersión de liposomas es preferible la de 1 a 100 mM, y es más preferible la de 1-50 mM. Dentro de estos intervalos, es posible formar apropiadamente un mayor número de partículas de liposoma sin perjudicar a las propiedades físicas del líquido para dispersión de liposomas.

40 La composición liposomal se puede obtener mezclando el líquido obtenido para dispersión de liposomas y el compuesto activo de eribulina, e introduciendo el compuesto activo en la fase interna liposomal del líquido para dispersión de liposomas. Es preferible que la etapa de introducción incluya una etapa en que la permeabilidad de una membrana liposomal es aumentada en la solución mixta del líquido para dispersión de liposomas y del compuesto activo. Por estos medios se puede conseguir el atrapamiento de la eribulina, etc., en el liposoma, en un periodo de tiempo más corto. Sin embargo, incluso si no realizasen operaciones particulares con la finalidad de aumentar la permeabilidad de la membrana liposomal después de mezclar el líquido para dispersión de liposomas y la eribulina, etc., es posible atrapar la eribulina, etc., en el liposoma si se toma el tiempo requerido.

45 En la etapa en la que se mezcla la eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisibles, es posible usar una sustancia disuelta en un disolvente o una sustancia sólida como la eribulina, etc.,. No hay limitaciones particulares acerca del disolvente, y se puede usar, por ejemplo una sustancia idéntica a la de la fase externa liposomal del líquido para dispersión de liposomas.

50 Como una opción cuando sea necesario, es posible usar un gradiente de pH para introducir la eribulina, etc., en la fase interna liposomal. En este caso, con respecto al pH de la fase interna liposomal del líquido para dispersión de liposomas es preferible el de 3 a 9, es más preferible el de 4 a 9 y es incluso más preferible el de 5 a 8.

Por lo demás, es posible ajustar el pH de la fase externa liposomal en un valor más alto que el pH de la fase interna liposomal, para crear un gradiente de pH. El preferible un gradiente de pH de 1 a 5 y es más preferible el de 2 a 3.

Por lo demás, es posible aumentar la relación de atrapamiento en el liposoma llevando el pH de la fase externa liposomal más cerca de la vecindad del pKa de la eribulina, etc., Es preferible el de 7,5 a 12,5 es más preferible el de 8,5 a 11,5 y es incluso más preferible el de 9 a 10,5 (el pKa del mesilato de eribulina es de 9,6).

5 Como la solución para la preparación de liposomas es óptimo usar una solución que se obtiene preparando un liposoma sin inclusión sustancial de ciclodextrina.

Como un método para aumentar la permeabilidad de una membrana liposomal en la solución mixta obtenida, se puede citar el método de calentar la solución mixta, el método de añadir un agente fluidizante de membranas a la solución mixta, etc.,

10 En el caso de que la solución mixta sea calentada, el compuesto activo puede ser introducido generalmente de manera más eficiente dentro de la fase interna liposomal por calentamiento a temperaturas más altas. Específicamente, es preferible ajustar la temperatura de calentamiento tomando en consideración la estabilidad térmica del compuesto activo y los constituyentes empleados de la membrana liposomal. En particular, es preferible que la temperatura de calentamiento se ajuste a la temperatura de transición de fases de la membrana de bicapa lipídica del liposoma o más alta.

15 La "temperatura de transición de fases" de la membrana de la bicapa lipídica del liposoma significa la temperatura a la que comienza la absorción de calor (la temperatura cuando comienza una reacción endotérmica) en un análisis térmico diferencial en condiciones de temperaturas elevadas. Un análisis térmico diferencial es una técnica que hace posible el análisis de las propiedades térmicas de las muestras midiendo las diferencias de temperatura de una muestra o sustancia de referencia en función del tiempo o de la temperatura, mientras que cambia la temperatura de  
20 la muestra o de la sustancia de referencia. En el caso en el que se realice un análisis térmico diferencial con respecto a unos constituyentes de una membrana liposomal, los componentes de la membrana liposomal son fluidizados cuando aumenta la temperatura, y se observa una reacción endotérmica. Como es ampliamente conocido en este sector técnico, el intervalo de temperaturas en el que se observa una reacción endotérmica varía grandemente de acuerdo con los componentes de la membrana liposomal. Por ejemplo en el caso en que los  
25 componentes de una membrana liposomal consistan en un lípido puro, el intervalo de temperaturas en el que se observa una reacción endotérmica es extremadamente estrecho, y una reacción endotérmica se observa frecuentemente dentro de un intervalo de  $\pm 1^\circ\text{C}$  con relación a la temperatura de pico endotérmica. Por otro lado, en el caso de que los componentes de la membrana liposomal consistan en múltiples lípidos, y particularmente en el caso de que los componentes de la membrana liposomal consistan en unos lípidos que se derivan de materiales naturales, el intervalo de temperaturas en el que se observa una reacción endotérmica tiende a ensancharse, y se  
30 observa una reacción endotérmica, por ejemplo, dentro de un intervalo de  $\pm 5^\circ\text{C}$  con relación a la temperatura de pico endotérmico (es decir, que se observa un pico ancho, etc.). De acuerdo con el presente invento, se cree que la fluidización de una membrana liposomal se aumenta y la permeabilidad de una membrana del compuesto activo se aumenta elevando la temperatura a un valor más alto que la temperatura de transición de fases de la membrana de  
35 la bicapa lipídica del liposoma.

Por ejemplo, aunque es dependiente de la estabilidad térmica, etcétera, del compuesto activo y de los constituyentes de la membrana liposomal que se empleen, es preferible tener un intervalo de temperaturas de desde la temperatura de transición de fases de la membrana de bicapa lipídica del liposoma hasta  $+20^\circ\text{C}$  de la temperatura de transición de fases; es más preferible un intervalo de temperaturas de desde la temperatura de transición de fases hasta  
40  $+10^\circ\text{C}$  de la temperatura de transición de fases; y es incluso más preferible un intervalo de temperaturas de desde  $+5^\circ\text{C}$  de la temperatura de transición de fases hasta  $+10^\circ\text{C}$  de la temperatura de transición de fases.

La temperatura de calentamiento es ordinariamente de 20 a  $100^\circ\text{C}$ ; es preferible la 40 a  $80^\circ\text{C}$  y es más preferible la de 45 a  $65^\circ\text{C}$ .

45 Específicamente, en el caso de una membrana liposomal cuyos ingredientes principales son dipalmitoil fosfatidilcolina (la temperatura de transición de fases como sustancia simple:  $41^\circ\text{C}$ ) y colesterol, aunque también depende de la composición de la misma, ordinariamente es preferible una temperatura de calentamiento de 40 a  $60^\circ\text{C}$  y es más preferible una de 45 a  $50^\circ\text{C}$ . Más aun, en el caso de una membrana liposomal cuyos ingredientes principales son fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC; temperatura de transición de fases como sustancia simple: de 50 a  $60^\circ\text{C}$ ) y colesterol, aunque también depende de la composición de la misma, ordinariamente es  
50 preferible una temperatura de calentamiento de 50 a  $70^\circ\text{C}$  y es más preferible una de 55 a  $65^\circ\text{C}$ . Sin embargo, estas temperaturas de calentamiento no limitan de ninguna de las maneras al presente invento.

En la etapa de calentamiento, no hay limitaciones particulares acerca del tiempo durante el que la temperatura es mantenida en o por encima de la temperatura de transición de fases, y éste se puede ajustar apropiadamente dentro de un intervalo, por ejemplo, de desde varios segundos hasta 30 minutos. Tomando en consideración la estabilidad térmica del compuesto activo y de los lípidos así como una producción eficiente de la masa es deseable realizar el  
55 tratamiento dentro de un breve período de tiempo. Esto quiere decir que es preferible que el período de mantenimiento de la temperatura elevada sea de 1 hasta 30 minutos y es más preferible uno desde 2 minutos hasta

5 minutos. Sin embargo, estos tiempos de mantenimiento de la temperatura no limitan de ninguna de las maneras al presente invento.

Por lo demás, tal como se ha señalado con anterioridad, también es posible aumentar la permeabilidad de una membrana liposomal añadiendo un agente fluidizante de membranas a la solución mixta obtenida (es decir añadiéndolo al lado de la fase externa liposomal). Como un agente fluidizante de membranas pueden citarse disolventes orgánicos, agentes tensioactivos, enzimas etc., que son solubles en disolventes acuosos. Más específicamente, como disolventes orgánicos pueden citarse, por ejemplo, unos alcoholes monovalentes tales como alcohol etílico y alcohol bencílico; unos alcoholes polivalentes tales como glicerol y propilenglicol; unos disolventes polares apróticos tales como dimetil sulfóxido (DMSO). Como agentes tensioactivos, pueden citarse, por ejemplo; unos agentes tensioactivos aniónicos, tales como una sal de sodio de un ácido graso, un monoalquil sulfato y un monoalquil fosfato; unos agentes tensioactivos catiónicos, tales como una sal de alquil trimetil amonio; unos agentes tensioactivos anfólicos tales como un óxido de alquil dimetilamina; y unos agentes tensioactivos no iónicos tales como un polioxietilen alquil-éter, un alquil monogliceril-éter y un éster de sorbitán de un ácido graso. Como enzimas pueden citarse, por ejemplo colinesterasa y colesterol oxidasa. Los expertos en la especialidad pueden ajustar la cantidad del agente fluidizante de membranas de acuerdo con la composición de los constituyentes de la membrana liposomal, el agente fluidizante de membranas etc., y tomando en consideración el grado de eficiencia de atrapamiento del compuesto activo debido a la adición del agente fluidizante de membranas, la estabilidad del etc.

El método de producción de la composición liposomal del presente invento puede incluir una etapa de ajustar el pH de la fase externa liposomal de la composición liposomal obtenida después de la etapa de introducción más arriba mencionada.

El pH de la fase externa que se ha de ajustar no está limitado particularmente, pero preferiblemente puede ser de 4 a 10, más preferiblemente de 5 a 9 e incluso más preferiblemente un valor neutro de 6 a 8, desde el punto de vista de la estabilidad química de la composición del fosfolípido que compone el liposoma.

Además, se puede incluir adicionalmente una etapa de secar la composición liposomal obtenida. Esto es, cuando se usa una composición liposomal en forma de una formulación líquida, la composición liposomal en una forma líquida, que se obtiene en la etapa de introducción más arriba mencionada, se puede usar sin ninguna modificación como la composición liposomal final, o la fase externa liposomal en la composición liposomal líquida que se obtiene en la etapa de introducción más arriba mencionada se puede ajustar (reemplazar, etc.) para producir una composición liposomal final. Cuando se hace así, el ajuste de la fase externa liposomal se puede llevar a cabo de una manera similar al ajuste de la fase externa liposomal en un líquido para la preparación de liposomas. En el caso de que la composición liposomal sea una formulación líquida, ésta se puede usar sin ninguna modificación ulterior.

Por lo demás, en el caso de que la composición liposomal haya de ser convertida en una preparación sólida, la composición liposomal líquida, obtenida en la etapa de introducción más arriba mencionada, puede ser secada para producir la composición liposomal sólida final. Una liofilización y una desecación por atomización se pueden citar como ejemplos de métodos para secar la composición liposomal. En los casos de que la composición liposomal sea una preparación sólida, ésta puede ser disuelta o suspendida en un apropiado disolvente y usada como una formulación líquida. El disolvente que se ha de usar puede ser ajustado apropiadamente de acuerdo con la finalidad de uso, etc., para la composición liposomal, y en el caso de usarse la composición liposomal como un producto inyectable, por ejemplo, el disolvente es preferiblemente agua destilada estéril. En el caso de usarse la composición liposomal como una medicina, el médico o paciente puede inyectar el disolvente dentro de una ampolla, dentro de la que está atrapada la preparación sólida, por ejemplo, para producir la preparación en el momento de uso. En el caso de que la composición liposomal líquida sea una preparación sólida congelada, ésta se puede usar como una composición líquida almacenándola en un estado congelado y se puede devolver a un estado líquido dejándola que se funda a la temperatura ambiente o fundiéndola rápidamente con calor en el momento de uso.

(Composiciones farmacéuticas, etc.)

La composición liposomal del presente invento se puede usar como una medicina curativa en el sector médico. Específicamente, la composición liposomal del presente invento se puede usar como una composición farmacéutica antitumoral.

En el caso de que la composición liposomal del presente invento se use como una composición farmacéutica, la composición liposomal se puede administrar por inyección (intravenosa o intraarterial o por inyección local), por vía oral, por vía nasal, por vía subcutánea, por vía pulmonar o por medio de gotas oculares, y en una inyección local particular a un grupo, establecido como diana, de células o de un órgano u otra de tales inyecciones son preferibles, además de la inyección intravenosa, una inyección subcutánea, una inyección intracutánea y una inyección intraarterial. Se pueden presentar una tableta, un polvo, un granulado, un jarabe, una cápsula, un líquido y similares como ejemplos de la formulación de la composición liposomal en el caso de una administración por vía oral. Un producto inyectable, una inyección gota a gota, un colirio para los ojos, un ungüento, un supositorio, una suspensión, una cataplasma, una loción, un aerosol, un parche, y unos medios similares se pueden presentar como ejemplos de

formulaciones de la composición liposomal en el caso de una administración que no sea por vía oral, y son particularmente preferibles un producto inyectable y un agente de infusión gota a gota.

5 La dosificación de la composición farmacéutica difiere notablemente dependiendo del tipo de enfermedad diana, del tipo del compuesto activo, así como de la edad, el sexo y el peso del paciente, la gravedad de los síntomas, juntamente con otros factores, pero, ordinariamente, la dosificación diaria de eribulina o de una de sus sales farmacológicamente permisibles para adultos no está restringida particularmente, aunque el mesilato de eribulina, que es una sal apropiada, está ordinariamente en una cantidad de 0,1 a 10 mg. También, la administración puede ser dividida en más de una dosis por día. Una composición liposomal que contiene, por ejemplo, 0,01-300 mg/ml de eribulina o su sal [error tipográfico] [sic: farmacológicamente] permisible a la fase interna liposomal se puede  
10 administrar como la composición liposomal del presente invento.

(Estuche)

De acuerdo con el presente invento, se proporciona un estuche para preparar la composición liposomal. El estuche se puede usar para preparar la composición liposomal como una medicina, que puede ser usada por un médico en un entorno clínico o por un paciente.

15 El estuche incluye un reactivo liposomal. El reactivo liposomal puede estar en una forma o bien sólida o líquida. Si el reactivo liposomal está en una forma líquida, el líquido para dispersión de liposomas, antes mencionado, se puede usar como el reactivo liposomal. También, si el reactivo liposomal está en una forma sólida, el reactivo liposomal puede ser disuelto o suspendido en un disolvente apropiado para obtener el líquido para dispersión de liposomas, y el líquido para dispersión de liposomas, más arriba mencionado, puede ser secado para obtener el reactivo  
20 liposomal. Una desecación se puede llevar a cabo de una manera similar a la de la desecación de la composición liposomal, que más arriba se ha mencionado. Cuando se usa el estuche, si el reactivo liposomal está en una forma sólida, el reactivo liposomal puede ser disuelto o suspendido en un disolvente apropiado para producir el líquido para dispersión de liposomas. Cuando se trabaja así, el disolvente es similar a la fase externa liposomal en el líquido para dispersión de liposomas más arriba mencionado.

25 El estuche del presente invento contiene además eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisible (el mesilato de eribulina es una sal apropiada). La eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisibles puede estar o bien en una forma sólida o líquida (en un estado disuelto o suspendido en un disolvente). Cuando se usa el estuche, si la eribulina o similar está en una forma sólida, es preferible que ella sea disuelta o suspendida en un disolvente apropiado para producir una forma líquida. El disolvente puede ser ajustado apropiadamente de acuerdo  
30 con las propiedades físicas y similares de la eribulina o similar, y puede ser hecha similar a la fase externa liposomal en el líquido para dispersión de liposomas más arriba mencionado, por ejemplo. El estuche del presente invento puede incluir un compuesto activo distinto de la eribulina o una de sus sales farmacológicamente permisible.

En el estuche, el reactivo liposomal y el compuesto activo se pueden envasar por separado, o ellos pueden estar en formas sólidas y ser mezclados conjuntamente.

35 En el caso de que el reactivo liposomal esté en una forma sólida, excluyendo los casos de disolver o suspender para formar un líquido para dispersión de liposomas como anteriormente se han mencionado, el estuche se puede usar llevando a cabo una etapa similar a la de mezclar el líquido para dispersión de liposomas y el compuesto activo y la de introducir el compuesto activo en la fase interna liposomal del líquido para dispersión de liposomas en el método de producción de la composición liposomal más arriba mencionada.

40 De este modo es posible producir una composición liposomal en la que un compuesto activo se introduce en la fase interna del reactivo liposomal.

45 En el caso de que el reactivo liposomal y el compuesto activo estén ambos en formas sólidas y sean envasados conjuntamente, la mezcla del reactivo liposomal y del compuesto activo es apropiadamente disuelta o suspendida en un disolvente. Cuando se trabaja así, el disolvente es similar a la fase externa liposomal en el líquido para dispersión de liposomas más arriba mencionado. De este modo es posible formar un estado en el que el líquido para dispersión de liposomas y el compuesto activo se mezclan, después de lo cual se hace posible un uso llevando a cabo otras etapas en la introducción del compuesto activo en la fase interna liposomal del líquido para dispersión de liposomas en el método de producción de la composición liposomal más arriba mencionada.

Formas de realización

50 El presente invento se describe específicamente presentando Formas de realización y Ejemplos comparativos, pero no está limitado a las formas de realización siguientes.



(Forma de realización 1)

<Preparación de una solución acuosa para la fase interna liposomal>

396,4 mg de sulfato de amonio y 189,1 mg de ácido cítrico monohidrato se disolvieron en agua pura, y este material se diluyó hasta 15 ml para preparar una mezcla de 200 mM de sulfato de amonio y 60 mM de ácido cítrico acuoso. Después de haber ajustado 2,5 ml de la mezcla de 200 mM de sulfato de amonio y 60 mM de ácido cítrico acuoso con amoniaco acuoso a un pH de 5,5, la solución acuosa para la fase interna liposomal fue diluida hasta 5 ml con agua pura.

<Preparación del líquido para la preparación de liposomas>

Después de haber disuelto 317,9 mg de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (producida por Lipoid), 116,0 mg de colesterol (producido por Sigma) y 130,4 mg de polietilen glicol 2.000-fosfatidiletanolamina (producida por Genzime, MPEG 2.000-diestearoil fosfatidiletanolamina) en 10 ml de cloroformo, este material se dispensó con exactitud dentro de tres ampollas, después lo cual el cloroformo de una ampolla se retiró bajo presión reducida en un evaporador rotatorio para crear una película lipídica. 5 ml de la solución acuosa para la fase interna liposomal se calentaron a aproximadamente 60°C y se añadieron a la película lipídica obtenida, y este material se agitó para preparar un líquido para la preparación de liposomas. Después de haber tratado el líquido para la preparación de liposomas con ondas ultrasónicas durante 20 minutos, éste fue granulado con una extrusora (fabricada porLipex Biomembranes) calentada a aproximadamente 65°C para obtener el líquido para la preparación de liposomas. El tamaño de partículas de los liposomas en el líquido obtenido para la preparación de liposomas, se midió usando un método dinámico de dispersión de luz y todas ellas fueron de 90 a 100 nm.

<Preparación del líquido para dispersión de liposomas>

Usando unas columnas de Sephadex G-50 el líquido obtenido para la preparación de liposomas fue eluido con una solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina (de pH = 7,6), sustituyendo la fase externa liposomal por la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina. Después de haber sustituido la fase externa liposomal, este material fue centrifugado durante 30 minutos a 400.000 × g. Después de la centrifugación este material fue redispersado y la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina se usó para preparar un volumen de 5 ml, obteniéndose el líquido para dispersión de liposomas

<Preparación de la solución de compuesto activo>

El mesilato de eribulina se disolvió en una solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de hitidina para obtener 1 mg/ml de mesilato de eribulina

<Preparación de la composición liposomal>

0,5 ml del líquido para dispersión de liposomas y 0,5 ml de la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio con una capacidad de 10 ml y este material fue incubado durante 3 minutos en agua a 55 °C para obtener una composición liposomal con el mesilato de eribulina introducido en el liposoma.

<Medición de la relación de atrapamiento>

La relación de atrapamiento se determinó como se describirá más adelante.

La composición liposomal que atrapaba a un compuesto activo fue centrifugada durante 30 minutos a 400.000 x g. La concentración del compuesto activo en el material filtrado se midió con una HPLC, cuantificando la cantidad de compuesto activo no atrapada en el liposoma. La relación de atrapamiento se calculó usando la fórmula siguiente.

(Fórmula 1)

$$\text{Relación de atrapamiento (\%)} = \frac{\text{Cantidad de compuesto activo en cantidad total (mg)} - \text{cantidad de compuesto activo en el material filtrado después de la ultracentrifugación (mg)}}{\text{Cantidad de compuesto activo en total (mg)}} \times 100$$

La relación de atrapamiento del mesilato de eribulina fue de 90,9 %.

(Forma de realización 2)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna liposomal>

De manera similar a la Forma de realización 1, 264,3 mg de sulfato de amonio y 126,1 mg de ácido cítrico monohidrato se disolvieron en agua pura y se usó un matraz graduado para diluir este material hasta 10 ml con el fin de preparar una mezcla de 200 mM de sulfato de amonio y 60 mM de ácido cítrico acuoso. De este material, se tomó 1 ml y se ajustó a un pH de 5,5 con agua amoniacal, después de lo cual este material se diluyó con agua pura hasta 2 ml para preparar la solución acuosa de la fase interna liposomal.

<Preparación del líquido para la preparación de liposomas>

80 mg de cada componente de una mezcla de lípidos (fosfatidilcolina de soja hidrogenada : colesterol : polietilen glicol 2.000 fosfatidil etanol amina = 58,6:19,2:22,2 (en peso)) se pesaron, 2 ml de la solución acuosa de la fase

interna liposomal se calentaron a aproximadamente 80°C y se añadieron a este material, y este material se agitó para preparar el líquido para la preparación de liposomas. Este líquido para la preparación de liposomas se granuló usando una extrusora (fabricada porLipex Biomembranes) calentada a aproximadamente 80°C para obtener el líquido para la preparación de liposomas.

5 <Preparación del líquido para dispersión de liposomas>

El líquido obtenido para la preparación de liposomas se diluyó hasta 10 ml por la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina (de pH = 7,6), y este material se centrifugó durante 30 minutos a 400.000 × g. Después de haber centrifugado, la totalidad del material filtrado se desechó. El precipitado fue redispersado con la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina, y se usó un matraz graduado para preparar 1 ml de un líquido, con lo que se obtuvo el líquido para dispersión de liposomas.

<Preparación de la solución de fármaco>

El mesilato de eribulina (mesilato de eribulina) se disolvió en la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina y se obtuvieron 5 mg/ml de una solución de mesilato de eribulina.

<Preparación de la composición liposomal>

15 0,96 ml del líquido para dispersión de liposomas y 0,24 ml de la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio con una capacidad de 10 ml, y éste se incubó durante 3 minutos en agua a 60°C para obtener una composición liposomal con el mesilato de eribulina introducido en el liposoma.

<Estabilidad en un plasma sanguíneo de rata>

20 Se mezclaron 0,2 ml del liposoma con el mesilato de eribulina atrapado, que se había preparado, y 1,8 ml de un plasma sanguíneo de rata y este material se agitó a 37°C usando una incubadora en fase líquida. Inmediatamente después de la preparación, se realizó un muestreo a las 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas después de que hubiera comenzado el sacudimiento y la cantidad residual de mesilato de eribulina en el liposoma se midió con una HPLC.

25 Los resultados de las mediciones se muestran en la Fig. 1. Como se puede observar en esta Fig. 1, se indicó que el mesilato de eribulina había sido retenido establemente en el plasma sanguíneo incluso durante el largo intervalo de tiempo de 120 horas y fue posible una liberación gradual.

(Forma de realización 3)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna liposomal>

30 264,3 mg de sulfato de amonio y 126,1 mg de ácido cítrico monohidrato se disolvieron en agua pura para obtener aproximadamente 15 ml. Después de haber ajustado el pH a 7,0 con una solución acuosa de hidróxido de sodio, este material se diluyó hasta 20 ml con agua pura para preparar la solución acuosa para la fase interna liposomal (mezcla de 100 mM de sulfato de amonio y 30 mM de ácido cítrico).

<Preparación del líquido para la preparación de liposomas>

35 378 mg de una mezcla de lípidos (fosfatidilcolina de soja hidrogenada : colesterol : polietilen glicol 2.000 fosfatidil etanol amina = 58,6:19,2:22,2 (en peso)) se pesaron, 10 ml de la solución acuosa más arriba mencionada para la fase interna liposomal se calentaron a aproximadamente 80°C y se añadieron a este material, y este material se agitó para preparar el líquido para la preparación de liposomas. El líquido para la preparación de liposomas se granuló usando una extrusora (fabricada porLipex Biomembranes) provista de un filtro de membrana de policarbonato de 50 nm y se calentó a aproximadamente 80°C para obtener el líquido para la preparación de liposomas con un tamaño de partículas de aproximadamente 80 nm.

<Preparación del líquido para dispersión de liposomas>

45 Usando unas columnas de Sephadex G-50, el líquido obtenido para la preparación de liposomas se eluyó con una solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina (de pH = 7,6), sustituyendo la fase externa liposomal por una solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina. Después de haber sustituido la fase externa liposomal, este material fue centrifugado durante 30 minutos a 400.000 × g. Después de haber centrifugado, este material fue redispersado con 96 mg/ml de una solución acuosa de sacarosa y 10 mM de histidina (de pH = 7,6), y 10 ml de la solución se diluyeron 10 ml para obtener el líquido para dispersión de liposomas.

<Preparación de la solución de fármaco>

50 El mesilato de eribulina se disolvió con una solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina (de pH = 7,6) y se obtuvieron 5 mg/ml de una solución de mesilato de eribulina

<Preparación de la composición liposomal>

9,6 ml del líquido para dispersión de liposomas y 1,2 ml de la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio con una capacidad de 10 ml, y se usó hidróxido de sodio para ajustar el pH a 9,5. Este material se incubó durante 3 minutos en agua a 60°C para obtener una composición liposomal con el mesilato de eribulina

introducido en el liposoma. Después de haber enfriado se usó un cloruro para ajustar el pH a 7,5. Similarmente a la Forma de realización 1, se midió la relación de atrapamiento y se encontró que era de 99%.

(Forma de realización 4)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna liposomal>

5 Similarmente a la Forma de realización 1, se preparó una mezcla de 100 mM de sulfato de amonio y 30 mM de ácido cítrico (de pH = 5,5)

<Preparación del líquido para la preparación de liposomas>

10 La fosfatidilcolina de soja hidrogenada, el colesterol y la polietilen glicol 2.000-fosfatidiletanolamina se pesaron de acuerdo con las cantidades mostradas en la Tabla 1 siguiente. Después de haber disuelto cada uno de los compuestos en 3 ml de cloroformo, el cloroformo se retiró bajo presión reducida en un evaporador rotatorio para crear una película lipídica. 10 ml de la solución acuosa preparada para la fase interna liposomal se calentaron a aproximadamente 80°C y se añadieron a la película lipídica obtenida y este material se agitó para preparar un líquido para la preparación de liposomas. Éste se granuló usando una extrusora (fabricada por Lipex Biomembranes) calentada a aproximadamente 80°C para obtener el líquido granulado para la preparación de liposomas. El tamaño de partículas en el líquido obtenido para la preparación de liposomas se midió de acuerdo con un método dinámico de dispersión de luz, y Rp. 1 era de 77 nm, Rp. 2 era de 95 nm, Rp. 3 era de 79 nm, y Rp. 4 era de 128 nm.

(Tabla 1)

Rp.	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada	Colesterol	Polietilen glicol 2.000-fosfatidiletanolamina
1	234 mg	76 mg	15 mg
2	234 mg	76 mg	15 mg
3	222 mg	73 mg	87 mg
4	222 mg	73 mg	87 mg

<Preparación de la composición liposomal>

20 Similarmente a la Forma de realización 1, se obtuvo el líquido para dispersión de liposomas. También el mesilato de eribulina se disolvió en una solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina y se obtuvieron 5 mg/ml de mesilato de eribulina.

25 4,8 ml de cada de los líquidos para dispersión de liposomas y 0,6 ml de una solución de mesilato de eribulina se mezclaron en unos recipientes de vidrio con una capacidad de 10 ml, que fueron incubados durante 3 minutos en agua a 60°C para obtener unas composiciones liposomales con el mesilato de eribulina introducido en el liposoma. Se añadieron 24,6 ml de la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina a cada una de las composiciones liposomales y se usó un filtro de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,22 µm para filtrar y esterilizar, con lo que se obtuvo una muestra para administración (concentración de mesilato de eribulina: 0,1 mg/ml). Similarmente a la Forma de realización 1, se midió la relación de atrapamiento y se confirmó que era por lo menos de 90 % en cada una de las prescripciones.

35 Unas ratonas hembras desnudas (NU/NU, de Charles River Laboratories Japan, Inc.) se inocularon subcutáneamente con células de un melanoma humano LOX, y 11 o 12 días más tarde, las muestras se administraron a las venas caudales de manera tal que estuvieran concentradas en 10 ml/kg (1,0 mg/kg para el mesilato de eribulina). Se tomó una muestra de sangre y la extracción del tejido tumoral se llevó a cabo por punción cardíaca en periodos de tiempo fijos después de la administración (15 minutos, 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, y 48 horas) (n = 3). Se tomaron muestras de la sangre en un tubo de ensayo que contenía heparina, y en el transcurso de 30 minutos desde el muestreo, la sangre fue separada centrifugando a 1.500 × g durante 10 minutos a 4°C, para obtener el plasma sanguíneo. Todo el tejido tumoral se extrajo, se lavó con una PBS, y se frotó con un papel absorbente de agua y luego el peso del tejido se pesó inmediatamente y se registró. El tejido se colocó en un tubo de ensayo y se enfrió en agua con hielo y luego se almacenó a -80°C hasta que se llevase a cabo el análisis.

El mesilato de eribulina en el plasma sanguíneo y en el tejido tumoral se midió usando una LC/MS/MS.

Los parámetros PK se calcularon usando un software para análisis de modelo no compartimentado (WinNonlin versión 5.0.1). Los resultados de los parámetros PK en plasma sanguíneo y los parámetros PK en tejido tumoral del mesilato de eribulina se muestran respectivamente en la Tabla 2 y en la Tabla 3.

45

(Tabla 2)

Rp. 1-4 y parámetros PK del mesilato de eribulina en un plasma sanguíneo de ratones portadores de un cáncer LOX							
Prescripción	AUC <sub>0-1</sub> (ng·h/ml)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng·h/ml)	CL (ml/h/kg)	V <sub>ss</sub> (ml/kg)	t <sub>1/2</sub> (h)	MRT (h)	Relación 1
Rp,1	253049	258274	3,87	43,99	8,7	11,4	707,1
Rp,2	176148	177893	5,62	56,40	6,8	10,0	487,0
Rp,3	228151	233067	4,29	48,93	8,4	11,4	638,1
Rp,4	221494	230541	4,34	55,88	9,4	12,9	631,2
Mesilato de eribulina	363,02	365,247	2420	8032	3,7	3,3	1,0

Relación 1 = AUC liposoma en plasma/AUC mesilato de eribulina en plasma

(Tabla 3)

Rp. 1-4 y parámetros PK del mesilato de eribulina en un plasma sanguíneo de ratones portadores de un cáncer LOX								
Prescripción	C <sub>[max]</sub> (ng/g)	T <sub>[max]</sub> (h)	AUC <sub>0-1</sub> (ng·h/ml)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng·h/ml)	t <sub>1/2</sub> (h)	MRT (h)	TPI (ml/g)	Relación 2
Rp. 1	692,1	4,0	24960,7	34581,8	22,8	38,8	0,13	5,5
Rp,2	1002,9	8,0	16759,6	22301,1	22,2	34,5	0,13	3,5
Rp,3	3965,7	12,0	41643,7	46297,3	16,1	23,3	0,20	7,4
Rp,4	1132,8	12,0	28377,4	45005,6	23,7	44,3	0,20	7,2
Mesilato de eribulina	323,425	0,25	4649,521	6294,283	17,8	27,7	17,23	1,0

Relación 2 = AUC liposoma en tumor/AUC mesilato de eribulina en tumor

A partir de la Tabla 2 y la Tabla 3 puede observarse que la AUC (área bajo la curva) en plasma sanguíneo y en un tejido tumoral aumenta en comparación con el mesilato de eribulina libre en las cuatro composiciones liposomales Rp. 1 hasta 4, y por lo tanto mejoran la cantidad de emigración en tumor y la retención del mesilato de eribulina.

(Forma de realización 5)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna liposomal>

Similarmente a la Forma de realización 1 se preparó una mezcla de 100 mM de sulfato de amonio y 30 mM de ácido cítrico acuoso (de pH = 5,5).

<Preparación del líquido para la preparación de liposomas>

Se pesaron 221,8 mg de fosfatidilcolina de soja hidrogenada, 72,5 mg de colesterol y 86,9 mg de polietilén glicol 2.000-fosfatidiletanolamina. Después de disolverlos en 3 ml de cloroformo, el cloroformo se retiró bajo presión reducida en un evaporador rotatorio, y se creó una película lipídica. 10 ml de la solución acuosa creada para la fase interna liposomal se calentaron a aproximadamente 80°C y se añadieron a la película lipídica obtenida, y este material se agitó para preparar un líquido para la preparación de liposomas. Éste se granuló usando una extrusora (fabricada por Lipex Biomembranes) calentada a aproximadamente 80°C, y se obtuvo un líquido granulado para la preparación de liposomas. Cuando los tamaños de partículas de los liposomas en el líquido obtenido para la preparación de liposomas se midieron usando un método dinámico de dispersión de luz, ellos fueron de aproximadamente 90 nm.

<Preparación del líquido para dispersión de liposomas>

Usando unas columnas Sephadex G-50 el líquido obtenido para la preparación de liposomas se eluyó con una solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina (de pH = 7,6), sustituyendo la fase externa liposomal por la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina. Después de haber sustituido la fase externa liposomal, ésta se centrifugó durante 30 minutos a 400.000 × g. Después de la centrifugación, este material se redispersó y la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina se usó para preparar 10 ml de un líquido, creando de esta manera un líquido para dispersión de liposomas

<Preparación de la solución de fármaco>

El mesilato de eribulina en la solución de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina y se obtuvo 1 mg/ml de una solución de mesilato de eribulina. También, como muestras de administración de cuerpos libres, la solución de mesilato de eribulina se diluyó con la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina y se usó un

filtro de PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  para filtrar y esterilizar con el fin de obtener muestras para administración (concentraciones de mesilato de eribulina: 0,3 mg/ml y 0,4 mg/ml).

<Preparación de la composición liposomal>

5 1,8 ml del líquido para dispersión de liposomas y 1,2 ml de la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en cada caso en un recipiente de vidrio con una capacidad de 10 ml, que se incubó durante 3 minutos en agua a 60°C para obtener una composición liposomal con el mesilato de eribulina introducido en el liposoma. La composición liposomal obtenida se diluyó con la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina y se usó un filtro de PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  para filtrar y esterilizar con el fin de obtener una muestra para administración (concentración de mesilato de eribulina: 0,2 mg/ml). Similarmente a la Forma de realización 1, se midió la relación de atrapamiento y se confirmó que era por lo menos de 90 %.

15 El FaDu (obtenido de la American Type Culture Collection), que es un linaje de carcinoma de células escamosas faríngeo humano, se cultivó y se hizo crecer en un cultivo de MEM que contenía 10 % de suero de bovino fetal. Las células se separaron desde el matraz usando una solución de 0,05 % de tripsina-EDTA y se recogieron. Después de haber lavado con una PBS, las células se suspendieron en la PBS de manera tal que hubiese  $5 \times 10^7$  células/ml y se mantuvieron en hielo. 0,1 ml del líquido para suspensión de células se inyectaron subcutáneamente en la porción ventral derecha de ratones desnudos con una edad de 6 semanas (Charles River Laboratories Japan, Inc.). Cada ratón fue observado diariamente, y se hicieron anotaciones apropiadamente en los casos en que se encontraron condiciones anormales. Se usaron unos calibres para medir el tamaño de un tumor a lo largo del tiempo y el tamaño del tumor se calculó basándose en la fórmula de cálculo: eje principal  $\times$  (eje secundario al cuadrado)  $\div$  2. En el punto

20 en el que el tamaño del tumor era de 100 a 200  $\text{mm}^3$ , los ratones fueron separados en grupos de manera tal que los valores promedios de los tamaños de los tumores y los pesos corporales de ratones fuesen uniformes entre los grupos de ensayo (cinco ratones por grupo de ensayo), y el fármaco se administró dentro de la vena caudal (0,2 ml/20 g; 3 veces en intervalos de 7 días).

25 Los cambios resultantes en el volumen medio de tumores después de la administración de una muestra se muestran en la Fig. 2.

Como se muestra en la Fig. 2, un efecto reductor del tumor no se obtuvo ni siquiera con 4 mg/kg, que es la dosis máxima tolerada para cuerpos libres, puesto que el FaDu es un linaje celular con una baja sensibilidad al mesilato de eribulina. Mientras tanto, en el caso del material compuesto de liposoma, se encontró un manifiesto efecto reductor de un tumor incluso con la administración de 2 mg/kg, que está por debajo de la dosis de tolerancia máxima, indicando que se puede obtener un efecto farmacológico extremadamente alto incluso para unos tipos de cánceres contra los cuales no se ha obtenido éxito con el mesilato de eribulina.

(Forma de realización 6)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna liposomal>

35 Similarmente a la Forma de realización 1, se preparó una mezcla de 100 mM de sulfato de amonio y 30 mM de ácido cítrico acuoso (de pH = 5,5).

<Preparación de la solución de fármaco>

Similarmente a la Forma de realización 5, se obtuvieron unas muestras de administración (concentraciones de mesilato de eribulina: 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, y 0,4 mg/ml) de cuerpos libres.

<Preparación de la composición liposomal>

40 Excepto por el uso de la solución acuosa de la solución de fase interna liposomal [sic: solución acuosa para la fase interna liposomal] preparada como más arriba se ha descrito, la composición liposomal (concentración de mesilato de eribulina: 0,3 mg/ml) se obtuvo similarmente a la Forma de realización 5. Similarmente a la Forma de realización 1, se midió la relación de atrapamiento y se encontró que era de por lo menos 90 %.

45 El ACHN (obtenido de la American Type Culture Collection), que es un linaje de células de cáncer renal humano, se cultivó y se hizo crecer en un cultivo de MEM que contenía 10 % de suero de bovino fetal. Las células se separaron desde el matraz usando una solución de 0,05 % de tripsina-EDTA y se recogieron. Después de haber lavado con una PBS, las células se suspendieron en la PBS de manera tal que hubiese  $5 \times 10^7$  células/ml y luego se mantuvieron sobre hielo. 0,1 ml del líquido para suspensión de células se inyectaron subcutáneamente en la porción ventral derecha de ratones desnudos con una edad de 6 semanas (Charles River Laboratories Japan, Inc.). Cada ratón fue observado diariamente, y se hicieron anotaciones apropiadamente en los casos de que se encontrasen condiciones anormales. Se usaron unos calibres para medir el tamaño de un tumor en el transcurso del tiempo y el tamaño del tumor se calculó basándose en la fórmula de cálculo: eje principal  $\times$  (eje secundario al cuadrado)  $\div$  2. En el punto en el que el tamaño del tumor era de 150 a 200  $\text{mm}^3$ , los ratones fueron separados en grupos de manera tal que los valores medios de los tamaños de los tumores y los pesos corporales de ratones fuesen uniformes entre los

grupos de ensayo (cinco ratones por grupo de ensayo), y el fármaco se administró a la vena caudal (0,2 ml/20 g; 3 veces en intervalos de 7 días).

Los resultados del cambio en el volumen medio de un tumor después de la administración de una muestra se muestran en la Fig. 3.

- 5 Como se muestra en la Fig. 3, puesto que el ACHN es un linaje celular que es resistente al mesilato de eribulina, no se encontró ninguna diferencia significativa entre cualquiera de la administración de 2 mg/kg, de la administración de 3 mg/kg y de los grupos de administración de cuerpos libres de 4 mg/kg (dosis de tolerancia máxima) y los grupos no tratados a los 45 días después del comienzo de la administración de una muestra. Mientras tanto, en el grupo de administración de 3 mg/kg de la composición liposomal, se encontró un efecto de supresión del crecimiento de un tumor y se indicó un valor significativo del volumen de tumor menor para el grupo no tratado y para los grupos de administración de cuerpos libres a los 45 días después del comienzo de la administración de una muestra. Como se indica de esta manera, es posible retrasar el crecimiento de un tumor preparando una formulación liposomal para un tumor, para el que con anterioridad nunca se ha obtenido un efecto terapéutico con el mesilato de eribulina.

((Forma de realización 7)

- 15 <Preparación de la solución acuosa para la fase interna liposomal>  
Se crearon los 12 tipos de soluciones acuosas para la fase interna, que se muestran seguidamente en la Tabla 4.

<Preparación del líquido para la preparación de liposomas>

- 120 mg de una mezcla de lípidos (fosfatidilcolina de soja hidrogenada : colesterol : polietilen glicol 2.000 fosfatidil etanol amina = 58,6:19,2:22,2 (en peso)) se pesaron dentro de tubos de ensayo y se calentaron a 80°C 3 ml de cada muestra de la solución acuosa para la fase interna.

El líquido para la preparación de liposomas se granuló a 80°C aproximadamente, y se obtuvo el líquido para la preparación de liposomas.

<Preparación de la solución para dispersión de liposomas>

- Usando unas columnas de Sephadex G-50, el líquido obtenido para la preparación de liposomas se eluyó con una solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina sustituyendo la fase externa liposomal por la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina.

Después de haber sustituido la fase externa liposomal, este material se centrifugó durante 1 hora a  $400.000 \times g$  y el material filtrado se retiró completamente. El precipitado se resuspendió con una solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina (de pH = 7,5) de manera tal que se presentasen aproximadamente 2 ml.

- 30 El tamaño de partículas del líquido obtenido para dispersión de liposomas se midió usando un método dinámico de dispersión de luz, y todos fueron de aproximadamente 80 nm.

<Preparación de la solución de fármaco>

El mesilato de eribulina se disolvió en la solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina y se obtuvieron 5 mg/ml de una solución de mesilato de eribulina.

- 35 <Preparación de la composición liposomal>

El líquido para dispersión de liposomas y la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio con una capacidad de 10 ml, de manera tal que la concentración del mesilato de eribulina fuese de 0,2 mg/ml y la concentración total de lípidos fuese de 16  $\mu\text{mol/ml}$ . Este material fue calentado durante 5 minutos a 60°C para obtener una composición liposomal con el mesilato de eribulina introducido en el liposoma

- 40 <Medición de la relación de atrapamiento>

La relación de atrapamiento se midió de una manera similar a la Forma de realización 1, y los resultados se muestran en la Tabla 4. Como puede observarse a partir de la Tabla 4, independientemente de qué cantidad de sal de amonio se usase en la fase interna, mejoraba manifiestamente la relación de atrapamiento del mesilato de eribulina. En particular, la mejoría en la relación de atrapamiento fue notable cuando se usaron sulfato de amonio, citrato de amonio, fosfato de amonio y tartrato de amonio.

- 45

(Tabla 4)

Nº	Composición	pH	Presión osmótica	Relación de atrapamiento (%)
1	50 mM de sulfato de amonio	7,5 (ajustado con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio)	300 mOsm (ajustado con sacarosa)	69,4
2	50 mM de sulfato de sodio			7,2
3	50 mM de acetato de amonio			36,8
4	50 mM de acetato de sodio			10,2
5	50 mM de fosfato de amonio			45,8
6	50 mM de fosfato de sodio			14,6
7	50 mM de citrato de amonio			65,8
8	50 mM de citrato de sodio			8,7
9	50 mM de succinato de amonio			14,7
10	50 mM de succinato de sodio			10,0
11	50 mM de tartrato de amonio			74,7
12	50 mM de tartrato de sodio			11,6

(Forma de realización 8)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna liposomal>

- 5 Similarmente a la Forma de realización 7, la solución acuosa para la fase interna liposomal se preparó a partir de una mezcla de 100 mM de sulfato de amonio y 30 mM de ácido cítrico acuoso (de pH = 7,5).

<Preparación del líquido para la preparación de liposomas>

Similarmente a la Forma de realización 7, la solución acuosa para la fase interna liposomal que se ha mencionado anteriormente se usó para preparar un líquido para la preparación de liposomas.

<Preparación del líquido para dispersión de liposomas>

- 10 Usando unas columnas de Sephadex G-50, el líquido obtenido para la preparación de liposomas se eluyó con una solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina, sustituyendo la fase externa liposomal por la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina

- 15 Después de haber sustituido la fase externa liposomal, este material se centrifugó durante 1 hora a  $400.000 \times g$ , retirando completamente el material filtrado. El precipitado se resuspendió con una solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina (de pH = 7,5), la fase externa liposomal se sustituyó por una solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina (de pH = 7,5), y se obtuvo un líquido para dispersión de liposomas. El tamaño de partículas del líquido obtenido para dispersión de liposomas se midió usando un método dinámico de dispersión de luz y éste fue de aproximadamente 80 nm.

- 20 El líquido para dispersión de liposomas se dispensó dentro de siete ampollas y el sulfato de amonio (ajustado a un pH de 7,5 usando hidróxido de sodio acuoso) en una cantidad conocida se añadió a la fase externa liposomal de manera tal que las ampollas tuviesen las concentraciones de la Tabla 5 y se obtuvo un líquido para dispersión de liposomas, en el que el sulfato de amonio en la fase externa liposomal se presentase con una concentración conocida.

<Preparación de la solución de fármaco>

El mesilato de eribulina se disolvió en la solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina y se obtuvieron 5 mg/ml de una solución de mesilato de eribulina.

<Preparación de la composición liposomal>

- 5 El líquido para dispersión de liposomas y la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio con una capacidad de 10 ml, de manera tal que la concentración del mesilato de eribulina fuese de 0,2 mg/ml y la concentración total de lípidos fuese de 16 mM. Este material se calentó durante 5 minutos a 60 °C para obtener una composición liposomal con el mesilato de eribulina introducido dentro de los liposomas.

<Medición de la relación de atrapamiento>

- 10 La relación de atrapamiento se midió de manera similar a la Forma de realización 1 y los resultados se muestran en la Tabla 5. Esto muestra que incluso si están presentes 0,4 mM de sulfato de amonio en la fase externa liposomal la relación de atrapamiento cae notablemente y no hay casi atrapamiento si están presentes 10 mM de sulfato de amonio

(Tabla 5)

Nº	Fase acuosa interna	Concentración de sulfato de amonio de la fase externa (mM)	Relación de atrapamiento (%)
1	100 mM de sulfato de amonio 30 mM de ácido cítrico pH = 7,5	0	90,4
2		0,016	90,8
3		0,08	91,3
4		0,4	75,9
5		2	36,8
6		10	16,1
7		50	8,6

- 15 (Forma de realización 9)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna liposomal>

Similarmente al Ejemplo 7, la solución acuosa para la fase interna liposomal se preparó a partir de una mezcla de 100 mM de sulfato de amonio y 30 mM de ácido cítrico acuoso (de pH = 7,5).

<Preparación del líquido para la preparación de liposomas>

- 20 Similarmente al Ejemplo 7, la solución acuosa para la fase interna liposomal, que se ha mencionado anteriormente, se usó para preparar el líquido para la preparación de liposomas.

<Preparación de la solución de dispersión de liposomas>

- 25 Usando unas columnas de Sephadex G-50, el líquido obtenido para la preparación de liposomas se eluyó con una solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina sustituyendo la fase externa liposomal por la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina.

Después de haber sustituido la fase externa liposomal, este material se centrifugó durante 1 hora a 400.000 × g y el material filtrado se retiró completamente. El precipitado se resuspendió con una solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina (de pH = 7,5), la fase externa liposomal se sustituyó por una solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina (de pH = 7,5), y se obtuvo un líquido para dispersión de liposomas. El tamaño de partículas del líquido obtenido para dispersión de liposomas se midió usando un método dinámico de dispersión de luz y éste fue de aproximadamente 80 nm.

- 30

<Preparación de la solución de fármaco>

El mesilato de eribulina se disolvió en la solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina y se obtuvieron 5 mg/ml de una solución de mesilato de eribulina.

- 35 <Preparación de la composición liposomal>

El líquido para dispersión de liposomas y la solución de mesilato de eribulina se mezclaron dentro de un recipiente de vidrio con una capacidad de 10 ml de manera tal que la concentración del mesilato de eribulina fuese de 0,2 mg/ml y la concentración total de lípidos fuese de 16 mM. Como se muestra en la Tabla 6, cada uno de los pH de la fase externa liposomal se ajustó usando una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M. Este material se



calentó durante 5 minutos a 60 °C para obtener una composición liposomal con el mesilato de eribulina introducido dentro en el liposoma. Seguidamente, se usó ácido clorhídrico para ajustar el pH de la fase externa a 7,5.

<Medición de la relación de atrapamiento>

- 5 La relación de atrapamiento se midió similarmente a la Forma de realización 1, y los resultados se muestran en la Tabla 6. Junto con el aumento del pH de la fase externa liposomal, la relación de atrapamiento de la eribulina subió sustancialmente, alcanzándose una relación de atrapamiento de casi 100 %.

(Tabla 6)

Nº	Fase acuosa interna	pH de la fase externa	Relación de atrapamiento (%)
1	100 mM de sulfato de amonio 30 mM de ácido cítrico pH = 7,5	7,5	72,9
2		8,0	79,8
3		8,5	86,4
4		9,0	92,8
5		9,5	98,5
6		10,0	100,0
7		10,5	99,3

(Forma de realización 10)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna liposomal>

- 10 Similarmente al Ejemplo 7, la solución acuosa para la fase interna liposomal se preparó a partir de una mezcla de 100 mM de sulfato de amonio y 30 mM de ácido cítrico acuoso (de pH = 7,5).

<Preparación del líquido para la preparación de liposomas>

Similarmente al Ejemplo 7, la solución acuosa para la fase interna liposomal que antes se ha mencionado, se usó para preparar el líquido para la preparación de liposomas.

- 15 <Preparación de la solución para dispersión de liposomas>

Usando unas columnas de Sephadex G-50 el líquido obtenido para la preparación de liposomas se eluyó con una solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina sustituyendo la fase externa liposomal por la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina.

- 20 El líquido para dispersión de liposomas se dispensó dentro de cuatro ampollas, que fueron centrifugadas durante 1 hora a 400.000 × g, y el material filtrado se retiró completamente. El precipitado de dos de las ampollas se resuspendió con una solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina (de pH = 7,5), y la fase externa liposomal se sustituyó por la solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina (de pH = 7,5). El precipitado de las dos ampollas remanentes se resuspendió con la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina (de pH = 7,5), y la fase externa liposomal se sustituyó por la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina (de pH = 7,5). El tamaño de partículas de los líquidos obtenidos para dispersión de liposomas se midió usando un método dinámico de dispersión de luz y todos fueron de aproximadamente 80 nm.

<Preparación de la solución de fármaco>

- 30 El mesilato de eribulina se disolvió en la solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina y se obtuvieron 5 mg/ml de una solución de mesilato de eribulina. Similarmente, el mesilato de eribulina se disolvió en la solución acuosa de 0,9 % de sacarosa y 10 mM de histidina, y se obtuvieron 5 mg/ml de la solución de mesilato eribulina.

<Preparación de la composición liposomal>

- 35 El líquido para dispersión de liposomas y la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio con una capacidad de 10 ml de manera tal que la concentración del mesilato de eribulina fuese de 0,2 mg/ml y la concentración total de lípidos fue de 16 mM. El pH de la fase externa liposomal de las dos ampollas de la solución acuosa de 96 mg/ml de sacarosa y 10 mM de histidina (de pH = 7,5), se ajustó a 9,5 añadiendo hidróxido de sodio. Similarmente, el pH de la fase externa liposomal de una de las dos ampollas de la solución acuosa de 0,9 % de cloruro de sodio y 10 mM de histidina (de pH = 7,5), se ajustó a 9,5 añadiendo hidróxido de sodio. Éstos materiales se calentaron durante 5 minutos a 60 °C para obtener una composición liposomal con el mesilato de eribulina introducido dentro de los liposomas.

- 40

<Medición de la relación de atrapamiento>

La relación de atrapamiento se midió similarmente a la Forma de realización 1, y los resultados se muestran en la Tabla 7. Comparado con el caso en el que la fase externa liposomal sea sacarosa, que no es un electrólito, el caso de cloruro de sodio, que es un electrólito, obtiene claramente una relación de atrapamiento extremadamente alta. Además del efecto de electrólito, la aplicación del gradiente del pH para hacer que la fase externa liposomal sea un álcali consiguió una relación de atrapamiento de 100 %.

5

(Tabla 7)

Nº	Fase acuosa interna	Composición de la fase externa	Relación de atrapamiento (%)
1	100 mM de sulfato de amonio 30 mM de ácido cítrico pH = 7,5	96 mg/ml de sacarosa 10 mM de histidina pH = 7,5	72,9
2		0,9 % de cloruro de sodio 10 mM de histidina pH = 7,5	95,9
3		96 mg/ml de sacarosa 10 mM de histidina pH = 9,5	98,5
4		0,9 % de cloruro de sodio 10 mM de histidina pH = 9,5	100,0

Aplicabilidad industrial

10 El presente invento es capaz de proporcionar un método para producir un liposoma con una alta estabilidad de retención del compuesto activo y con una alta relación de atrapamiento.

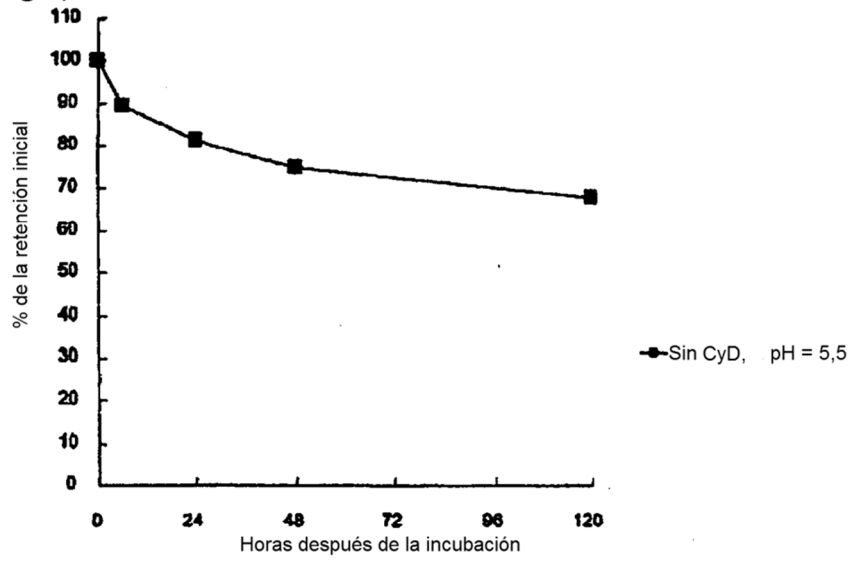
La composición liposomal del presente invento se usa favorablemente en aplicaciones terapéuticas por medio del efecto farmacológico de la eribulina o de una de sus sales farmacológicamente permisibles.

**REIVINDICACIONES**

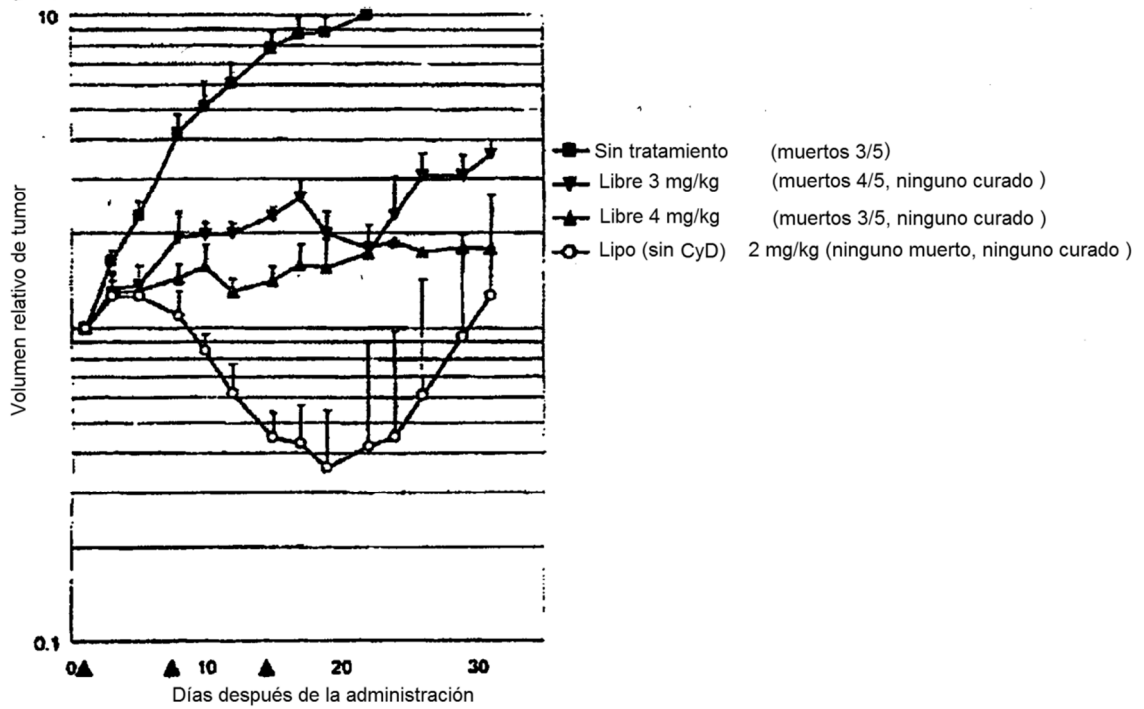
- 5 1. Una composición liposomal que contiene un liposoma, y que contiene (i) un compuesto activo, (ii) una sal de amonio y (iii) una sal, un ácido, una base y/o un aminoácido en la fase interna liposomal, en donde el compuesto activo es eribulina o de sus sales farmacológicamente permisibles.
2. La composición liposomal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición liposomal está en una forma sólida o líquida.
- 10 3. La composición liposomal de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que la concentración de de dicha sal de amonio es de 10 mM o más alta.
- 15 4. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 3, en la que la concentración de dicha sal es de 1 a 300 mM.
5. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4, en la que la concentración de dicho ácido es de 1 a 300 mM.
- 20 6. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5, en la que la concentración de dicho aminoácido es de 1 a 300 mM.
7. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 6, en la que la concentración de dicha base es de 1 a 300 mM.
- 25 8. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 7, en la que la concentración de dicho compuesto activo es de 0,01 a 300 mg/ml.
9. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 8, en la que dicho compuesto activo es mesilato de eribulina.
- 30 10. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 9, en la que la fase interna liposomal contiene además sulfato de amonio, ácido cítrico y un compuesto activo.
- 35 11. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 10, en la que la fase externa liposomal contiene un azúcar, un electrólito y/o un aminoácido.
12. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 11, en la que la fase externa liposomal contiene un azúcar, un electrólito y un aminoácido.
- 40 13. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 10, en la que la fase externa liposomal contiene un azúcar o un electrólito, y un aminoácido.
- 45 14. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 hasta 13, en la que la concentración de dicho azúcar es de 2 a 20 %.
- 50 15. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 hasta 14, en la que la concentración de dicho aminoácido es de 1 a 300 mM.
16. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 15, en la que la fase externa liposomal contiene sacarosa o cloruro de sodio, e histidina.
17. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 16, en la que la fase interna liposomal no contiene sustancialmente nada de ciclodextrina.
- 55 18. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 17, en la que el liposoma contiene fosfatidilcolina hidrogenada.
- 60 19. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 18, en la que el liposoma contiene colesterol.
20. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 19, en la que el liposoma contiene un condensado de metoxipolietilen glicol.
- 65 21. La composición liposomal de acuerdo con la reivindicación 20, en la que dicho condensado de metoxipolietilen glicol es un condensado de diestearoilfosfatidil etanolamino polietilen glicol.

22. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 21, en la que el liposoma contiene fosfatidilcolina hidrogenada, colesterol, y un condensado de diestearoil fosfatidil etanolamino polietilen glicol.
- 5 23. La composición liposomal de acuerdo con la reivindicación 22, que contiene de 10 a 80 % de dicha fosfatidilcolina hidrogenada, de 1 a 60 % de dicho colesterol, y de 0 a 50 % de dicho condensado de diestearoil fosfatidil etanolamino polietilen glicol.
- 10 24. La composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 23, en la que el liposoma contiene fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol y polietilenglicol 2.000-fosfatidiletanolamina.
25. Un método de producción de la composición liposomal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 24, que incluye  
 una etapa en la que se proporciona un líquido para dispersión de liposomas, que contiene un liposoma;  
 15 una etapa en la que dicho líquido para dispersión de liposomas se mezcla con dicho compuesto activo y  
 una etapa en la que dicho compuesto activo se introduce en la fase interna liposomal de dicho líquido para dispersión de liposomas.  
 en la que la etapa en la que se proporciona dicho líquido para dispersión de liposomas incluye: una etapa en la que se proporciona una solución para la preparación de liposomas, que contiene un liposoma y que contiene una sal de amonio en la fase interna liposomal y en la fase externa liposomal;  
 20 una etapa en la que la fase externa liposomal en dicha solución para la preparación de liposomas es sustituida o diluida, y  
 en la que la etapa en la que dicha fase externa liposomal es sustituida o diluida es una etapa en la que se hace que el pH de la fase externa liposomal sea más alto que el pH de la fase interna liposomal.
- 25 26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicho líquido para dispersión de liposomas no contiene sustancialmente nada de una sal de amonio en la fase externa liposomal.
- 30 27. El método de acuerdo con la reivindicación 25 ó 26, en el que el pH de la fase externa liposomal de dicho líquido para dispersión de liposomas es de 3 a 10.
- 35 28. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 hasta 27 en el que el pH de la fase externa liposomal de dicho líquido para dispersión de liposomas es de 7 a 10.
- 40 29. El método de acuerdo con la reivindicación 27 o 28 en el que dicho pH es el pH de la fase externa liposomal de dicho líquido para dispersión de liposomas en la etapa en la que se mezclan dicho líquido para dispersión de liposomas y dicho compuesto activo.
- 45 30. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 hasta 29, en el que la etapa en la que dicha fase externa liposomal es sustituida o diluida es una etapa en la que la diferencia entre el pH de la fase interna liposomal y el pH de la fase externa liposomal es de 1 hasta 5.
- 50 31. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 hasta 30, en el que el pH de la fase interna liposomal es de 3 a 9.
32. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 hasta 31, en el que el pH de la fase interna liposomal es de 4 a 9.
33. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 hasta 32, en el que el pH de la fase interna liposomal es de 5 a 8.
34. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 hasta 33, en el que la fase externa liposomal es una solución que contiene un electrólito en la etapa en la que se introduce dicho compuesto activo.
- 55 35. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 hasta 34, en el que dicho líquido para dispersión de liposomas no contiene sustancialmente nada de ciclodextrina.
- 60 36. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 hasta 35, que contiene además una etapa en la que el pH de la fase externa liposomal es neutralizado.

(Fig. 1)



(Fig. 2)



(Fig. 3)

