

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 054**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/335** (2006.01)

**A61K 51/12** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 47/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2003** **E 10182221 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016** **EP 2286795**

54 Título: **Método para producir una preparación de liposomas catiónicos que comprende un compuesto lipófilo**

30 Prioridad:

**26.06.2002 US 391245 P**

**26.06.2002 US 391246 P**

**21.08.2002 EP 02018724**

**04.03.2003 EP 03004744**

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

**04.05.2017**

73 Titular/es:

**SYNCORE BIOTECHNOLOGY CO., LTD (100.0%)**

**84 Chung Shan Road**

**Tung Shan Shine, I-Lan, TW**

72 Inventor/es:

**MUNDUS, CARSTEN;**

**WELZ, CHRISTIAN;**

**SCHRAMEL, OLIVER;**

**HAAS, HEINRICH;**

**FICHERT, THOMAS;**

**SCHULZE, BRITA;**

**PEYMAN, TORALF;**

**WINTER, GERHARD;**

**GRUBER, FRIEDRICH;**

**TEIFEL, MICHAEL y**

**MICHAELIS, UWE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 611 054 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

Método para producir una preparación de liposomas catiónicos que comprende un compuesto lipófilo

La presente invención se refiere a un método para producir una preparación de liposomas catiónicos que contiene un compuesto lipófilo activo, v.g. un taxano, que tiene estabilidad alta y que es adecuada para aplicaciones terapéuticas.

Los liposomas son pequeñas vesículas esféricas compuestas fundamentalmente de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y otros componentes lipófilos. Los componentes lipídicos forman normalmente una bicapa, donde el extremo polar del compuesto anfifílico está en contacto con la solución circundante, que es típicamente una solución acuosa. El extremo no polar hidrófobo del compuesto anfifílico está en contacto con otro extremo no polar hidrófobo de otro compuesto anfifílico, formando de este modo la bicapa lipídica. Dependiendo del tipo de compuestos anfifílicos utilizados, la membrana liposómica puede clasificarse de acuerdo con su carga externa en membranas netas neutras, y membranas cargadas negativa y positivamente.

Se han desarrollado liposomas para muchas aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Entre otras aplicaciones, se utilizan para suministrar moléculas que no son suficientemente solubles en agua. Estas moléculas lipófilas se incorporan en la bicapa del liposoma o están unidas químicamente a la bicapa lipídica.

El paclitaxel, el representante más importante de la familia de los taxanos, es un compuesto altamente lipófilo de este tipo. El paclitaxel se conoce como Taxol que es el fármaco formulado en aceite de ricino polietoxilado (Cremophor® EL) y etanol absoluto. Adicionalmente, el paclitaxel ha sido formulado en liposomas.

Antes de aplicar Taxol® a los humanos, el portador farmacéutico con el compuesto terapéutico se diluye en una solución acuosa adecuada. Sin embargo, se ha observado que el portador causa reacciones anafilácticas graves, que ponen en riesgo la vida en animales y humanos, y es físicamente incompatible con algunos sistemas de infusión intravenosa. Por esta razón, se han realizado varios intentos a fin de eliminar el Cremophor® EL por reformulación del fármaco en un vehículo mejor tolerado. Los liposomas se han caracterizado clínicamente durante las últimas décadas y se ha comprobado que son un sistema de suministro de fármacos seguro y bien tolerado. Los liposomas pueden estar constituidos por lípidos existentes naturalmente que llevan un grupo de cabeza polar que es neutro o está cargado negativamente. En la naturaleza no existen lípidos de diacilglicéridos cargados positivamente.

Sharma et al. [1] fabricaron liposomas neutros de paclitaxel de acuerdo con el denominado método de película. Los lípidos, fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilglicerol (PG) se disolvían junto con paclitaxel en cloroformo. El cloroformo se evaporaba a 40°C y la película paclitaxel-lípido se disolvía en *tert*-butanol. La solución se dividía en partes alícuotas y se liofilizaba. El polvo se hidrataba con tampón (NaCl/Tes/EDTA: 140 mM/10 mM/0,1 mM) dando una suspensión bruta de liposomas, que se procesaba ulteriormente en un baño de ultrasonidos a 20°C. Se ha demostrado la estabilidad química del fármaco en estas formulaciones durante más de dos meses a 4°C y temperatura ambiente. El pH se especifica dentro del intervalo fisiológico de pH 7-7,5.

En la Patente U.S. 6.090.955 Rezska *et al.* describieron la fabricación de liposomas neutros de paclitaxel a partir de fosfatidilcolina de huevo de acuerdo con el método de película. La suspensión bruta de liposomas, pH 7,2-7,4, constituida por vesículas de capas múltiples (MLV) se homogeneizaba con un homogeneizador de alta presión. Para almacenamiento a más largo plazo se sugiere formación de gel o liofilización. Sin embargo, no se presentaba dato alguno acerca de la estabilidad, v.g. no se abordaba la estabilidad química del paclitaxel.

El documento WO 00/61543 describe una nueva clase de lípidos catiónicos que comprenden ésteres de L-carnitina y acil L-carnitinas para uso en la preparación de liposomas catiónicos para el suministro de compuestos farmacológicamente activos tales como derivados de camptotecina. Los liposomas se preparan usando agentes crioprotectores y el método de película lipídica. La película lipídica se hidrata con una solución de PBS, pH 7,4, dándose a conocer que los liposomas resultantes son estables.

En el documento WO 99/65465 se describe un método para formar liposomas, que comprende los pasos de (i) formar liposomas vacíos; (ii) mezclar los liposomas del paso (i) con una solución de azúcar, preferiblemente sacarosa, y un agente activo tal como doxorubicina; y (iii) secar la mezcla del paso (ii). Los liposomas pueden comprender lípidos catiónicos tales como estearil amina. No se describen intervalos de pesos molares específicos de los lípidos empleados.

El documento WO 01/25223 se refiere a la estabilización de sistemas dispersos que contienen taxano mediante moléculas que mejoran la estabilidad física de los taxanos. Los liposomas están compuestos de lípidos sin cargar, tal como fosfatidilcolina de huevo o de soja. Estas moléculas se seleccionan de glicerol, alcoholes, y dimetilsulfóxido. En una realización preferida, el liposoma se suspende en una composición de glicerol:agua que tiene al menos 30% de glicerol. No se especifica el pH de la composición acuosa.

El documento US 5.648.090 se refiere a taxol encapsulado liposómicamente. Los lípidos empleados no están cargados, pero pueden comprender estearilamina.

El documento US 6.120.798 se refiere a composiciones de liposomas catiónicos para administrar polinucleótidos. No se encierran agentes lipófilos. Los estudios se llevan a cabo a un pH fisiológico de 7,4. Se da a conocer que los liposomas son estables.

5 Ceruti et al., J. Controlled Release, 2000, p. 141-153, se refiere a la preparación de liposomas que comprenden profármacos de paclitaxel solubles en agua. Los liposomas se preparan a partir de fosfatidilcolina de yema de huevo, fosfatidilglicerol, colesterol, dipalmitoil fosfatidilcolina, y opcionalmente estearilamina. Para la preparación, las películas lipídicas se hidratan con un tampón de HEPES que tiene pH 7,4 fisiológico. Se da a conocer que los liposomas son estables.

10 Recientemente se ha comunicado que los liposomas catiónicos representan no sólo otra variedad de un sistema con portador liposómico sino que exhiben también un efecto específico de direccionamiento a áreas neoangiogénicas en los vasos sanguíneos [2], WO 01/17508 y WO 98/40052. Se han utilizado frecuentemente liposomas catiónicos para el suministro de genes, pero se sabe poco acerca de sus características de formulación para otros compuestos en comparación con los liposomas neutros o aniónicos.

15 Campbell et al. [3] formularon liposomas de paclitaxel con contenido variable de lípido catiónico, encontrando una estabilidad física incrementada de los liposomas que contenían paclitaxel. Los liposomas se fabricaban de acuerdo con el método de película. La película se hidrataba con agua, que se calentaba a una temperatura de 5-10°C por encima de la temperatura de transición de fase del fosfolípido respectivo que se utilizaba. La suspensión de liposomas se trataba luego por ultrasonidos en un aparato de ultrasonidos de tipo baño. El diámetro de los liposomas resultantes estaba comprendido en el intervalo de 500-800 nm. Se indicó que la estabilidad física de estos liposomas alcanzaba un máximo de tres días. Las condiciones como temperatura y pH en las que se mantenían estos liposomas no se describían. Sin embargo, una estabilidad de pocos días no es suficiente para una formulación farmacéutica si se aplica para propósitos clínicos.

20 Otra clase de moléculas altamente lipófilas son las epotilonas, específicamente las epotilonas A y B. Para ambos compuestos, se ha descrito la falta de estabilidad a pH bajo y se atribuye a reacciones de apertura de anillo del resto epóxido catalizadas por ácidos. Esto conduce a productos de reacción que habían perdido sus excepcionales propiedades citotóxicas [9]. La aparente inestabilidad de las epotilonas A y B no permite el desarrollo de formulaciones orales de epotilona A o B, dado que el pH del estómago es aproximadamente 1-3 y degradaría rápidamente la epotilona citostática A o B [10].

30 Se ha publicado que la semivida en plasma, especialmente de la epotilona B, es extremadamente baja debido a su degradación metabólica por las estererasas [11, 12]. Esto es cierto también para otras epotilonas; en el plasma de murino, se encontró que la semivida aproximada in vitro de la desoxi-epotilona B (epotilona D) es 20 min, y en el plasma humano la semivida era aproximadamente 3 h [13]. Esto no permite una exposición continua de alto nivel del tumor al fármaco y la insatisfactoria actividad antitumoral in vivo de las epotilonas A y B se ha atribuido a su deficiente estabilidad metabólica [12].

35 Se han descrito composiciones liposómicas de las epotilonas A o B. [WO 01/10412 A1]. En este caso, se hace referencia a la inestabilidad general de estas epotilonas, y se considera esto como una base racional para la carga de liposomas. Sin embargo, no se presenta dato alguno para respaldar que la estabilidad de las epotilonas liposómicas es mayor que la de las epotilonas no liposómicas.

40 La mayoría de los pasos de preparación para la fabricación de liposomas se realizan en un ambiente acuoso (formación de las vesículas, homogeneización y/o eliminación de componentes indeseables, reconstitución de las formulaciones liofilizadas). Durante estos pasos, los componentes liposómicos, así como los ingredientes activos que se cargan en la membrana del liposoma son propensos a la degradación.

45 La estabilidad fisicoquímica de los liposomas que contienen fármacos es un factor limitante para el desarrollo de un producto farmacéutico con una vida útil suficiente para almacenamiento, distribución y aplicación a humanos después de su fabricación.

50 Un enfoque para aumentar la estabilidad fisicoquímica de los liposomas cargados con fármaco consiste en eliminar cuantitativamente el agua de la suspensión de liposomas. Métodos que se han aplicado con éxito para eliminar el agua de los liposomas son liofilización, secado por pulverización o evaporación. Típicamente, una suspensión de liposomas se fabrica dispersando los compuestos anfífilos en un entorno acuoso. Inmediatamente después de la fabricación del material acuoso a granel, se deshidrata la suspensión por cualquier método adecuado y se guarda hasta su aplicación en estado desecado. Durante el proceso de secado puede utilizarse un agente estabilizador para mantener la estructura del liposoma. El agua que está asociada usualmente con la superficie polar del liposoma se reemplaza por el agente estabilizador durante el secado para mantener las características fisicoquímicas del liposoma. El fármaco se mantiene cargado o fuertemente asociado en/con la membrana del liposoma. La liberación de los compuestos está bien controlada. En un caso óptimo, el tamaño y la distribución de tamaños del liposoma no se ven afectados por el proceso y los compuestos cargados y los lípidos se mantienen químicamente intactos. Sin embargo, no se ha descrito todavía la deshidratación de una preparación de liposomas catiónicos que comprenda un compuesto lipófilo activo.

Por tanto, el problema subyacente de la presente invención era proporcionar un método para producir una preparación mejorada de liposomas catiónicos que comprende un compuesto lipófilo activo con estabilidad fisicoquímica y aplicabilidad farmacéutica mejoradas.

5 La solución fue proporcionar un método para producir una preparación de liposomas catiónicos que comprende al menos un compuesto anfifílico seleccionado de lípidos catiónicos en una cantidad de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos un compuesto anfifílico adicional en una cantidad de hasta aproximadamente 69,9% en moles, un compuesto activo lipófilo en una cantidad de al menos aproximadamente 0,1% en moles y un agente estabilizador en una cantidad de aproximadamente 0,1% (m/v) hasta aproximadamente 20% (m/v),

10 que comprende los pasos de

a) proporcionar

i. una solución orgánica que comprende un disolvente orgánico, dicho compuesto activo y dicho lípido catiónico, y opcionalmente dicho compuesto anfifílico adicional,

ii. una solución acuosa que comprende dicho agente estabilizador,

15 b) preparar una preparación de liposomas catiónicos a partir de dicha solución a) i. y a) ii., en donde dicha preparación comprende liposomas catiónicos en un medio acuoso,

c) opcionalmente, homogeneizar dicha preparación al menos una vez y/o

d) opcionalmente, filtrar dicha preparación en condiciones estériles,

e) deshidratar dicha preparación y

20 f) opcionalmente, reconstituir dichos liposomas catiónicos del paso e) en una solución acuosa,

en donde opcionalmente antes del paso c) y/o d) se incluye un paso de ultrafiltración,

y en donde el valor del pH del medio acuoso en uno cualquiera de los pasos b) a d) o f) está entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6,5.

25 Disolventes orgánicos preferidos para utilizar en el paso a) i. se seleccionan, aunque sin carácter limitante, del grupo siguiente: metanol, etanol, propanol, isopropanol, etilenglicol, tetrahidrofurano, cloroformo, terc-butanol o dietil-éter o una mezcla de estos disolventes.

30 Cualquier compuesto lipófilo farmacológicamente activo se puede cargar en liposomas catiónicos de la presente invención. Preferiblemente, el compuesto activo se selecciona de un compuesto lipófilo terapéutica o diagnósticamente adecuado, tal como un agente citostático o citotóxico, o un agente de formación de imágenes, tal como un colorante, colorante fluorescente, y similar. Los compuestos terapéuticamente activos preferidos se seleccionan de un taxano, de una camptotecina en su forma de lactona, de otros agentes que interaccionan con microtúbulos, tales como epotilonas, discodermolida, laulimalida, isolaulimalida, eleuterobina, sarcodictina A y B, de una estatina (por ejemplo, lovastatina), de un depsipéptido, de otros fármacos tales como talidomida. Los compuestos diagnósticamente activos preferidos se seleccionan de (i) triglicéridos poliyodados (v.g., 1,3-bis[7-(3-amino-2,4,6-triyodofenil)heptanoato de 2-oleoilglicerol] o aceites poli-yodados tales como Lipiodol, (ii) <sup>99m</sup>Tc-HMPAO (dioxima hexametil propilnamínica) y sus derivados, (iii) compuestos fluorescentes tales como rodamina, (iv) partículas de ferrita revestidas con lípidos, (v) agentes de contraste acoplados a lípidos para MRI (v.g., queladores de Gd tales como DOTA o DTPA acoplados a un lípido o a un ácido graso), (vi) agentes de contraste acoplados a lípidos para rayos X (v.g., lopamidol acoplado a lípidos), (vii) queladores acoplados a lípidos, tales como HYNIC o DTPA para núclidos útiles para centelleo, tales como <sup>111</sup>In o <sup>99m</sup>Tc, o (viii) colorantes fluorescentes acoplados a lípidos, tales como rodamina o Rojo Texas.

45 Se describe aquí una preparación liposómica que comprende un taxano, preferiblemente paclitaxel o docetaxel o un derivado lipófilo de los mismos, en una cantidad de aproximadamente 2 a aproximadamente 20% en moles, con preferencia en una cantidad de aproximadamente 2 a aproximadamente 5% de paclitaxel, y preferiblemente en una cantidad de al menos 11% en moles para docetaxel o succinil-paclitaxel. En una realización preferida de la invención, dicha preparación liposómica comprende lactona de camptotecina en una cantidad de aproximadamente 0,1% en moles a aproximadamente 1% en moles.

50 Lípidos catiónicos útiles con respecto a la presente invención incluyen, pero sin carácter limitante: DDAB, bromuro de dimetildiodeciloamónio; N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amónio-metilsulfato; 1,2-diaciloxi-3-trimetil-amónio-propanos (con inclusión, pero sin carácter limitante, de dioleoil (DOTAP), dilauroiloxi, dimiristoiloxi, dipalmitoiloxi, y diestearoiloxi); N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N-dimetil-amina; 1,2-diacil-3-dimetilamonio-propanos (con inclusión, pero sin carácter limitante, de dioleoil (DODAP), dilauroil, dimiristoil, dipalmitoil, y diestearoil); DOTMA, cloruro de N-[1-[2,3-bis(oleiloxi)]propil]-N,N,N-trimetilamonio (con inclusión pero sin carácter limitante de

dioleil (DOTMA), dilauril, dimiristil, dipalmitil, y diestearil), DOGS, dioctadecilamidoglicilespermina, DC-colesterol, 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol; DOSPA, trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-(2-(espermina-carboxamido)-etil)-N,N-dimetil-1-propanaminio; 1,2-diacil-sn-glicero-3-etilfosfocolinas (con inclusión pero sin carácter limitante de dioleoil (DOEPC), dilauril, dimiristoil, dipalmitoil, diestearoil, y palmitoil-oleoil);  $\beta$ -alanil-colesterol; CTAB, bromuro de cetil-trimetil-amonio; di-amidina C14, N-t-butil-N'-tetradecil-3-tetradecilaminopropionamidina; 14Dea2; TMAG, cloruro de N-(alfa-trimetilamonioacetil)didodecil-D-glutamato; cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(trimetilamonioacetil)-dietanolamina; DOSPER, 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida; yoduro de N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis(2-hidroxietil)-2,3-dioleoiloxi-1,4-butanodiamonio; cloruro de 1-[2-(aciloxi)etil]-2-alkuil-(alquenil)-3-(2-hidroxietil)imidazolinio, derivados como los descritos por Solodin et al. (1995) Biochem. 43: 13537-13544, tales como DOTIM, cloruro de 1-[2-(9(Z)-octadecenoiloxi)etil]-2-(8(Z)-heptadecenil-3-(2-hidroxietil)-imidazolinio; DPTIM, cloruro de 1-[2-(hexadecanoiloxi)etil]-2-pentadecil-3-(2-hidroxietil)imidazolinio; derivados de compuestos de 2,3-dialquiloxipropil-amonio cuaternario, que contienen un resto hidroxialquilo en la amina cuaternaria, como ha sido descrito, v.g., por Feigner et al. (1994) J. Biol. Chem. 269: 2550-2561, tales como: DORI, bromuro de 1,2-dioleoil-3-dimetil-hidroxietil-amonio; DORIE, bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetilhidroxipropilamonio; DORIE-HP, bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetilhidroxipropilamonio; DORIE-HB, bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxi-butilamonio; DORIE-HPe, bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxi-pentilamonio; DMRIE, bromuro de 1,2-dimiristoiloxipropil-3-dimetil-hidroxietilamonio; DPRIE, bromuro de 1,2-dipalmitiloxipropil-3-dimetil-hidroxietilamonio; DSRIE, bromuro de 1,2-diesteriloxipropil-3-dimetil-hidroxi-etilamonio.

En una realización preferida, el lípido catiónico se selecciona de un compuesto de amonio cuaternario tal como N-[1-(2,3-diaciloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, que puede estar presente como una sal con un anión de carga opuesta farmacéuticamente aceptable, v.g. un cloruro, bromuro, fluoruro, yoduro, nitrato, sulfato, metilsulfato, fosfato, acetato, benzoato, citrato, glutamato, o lactato. En una realización aún más preferida, el lípido catiónico es DOTAP.

El compuesto anfifílico adicional puede seleccionarse de un compuesto anfifílico que tenga una carga neta neutra o aniónica de su resto hidrófilo (grupo de cabeza). Un compuesto anfifílico adecuado puede seleccionarse de esteroides o lípidos tales como fosfolípidos, lisolípidos, lisofosfolípidos, esfingolípidos o lípidos pegilados, o cualquier combinación de los mismos. Un compuesto anfifílico preferido es un lípido, esteroil o lípido pegilado neutro tal como colesterol, lanosterol, fitosterol, 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, con inclusión, pero sin carácter limitante, de dioleoil (DOPE), 1,2-diacil-glicero-3-fosfocolinas, y esfingomielina. Muy preferiblemente, el compuesto anfifílico adicional es diacilfosfatidilcolina. Los lípidos pegilados se refieren a lípidos que llevan uno o más restos polietilenglicol.

Una solución acuosa adecuada de acuerdo con el paso a) ii) de la presente invención comprende agua, opcionalmente una sustancia tampón y un agente estabilizador, y tiene un valor de pH entre aproximadamente 3 y 6,5, con preferencia entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6,5. Sustancias tampón adecuadas se seleccionan de v.g. ácido acético, ácido cítrico, Tris, Bis, ácido fosfático, ácido láctico y análogos.

El agente estabilizador se selecciona preferiblemente de un azúcar o un alcohol o una combinación de los mismos tal como trehalosa, maltosa, sacarosa, glucosa, lactosa, dextrano, manitol o sorbitol y se utiliza en el intervalo de hasta aproximadamente 20% (m/v). El agente estabilizador se utiliza en el intervalo de aproximadamente 0,1 (m/v) a aproximadamente 20% (m/v) y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 5 (m/v) a aproximadamente 15% (m/v) con respecto al volumen total de la dispersión de liposomas ulteriormente en el paso b).

La preparación de una dispersión de liposomas de acuerdo con el paso b) puede llevarse a cabo de acuerdo con varios métodos bien conocidos en la técnica. En una realización preferida de la presente invención, se sigue el método de película, y en una realización más preferida, se lleva a cabo el método de inyección de disolvente orgánico.

De acuerdo con el método de película, lípidos catiónicos y opcionalmente sustancias anfifílicas y el compuesto lipófilo se disuelven en un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos diferentes que se seleccionan de alcoholes (tales como etanol o *tert*-butanol), disolventes halogenados (tales como diclorometano o cloroformo) u otros disolventes orgánicos adecuados. Después de disolver dichos compuestos en un disolvente orgánico, el disolvente orgánico o la mezcla de diferentes disolventes orgánicos se evaporan a vacío para producir una película fina. En lugar de producir una película fina a partir de la solución orgánica que contiene los lípidos catiónicos, opcionalmente sustancias anfifílicas y el compuesto lipófilo pueden secarse por liofilización u otro medio adecuado de tal modo que se obtenga una mezcla fármaco-lípido homogénea. Se añade una solución acuosa que comprende un agente estabilizador para rehidratar la película lipídica o la mezcla lipídica seca, dando como resultado una dispersión homogénea de vesículas multilaminares (MLV).

La inyección de disolvente orgánico se realiza disolviendo lípidos catiónicos y opcionalmente los compuestos anfifílicos y el compuesto lipófilo en un disolvente volátil miscible con el agua, tal como un alcohol o éter, preferiblemente etanol, e inyectando esta solución en una solución acuosa que comprende un agente estabilizador. La denominada fase orgánica comprende lípidos catiónicos y opcionalmente compuestos anfifílicos y el compuesto lipófilo y un disolvente orgánico, en donde la fase orgánica no debería exceder de aproximadamente 5% (m/v), preferiblemente al menos 2,5% (m/v) en la mezcla líquida final.

Los liposomas catiónicos de la presente invención comprenden al menos una cantidad de aproximadamente 30% en moles de lípidos catiónicos, con preferencia aproximadamente 40% en moles, de modo más preferible aproximadamente 50% en moles, de modo aún más preferible aproximadamente 60% en moles, aproximadamente 70% en moles, aproximadamente 80% en moles, o aproximadamente hasta 99,9% en moles, y se caracterizan por tener un potencial zeta positivo en solución de KCl aproximadamente 0,05M a un pH de aproximadamente 7,5 y la temperatura ambiente.

El ajuste del tamaño de los liposomas se realiza a menudo en la técnica por tratamiento de ultrasonidos. Sin embargo, en el método inventivo la homogeneización en el paso c) se realiza preferiblemente por extrusión, filtración a través de filtros de membrana, homogeneización a alta presión y/u homogeneización a alta velocidad, y de modo muy preferido por extrusión a través de una membrana con un tamaño de poro de aproximadamente 200 nm a presión. Pueden utilizarse asimismo membranas con otros tamaños de poro tales como 50 nm, 100 nm, 150 nm o 400 nm, bien conocidas en la técnica. La filtración a través de filtros de membrana puede realizarse por filtración a través de membranas compuestas de PVDF, PES, filtros de nailon, pero también pueden utilizarse otros materiales si se comprueba que son adecuados. El tamaño de poro de las membranas debe estar comprendido en el intervalo de aproximadamente 200 nm a 450 nm, pero el tamaño del poro no se limita a los tamaños mencionados. Diferentes materiales y diferentes tamaños de poro pueden combinarse a fin de obtener una solución que pueda ser procesada por una filtración de grado esterilizante.

Para uso farmacéutico, es un requisito previo que la formulación de liposomas pueda esterilizarse a través de un filtro de grado esterilizante después del procedimiento de preparación, dado que los mismos están destinados en muchos casos a ser utilizados por vía parenteral en un individuo que se encuentra en necesidad de ello. Los métodos para esterilización de liposomas deberían ser destructivos para los microorganismos, pero no deberían afectar a las características fisicoquímicas de la formulación de liposomas de manera desfavorable. La vía preferida para esterilización de productos farmacéuticos es el tratamiento en autoclave, v.g. a 134°C durante un mínimo de 5 min o a 121°C durante un mínimo de 15 min. En estas condiciones rigurosas, los liposomas exhiben a menudo degradación en un grado considerable, v.g. como aglomeración de liposomas, cambio del tamaño o la distribución de tamaños de los liposomas, hidrólisis/oxidación de los lípidos, degradación química o liberación indeseable del compuesto lipófilo de los liposomas. Por esta razón, la filtración estéril y el llenado aséptico son métodos preferidos para obtener un producto farmacéutico de liposomas para aplicación parenteral. Típicamente, la filtración de grado esterilizante se realiza una sola vez, o repetidas veces, a través de una membrana con un tamaño de poro comprendido en el intervalo de 0,1 a 0,45  $\mu\text{m}$ . Pueden conectarse también en serie dos a varios filtros con un diámetro de poro definido a fin de conseguir una filtración de grado esterilizante. Los materiales utilizados comúnmente son derivados de celulosa tales como acetato de celulosa o membranas de polivinilo tales como PVDF, PES o nailon, pero también pueden utilizarse otros materiales si se comprueba que son adecuados.

Pueden utilizarse también procesos de filtración para separar compuestos indeseables de la preparación de liposomas, tales como reactivos o disolventes utilizados en el proceso de fabricación, o compuesto lipófilo sin carga de liposomas. El tamaño de poro del filtro está comprendido preferiblemente entre el diámetro de los liposomas (típicamente  $>60$  nm) y el compuesto a eliminar (típicamente  $<5$  nm). Dependiendo de la diferencia de tamaños pueden utilizarse ultra-filtración (punto de corte por peso molecular 1-1000 kDa) o micro-filtración (0,02-1  $\mu\text{m}$ ). En lugar de una filtración a muerte, se han desarrollado técnicas más convenientes como diálisis o filtración de flujos cruzados.

Una preparación de liposomas esterilizada puede envasarse asépticamente en viales apropiados, v.g. frascos de vidrio. Se prefiere que la altura de llenado de los frascos de vidrio esté comprendida en el intervalo de 0,5-10 cm, más preferiblemente en el intervalo de 1,0-5 cm, muy preferiblemente en el intervalo de 2,0-3,0 cm. Los frascos de vidrio de calidad farmacéutica pueden estar comprendidos en el tamaño de 1 ml a 1000 ml. Una dispersión de liposomas en solución acuosa puede envasarse también en recipientes o bolsas de plástico estériles.

Después del paso d), se realiza una deshidratación (paso e)). La formulación se deshidrata y se reconstituye antes de su utilización con una solución acuosa tal como agua pura o una solución de un agente estabilizador del pH. El proceso de deshidratación es un paso importante en el proceso de fabricación de los liposomas catiónicos, dado que el mismo puede influir directamente en la calidad de la preparación de liposomas seca y ulteriormente de la dispersión de liposomas reconstituida. La deshidratación puede efectuarse por liofilización, que puede dividirse en tres pasos diferentes, (i) congelación, (ii) secado primario, y (iii) secado secundario, que están conectadas por rampas de temperatura/tiempo/presión exactamente definidas.

La congelación de una dispersión de liposomas es un paso importante. Es bien sabido que la formación de cristales de hielo depende en gran medida de la velocidad de congelación, dando como resultado diferentes tamaños de poro de la dispersión de liposomas congelada. La velocidad de secado en los pasos de secado siguientes se ve influenciada principalmente por el tamaño de poro durante la congelación.

Durante el secado primario se elimina agua a vacío de la dispersión congelada. La temperatura del estante durante la liofilización, así como el vacío aplicado controlan en gran medida el proceso de secado. La elección de temperatura y presión inadecuadas puede dar como resultado varios problemas durante la liofilización, tales como la descongelación de la dispersión congelada o la transición de fase de los lípidos.

Asimismo durante el secado secundario puede producirse una fusión del producto. El tiempo de secado primario así como la temperatura y la presión del secado secundario pueden afectar acusadamente a la calidad de la preparación de liposomas si los parámetros no están comprendidos dentro de intervalos apropiados. La calidad de la preparación de liposomas podría verse afectada, dado que el compuesto cargado puede carecer de estabilidad física o química suficiente, debido a agregación o formación de cristales.

En una realización preferida de la presente invención, la deshidratación se lleva a cabo por liofilización. La congelación se realiza preferiblemente a la presión atmosférica y la suspensión de liposomas se congela a una temperatura de aproximadamente -20 a aproximadamente -60°C, de modo más preferible a una temperatura de aproximadamente -30°C a aproximadamente -50°C, y muy preferiblemente a una temperatura de aproximadamente -35°C a aproximadamente -45°C. El tiempo se ajusta para asegurar una congelación completa de la dispersión de liposomas y con preferencia es aproximadamente 3 a aproximadamente 10 horas, dependiendo del tamaño, la altura de llenado, y el tipo de vasija de vidrio en la cual se pone la dispersión de liposomas.

La congelación y un paso de secado primario están conectados por una primera rampa de temperatura. El incremento de la temperatura está determinado por la diferencia de temperatura durante la congelación y el secado primario. El tiempo de la rampa de temperatura está comprendido preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 24 horas, de modo más preferible entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 horas.

El secado primario puede realizarse a una temperatura constante o puede aplicarse una rampa de temperaturas. El secado con una temperatura constante se efectúa preferiblemente a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente -50°C, de modo más preferible entre aproximadamente -10°C y aproximadamente -30°C. Se aplica un vacío apropiado para asegurar el secado del producto. El vacío debe estar comprendido entre aproximadamente 1 mbar y aproximadamente 0,001 mbar, de modo más preferible entre aproximadamente 0,05 mbar y aproximadamente 0,15 mbar, dependiendo de la temperatura del estante. Asimismo, debe tenerse en consideración el diagrama de fases de la formulación para seleccionar un vacío apropiado para el paso de secado primario. El tiempo para el secado primario deberá ser suficiente para asegurar un secado suficiente de la preparación de liposomas y estará comprendido en el intervalo de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 200 horas, dependiendo del liofilizador.

El secado primario puede realizarse también utilizando una rampa de temperatura. La temperatura se incrementa lentamente durante el secado primario. El aumento de temperatura está comprendido de modo preferible en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 K/hora. La temperatura puede incrementarse al comienzo o al final del secado primario. Puede aplicarse un test de presión creciente para determinar el final del secado primario.

El secado primario y el secado secundario están conectados por una segunda rampa de temperatura. El incremento de la temperatura está determinado por la temperatura al final del secado primario y la temperatura al comienzo del secado secundario. El tiempo de la rampa de temperatura está comprendido preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 24 horas, de modo más preferible entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 horas.

El secado secundario puede realizarse a una temperatura constante o con una rampa de temperatura. El secado con una temperatura constante se realiza a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 50°C, con preferencia entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20°C, y modo más preferible a aproximadamente 20°C. Se aplica un vacío apropiado para asegurar el secado del producto. El vacío estará comprendido entre aproximadamente 1 mbar y aproximadamente 0,001 mbar, con preferencia a aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,001 mbar. El tiempo para el secado secundario deberá bastar para asegurar un secado suficiente de la preparación de liposomas y debería estar comprendido en el intervalo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 50 horas. Puede aplicarse un test de presión creciente para determinar el final del secado secundario.

El comportamiento de reconstitución de la preparación de liposomas deshidratada tal como su facilidad de reconstitución, liberación del compuesto activo de la membrana de liposomas o propiedades fisicoquímicas del compuesto, v.g. degradación y análogas, pueden ser dependientes de la deshidratación, pero también del proceso de reconstitución. Un comportamiento de reconstitución óptimo se muestra cuando, después de la adición de una solución acuosa, se forma una dispersión homogénea de liposomas. Es favorable un protocolo de reconstitución simple, tal como la adición de la solución acuosa seguida por agitación suave mediante sacudidas. Durante la reconstitución, los liposomas secos se resuspenden con agua sin poner en peligro la estabilidad fisicoquímica del compuesto lipófilo en la membrana de los liposomas. El comportamiento de reconstitución puede examinarse, v.g. por evaluación visual, microscopía, o medidas de obstrucción del paso de la luz.

El método inventivo permite la producción de liposomas catiónicos que tienen un potencial zeta positivo en solución de KCl aproximadamente 0,05M a aproximadamente pH 7,5 y a la temperatura ambiente, teniendo preferiblemente un potencial zeta comprendido en el intervalo de aproximadamente 25 mV a 100 mV en solución de KCl aproximadamente 0,05M a aproximadamente pH 7,5 y a la temperatura ambiente, y teniendo más preferiblemente

un potencial zeta en el intervalo de aproximadamente 35 mV a 70 mV en solución de KCl aproximadamente 0,05M a aproximadamente p 7,5 y a la temperatura ambiente.

Adicionalmente, los valores PI de la preparación de liposomas catiónicos de la invención son inferiores a aproximadamente 0,6, con preferencia inferiores a aproximadamente 0,5, de modo más preferido inferiores a aproximadamente 0,4 y de modo muy preferido inferiores a aproximadamente 0,3.

Los liposomas catiónicos preparados por el método inventivo y los liposomas catiónicos dados a conocer en la presente invención tienen un diámetro comprendido en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 400 nm, con preferencia aproximadamente 100 a aproximadamente 400 nm, y de modo más preferible aproximadamente 200 a aproximadamente 300 nm.

Es una característica de la presente invención que el compuesto lipófilo activo no se separa sustancialmente de la bicapa liposómica y no forma sustancialmente agregados en una dispersión de liposomas de la invención durante un periodo de al menos 0,5 horas, generalmente al menos 1 hora, y con preferencia al menos aproximadamente 2 horas, de modo más preferible al menos aproximadamente 3 horas, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 4 horas a la temperatura ambiente. Un liposoma catiónico en el cual el compuesto lipófilo activo no se separa sustancialmente de la bicapa liposómica es uno en el cual por regla general menos de aproximadamente 20%, de modo usual menos de aproximadamente 10%, de modo más habitual menos de aproximadamente 5%, como valor típico menos de aproximadamente 1% y de modo preferible menos de aproximadamente 0,5% de la cantidad total del compuesto lipófilo activo cargada en el liposoma catiónico se ha separado de la bicapa del liposoma.

Adicionalmente, la presente invención se caracteriza por una estabilidad química suficiente del compuesto lipófilo.

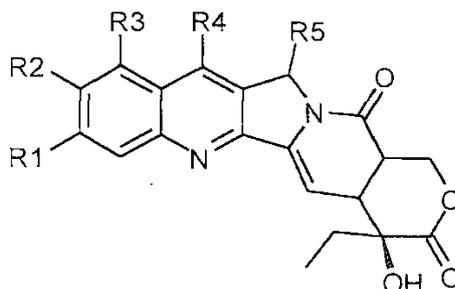
A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria descriptiva tendrán el mismo significado que es entendido comúnmente por las personas con experiencia ordinaria en la técnica a la que se refiere la presente invención.

"Aproximadamente" en el contexto de valores de cantidad hace referencia a una desviación media de  $\pm 20\%$  como máximo, preferiblemente  $\pm 10\%$  basada en el valor indicado. Por ejemplo, una cantidad de aproximadamente 30% en moles de lípido catiónico hace referencia a 30% en moles  $\pm 6\%$  en moles, y preferiblemente 30% en moles  $\pm 3\%$  en moles de lípido catiónico con respecto a la molaridad total lípido/compuesto anfifílico.

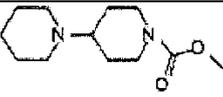
"Anfifílico" se refiere a una molécula constituida por un resto soluble en agua (hidrófilo) y un resto soluble en disolventes orgánicos (lipófilo). Un compuesto anfifílico adecuado de la presente invención puede ser catiónico, neutro o aniónico con respecto a la carga neta del resto hidrófilo (grupo de cabeza). Un compuesto anfifílico catiónico tiene una carga neta positiva, un compuesto anfifílico neutro una carga neutra, y un compuesto anfifílico aniónico una carga neta aniónica. Un compuesto anfifílico, tal como se utiliza en la presente invención, se selecciona de esteroides tales como colesterol, fitosterol o lanosterol, o lípidos tales como lisofosfolípidos, esfingolípidos o lípidos pegilados tales como 1,2-diacil-sn-glicero-2-fosfoetanolamina, con inclusión, pero sin carácter limitante, de dioleoil (DOPE), 1,2-diacil-glicero-3-fosfocolinas y esfingomielina. Los lípidos pegilados se refieren a lípidos que tienen uno o más restos polietilenglicol.

"Solución acuosa" hace referencia a cualquier solución que comprende agua y opcionalmente al menos un aditivo adecuado que se disuelve completamente en agua. Tales aditivos pueden ser tampones o sus componentes individuales, azúcares, alcoholes, y agentes estabilizadores.

"Camptotecina" se refiere a cualquier camptotecina o sus derivados. Un derivado de camptotecina se obtiene a partir de cualquier derivatización química de camptotecina. En el boceto de la molécula, los sitios de derivatización más frecuentes se resumen como R<sub>1</sub>-R<sub>5</sub>. En la tabla, se dan ejemplos típicos para la derivatización en los diferentes sitios. Se puede realizar cualquier combinación de estos ejemplos y cualquier otra derivatización. El compuesto puede estar presente como un hidrocloreto. El anillo lactónico puede ser de siete miembros en lugar de seis miembros.



ES 2 611 054 T3

| Nombre                  | R1                                    | R2  | R3                                | R4                               | R5 |
|-------------------------|---------------------------------------|---|-----------------------------------|----------------------------------|----|
| Camptotecina            | H                                     | H   | H                                 | H                                | H  |
| 9-Nitro-camptotecina    | H                                     | H   | NO <sub>2</sub>                   | H                                | H  |
| 9-Amino-camptotecina    | H                                     | H   | NH <sub>2</sub>                   | H                                | H  |
| 10-Hidroxi-camptotecina | H                                     | OH  | H                                 | H                                | H  |
| Topotecán               | H                                     | OH  | N-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | H                                | H  |
| SN38                    | H                                     | OH  | H                                 | CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> | H  |
| Camptosar <sup>®</sup>  | H                                     |  | H                                 | CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> | H  |
| Lurtotecan <sup>®</sup> | R1 y R2 son:                          |   | H                                 | H                                | H  |
|                         | O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O |   |                                   |                                  |    |
| DX-8951 f               | H                                     | H   | H                                 | H                                | F  |

5 "Lípido catiónico" hace referencia a un compuesto anfífilico que tiene una carga positiva (al pH fisiológico) como puede medirse mediante instrumentación utilizada en el momento de la medida. Donde existen ácidos grasos o cadenas alquílicas presentes en el lípido catiónico, las mismas podrían ser de 12-24 carbonos de longitud, conteniendo hasta 6 insaturaciones (enlaces dobles), y unidas a la cadena principal por enlaces acilo o éter; podría existir también una sola cadena de ácido graso o alquílica unida a la cadena principal. Donde existe más de una cadena de ácido graso o alquílica unida a la cadena principal, los ácidos grasos podrían ser diferentes (asimétricos). Son también posibles formulaciones mixtas.

10 Pueden prepararse "liposomas catiónicos" a partir de los lípidos catiónicos propiamente dichos, o en mezcla con un compuesto anfífilico adicional tales como esteroides o lípidos como colesterol, fosfolípidos, lisolípidos, lisofosfolípidos, esfingolípidos o lípidos pegilados con una carga neta negativa o neutra, particularmente lípidos neutros tales como colesterol; 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolaminas (con inclusión, pero sin carácter limitante, de dioleoil (DOPE)); 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolinas; fosfatidilcolina (PC) natural de yema de huevo o de haba de soja, y análogas; mono- y diacil-fosfoetanolaminas sintéticas. Pueden incluirse también ácidos grasos asimétricos, tanto sintéticos como naturales, y formulaciones mixtas, para los diacil-derivados anteriores.

15 "Preparación o formulación de liposomas catiónicos" hace referencia a una preparación o formulación de liposomas deshidratada o una dispersión de liposomas.

20 "Estabilidad química" del compuesto lipófilo hace referencia a un cambio significativo de su estructura química original, y se define como un cambio de potencia de aprox. 5% del valor de ensayo inicial (compuesto original), con preferencia aproximadamente 2% o aparición de productos de degradación específicos que superan su criterio de aceptación con respecto a límites toxicológicos y aspectos de seguridad. Para compuestos lipófilos tales como paclitaxel, la estabilidad química puede definirse por HPLC/LC-MS/MS y típicamente significa menos de 5% de productos de degradación de dicho compuesto. Los productos típicos de degradación de paclitaxel son v.g. Bacatina III, 7-Epi-Taxol, etc. (Monography of Paclitaxel, USP26, [enero-marzo 2003], USPC, Inc.).

25 "Compuesto cargado en el liposoma" o "compuesto cargado liposómicamente" o "compuesto liposómico" se utilizan de manera sinónima y se refieren a un compuesto que está integrado en la bicapa lipídica del liposoma o asociado con la bicapa lipídica del liposoma de la preparación de liposomas.

30 "Concentración" de x% en moles de un compuesto anfífilico o lipófilo se refiere a la fracción en moles de este compuesto referida a la concentración total de lípidos. Las concentraciones de compuestos solubles en agua se dan en % (m/m) o % (m/v) de la preparación total.

"Compuesto lipófilo" se refiere a un compuesto que se caracteriza por su interacción favorable con la parte lipófila de la membrana liposómica. En las formulaciones de liposomas, el compuesto lipófilo está preferiblemente incorporado (embebido) en la membrana o asociado fuertemente con la misma. No está presente cantidad significativa alguna en el medio no liposómico, como sucedería para los compuestos polares solubles en agua.

35 "Dispersión de liposomas" se refiere a liposomas en una solución acuosa. El término suspensión liposómica puede utilizarse también en el mismo sentido que "dispersión de liposomas" si no se indica otra cosa.

El término "liposomas" hace referencia a vesículas esféricas microscópicas encerradas en una membrana (50-2000 nm de diámetro) producidas artificialmente en el laboratorio o en una planta de producción. El término "liposoma" abarca cualquier compartimiento encerrado por una bicapa lipídica. Se hace referencia también a los liposomas como vesículas lipídicas. A fin de formar un liposoma, las moléculas de lípido comprenden porciones alargadas no polares (hidrófobas) y porciones polares (hidrófilas). Las porciones hidrófoba e hidrófila de la molécula están posicionadas preferiblemente en los dos extremos de una estructura molecular alargada. Cuando tales lípidos se dispersan en agua, los mismos forman espontáneamente membranas bicapa a las que se hace referencia como laminillas. Las laminillas se componen de dos hojas monocapa de moléculas de lípido con sus superficies no polares (hidrófobas) enfrentadas una a otra y sus superficies polares (hidrófilas) enfrentadas al medio acuoso. Las membranas formadas por los lípidos encierran una porción de la fase acuosa de una manera similar a la de una membrana celular que encierra el contenido de una célula. Así pues, la bicapa del liposoma tiene semejanzas con una membrana celular sin los componentes proteínicos presentes en una membrana celular. Como se utiliza en conexión con la presente invención, el término liposoma incluye liposomas multilaminares, que tienen generalmente un diámetro comprendido en el intervalo de 1 a 10  $\mu\text{m}$  y están constituidos por cualquier número desde 2 a centenares de bicapas lipídicas concéntricas que alternan con capas de una fase acuosa, e incluye también vesículas unilaminares que están constituidas por una sola capa lipídica y tienen generalmente un diámetro comprendido en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 400 nm, con preferencia aproximadamente 100 a aproximadamente 400 nm, de modo más preferible aproximadamente 200 a aproximadamente 300 nm. Las vesículas pueden producirse sometiendo liposomas multilaminares a extrusión a presión a través de membranas que tienen poros de tamaño definido, o por homogeneización a alta presión. Métodos de homogeneización adicionales adecuados son bien conocidos en la técnica.

"Estabilidad física" del compuesto lipófilo cargado en el liposoma hace referencia al estado físico del compuesto. La formación de agregados extraliposómicos (v.g. cristales del compuesto) es la forma más común de inestabilidad física de un compuesto. En el caso de los taxanos, la agregación es visible por la formación de agujas del taxano. La cristalización de un taxano puede medirse por inspección visual de la formulación de liposomas líquida, microscopía óptica o medida de la obstrucción de la luz o dispersión dinámica de la luz. La estabilidad física de la dispersión de liposomas se refiere también a características tales como el tamaño y la distribución de tamaños de los liposomas o la existencia de partículas mayores que 1  $\mu\text{m}$ . Especialmente durante la fabricación de la formulación de liposomas de un compuesto lipófilo deben mantenerse las características de los liposomas.

"Estabilidad fisicoquímica" se refiere a una combinación de estabilidad química y física.

"Valor PI" se refiere al Índice de Polidispersidad que hace referencia a la distribución de tamaños de partícula en una dispersión de liposomas como se mide por técnicas de dispersión dinámica de la luz, v.g. con un Malvern Zetasizer 1000 ó 3000.

"Agente estabilizador" se refiere a un agente que estabiliza los liposomas cargados con el compuesto durante la fabricación para mantener la estabilidad fisicoquímica del compuesto lipófilo y la formulación de liposomas. Por ejemplo, para los productos liofilizados, se utilizan crioprotectores como agentes estabilizadores durante la fabricación.

"Taxano" se refiere a la clase de agentes antineoplásicos que tienen un mecanismo de acción de microtúbulos y que tienen una estructura que incluye la estructura inusual de anillos de taxano y una cadena lateral estereoespecífica que se requiere para la actividad citostática. El término taxano se refiere adicionalmente a una diversidad de derivados de taxano conocidos, que incluyen tanto derivados hidrófilos como derivados hidrófobos. Los derivados de taxano incluyen, pero sin carácter limitante, derivados de galactosa y manosa descritos en la Solicitud de Patente Internacional No. WO 99/18113; piperazino y otros derivados descritos en WO 99/14209; derivados de taxano descritos en WO 99/09021, WO 98/22451, y en la Patente U.S. No. 5.869.680; los derivados 6-tio descritos en WO 98/28288; los derivados de sulfenamida descritos en la Patente U.S. No. 5.821.263; y los derivados de paclitaxel descritos en la Patente U.S. No. 5.415.869.

"Concentración total de lípidos" hace referencia a la concentración de la suma de compuestos anfífilos y compuestos lipófilos.

"Potencial zeta" se refiere a un potencial de superficie de una partícula tal como una partícula coloidal medido con un instrumento tal como un Zetasizer 3000 utilizando micro-electroforesis Laser Doppler en las condiciones especificadas. El potencial zeta describe el potencial en el límite entre una solución a granel y la región de cizallamiento hidrodinámico o capa difusa.

En contraste con los métodos descritos en la técnica, la estabilidad del compuesto activo cargado durante los pasos de fabricación a) hasta d) y el paso de reconstitución f) de la presente invención se controla ulteriormente de modo preferible por cualquiera de los medios siguientes:

- pH controlado (bajo) en la fase acuosa
- temperatura controlada (baja)

- velocidad controlada (alta) de fabricación y/o aplicación.

El método inventivo permite la estabilización física y química del compuesto activo cargado mientras el liposoma se encuentra en un ambiente acuoso.

5 Limitaciones del procesamiento de liposomas en la escala de producción como métodos expuestos en la técnica tales como los que se han mencionado arriba carecen parcial o generalmente de la posibilidad de aumento de escala con objeto de satisfacer los requisitos que son necesarios para la producción comercial. Con el método inventivo, se da a conocer por primera vez la producción en gran escala de liposomas catiónicos fisicoquímicamente estables que comprenden un compuesto activo lipófilo.

10 La fabricación de los liposomas catiónicos de la presente invención, el envasado estéril y la transferencia al liofilizador requieren 4-18 horas. Después de ello los liposomas se guardan p.ej. como un polvo liofilizado con un contenido de agua de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5%, con preferencia aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1%. Antes de la aplicación, el polvo liofilizado tiene que reconstituirse, lo que significa que los liposomas se redispersan en una solución acuosa o en agua, lo cual puede conducir a inestabilidad fisicoquímica de la formulación de liposomas y el compuesto lipófilo cargado. Por esta razón, la estabilidad durante el uso tiene que cubrir el periodo de tiempo para la reconstitución, el transporte a la sala hospitalaria y la aplicación al paciente (que es típicamente de varias horas) y debería abarcar un mínimo de 8 horas, idealmente 24 horas. Así pues, el periodo mínimo de tiempo para manipulación de la preparación acuosa de liposomas es 12 h a temperaturas refrigeradas (2-8°C) y 4 h más a la temperatura ambiente.

20 Con la presente invención se proporciona un método en el cual la estabilidad química del liposoma catiónico que comprende un compuesto activo se garantiza durante el intervalo de tiempo descrito.

Así pues, en una realización preferida del método inventivo, dicha preparación de liposomas que comprende dicho compuesto activo es estable física y químicamente en uno cualquiera de los pasos b) a d) o f) durante al menos 12 horas a aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 8°C y al menos aproximadamente 4 horas a la temperatura ambiente.

25 La estabilidad física y química en el contexto de la presente invención se refieren al liposoma catiónico y al compuesto activo. La estabilidad fisicoquímica del compuesto activo se refiere al compuesto lipófilo que está cargado en el liposoma catiónico de la preparación de liposomas. Cargado significa que el compuesto puede estar integrado/embebido en la bicapa lipídica del liposoma y/o asociado interior y/o exteriormente con el liposoma.

30 Físicamente estable, referido al compuesto cargado, significa que p.ej. sustancialmente no son detectables productos de agregación del compuesto en ningún caso. La inestabilidad física es detectable por medidas de partículas no visibles (v.g. por medida de obstrucción de la luz), microscopía óptica y dispersión dinámica de la luz (DLS). La estabilidad química significa que los productos de degradación son inferiores a aproximadamente 5% de la cantidad total del compuesto. La detección de productos de degradación puede realizarse v.g. por HPLC.

35 Aparte de las consideraciones de estabilidad, el pH de una forma farmacéutica de dosificación está determinado por su modo de aplicación. En general, para una aplicación i.v. (inyección, infusión) se prefieren soluciones a pH fisiológico. Por tanto, usualmente se utilizan soluciones acuosas no tamponadas o un tampón fisiológico en el intervalo de pH 7,0~7,5 para la fabricación de liposomas de paclitaxel. Ninguna de las descripciones que tratan de la carga de paclitaxel en liposomas catiónicos considera la estabilidad química del paclitaxel liposómico. De acuerdo con ello, el pH se selecciona considerando una tolerabilidad máxima de la formulación farmacéutica en el paciente, que se encuentra a pH fisiológico.

40 La ignorancia de la cuestión de la estabilidad por el documento más reciente publicado acerca de paclitaxel en liposomas catiónicos (tal como temperatura y pH, véase [3]) está respaldada por el hecho de que el proceso de fabricación se realiza a temperatura elevada como se ha descrito arriba.

45 Se sabe por la literatura científica que el paclitaxel en un tampón acuoso alcanza su máxima estabilidad a un pH ácido en el intervalo de 3 a 5 [4]. Sin embargo, los datos publicados para paclitaxel formulado con liposomas cargados negativamente o neutros difieren significativamente de los descubrimientos con los liposomas cargados positivamente. Sharma y Straubinger [1] consignaron para liposomas neutros y aniónicos una estabilidad química mayor que 3 meses a 4°C y a la temperatura ambiente. En cambio, los solicitantes encontraron que la descomposición en las formulaciones catiónicas puede ocurrir en una escala de tiempo de horas o días. Esto demuestra que las membranas liposómicas cargadas con el compuesto representan un sistema sumamente complejo, en el que las interacciones entre los componentes individuales son críticas para la estabilidad fisicoquímica de los liposomas cargados con paclitaxel.

55 Experimentos realizados demuestran que la estabilidad química de los (fosfoéster-)lípidos en liposomas depende del pH del entorno (v.g. [5], [7], [8]). La mayoría de los liposomas neutros y aniónicos exhiben una estabilidad fisicoquímica óptima a aproximadamente pH 6,5 y una pérdida más o menos significativa de estabilidad con el valor de pH creciente o decreciente debida v.g. a hidrólisis de los ésteres de las estructuras lipídicas. Vernooij et al. demuestran que estos resultados no pueden transferirse a liposomas catiónicos compuestos de DOTAP y DOPE. En

estos liposomas, DOTAP y DOPE son sumamente estables a un pH inferior a 6,4 y 6,1, respectivamente, y la tasa de hidrólisis en esta región es prácticamente independiente del pH. Los autores no consiguieron explicar la cinética de la hidrólisis observada sobre la base de su modelo existente, pero sugirieron que la hidrólisis influenciada por aminas puede jugar un papel importante en la conformación de los perfiles k-pH.

5 Sin embargo, es cuestionable si uno de los modelos arriba mencionados es aplicable a una formulación que contenga otro lípido neutro en lugar de DOPE. Por consiguiente, el pH óptimo para la estabilidad química de los lípidos utilizados para formulaciones catiónicas de liposomas no puede deducirse de las exposiciones de la técnica anterior.

10 En la presente invención se encontró sorprendentemente que los liposomas catiónicos que comprenden paclitaxel se caracterizan por una estabilidad química óptima a valores de pH ácido. Esto está en contraste acusado con los datos publicados para liposomas neutros y/o aniónicos ([1], [6]).

15 Así pues, el valor de pH del medio acuoso en uno cualquiera de los pasos b) a d) y f) del método inventivo es tal que dicha preparación de liposomas mantiene estabilidad física y química durante al menos 12 horas a aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 8°C y al menos aproximadamente 4 horas a la temperatura ambiente, que es el valor de pH entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6,5, y de modo más preferible entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6,5.

En otra realización preferida, el método inventivo comprende adicionalmente enfriar a una temperatura entre aproximadamente -1°C y aproximadamente 15°C, preferiblemente a una temperatura entre aproximadamente 1°C y aproximadamente 10°C, y de modo muy preferible entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C.

20 La invención proporciona además un método para producir una preparación de liposomas catiónicos que comprende un taxano como agente anti-angiogénico y citotóxico. Dicha preparación puede inhibir la angiogénesis y es por consiguiente útil en el tratamiento de una diversidad de enfermedades tales como cáncer, inflamación crónica y análogas.

25 Así pues, otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir una preparación de liposomas catiónicos que comprende al menos un compuesto anfifílico seleccionado de lípidos catiónicos en una cantidad de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos un compuesto anfifílico adicional en una cantidad de hasta aproximadamente 68% en moles, un taxano en una cantidad de al menos aproximadamente 2% en moles y un agente estabilizador en una cantidad de aproximadamente 0,1% (m/v) a aproximadamente 20% (m/v), que comprende los pasos de

- 30 a) proporcionar
- i. una solución orgánica que comprende un disolvente orgánico, dicho taxano y dicho lípido catiónico, y opcionalmente dicho compuesto anfifílico adicional,
  - ii. una solución acuosa que comprende dicho agente estabilizador,
- 35 b) preparar una preparación de liposomas catiónicos a partir de dicha solución a) i) y a) ii), en donde dicha preparación comprende liposomas catiónicos en un medio acuoso,
- c) opcionalmente, homogeneizar dicha preparación al menos una vez y/o
- d) opcionalmente filtrar en condiciones estériles dicha preparación,
- e) deshidratar dicha preparación y
- 40 f) opcionalmente, reconstituir dichos liposomas catiónicos del paso e) en una solución acuosa y en donde opcionalmente antes del paso c) y/o d) se incluye un paso de ultrafiltración.

en donde el valor de pH del medio acuoso en uno cualquiera de los pasos b) a d) o f) está entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6,5.

45 En una realización preferida del método inventivo, dicha preparación de liposomas que comprende dicho taxano es física y químicamente estable en uno cualquiera de los pasos b) a d) o f) durante al menos 12 horas a aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8°C y al menos aproximadamente 4 horas a la temperatura ambiente.

50 Por regla general, la proporción de un taxano en la preparación de liposomas catiónicos de la presente invención es menor que aproximadamente 20% en moles. En algunas realizaciones, la preparación de liposomas catiónicos comprende un taxano en una proporción de aproximadamente 0,5% en moles a aproximadamente 20% en moles, con preferencia desde aproximadamente 2% en moles a aproximadamente 15% en moles. En otras realizaciones, está presente un taxano en una proporción de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 5% en moles, y en otras realizaciones adicionales desde aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 15% en moles, y de modo más preferible desde aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 13% en moles.

- 5 En una realización preferida del método inventivo, dicha preparación de liposomas comprende un taxano, preferiblemente paclitaxel o docetaxel o un derivado lipófilo de los mismos en una cantidad de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 20% en moles, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 2% en moles a aproximadamente 5% en moles para paclitaxel o preferiblemente en una cantidad de al menos 3% en moles para docetaxel o succinil-paclitaxel y muy preferiblemente en una cantidad de al menos 5% en moles para docetaxel o succinil-paclitaxel.
- 10 Es una característica de la presente invención que el taxano no se separa sustancialmente de la bicapa liposómica a la fase acuosa y no forma sustancialmente cristales de taxano en una dispersión de liposomas durante un periodo de al menos 0,5 horas, generalmente al menos 1 hora, con preferencia al menos aproximadamente 2 horas, con más preferencia al menos aproximadamente 3 horas y muy preferiblemente al menos aproximadamente 4 horas a la temperatura ambiente. Un liposoma catiónico en el cual el taxano no se separa sustancialmente de la bicapa liposómica es uno en el cual por regla general menos de aproximadamente 20%, usualmente menos de aproximadamente 10%, más usualmente menos de aproximadamente 5%, típicamente menos de aproximadamente 1% y preferiblemente menos de aproximadamente 0,5% de la cantidad total de taxano cargada en el liposoma catiónico se ha separado de la bicapa del liposoma.
- 15 Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar una preparación liposómica catiónica obtenible mediante un procedimiento del método descrito.
- 20 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una preparación liposómica catiónica que comprende al menos un compuesto anfifílico seleccionado de lípidos catiónicos de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos algún otro compuesto anfifílico de hasta aproximadamente 69,9% en moles, un compuesto activo lipófilo de al menos aproximadamente 2% en moles, y un agente estabilizador de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 20% (m/v), caracterizada por que dicha preparación liposómica es física y químicamente estable en una solución acuosa durante al menos 12 horas a 2 a 8°C y al menos 4 horas a temperatura ambiente, y tiene un valor de pH de aproximadamente 3 y 6,5, cuando está presente en una solución acuosa.
- 25 En otra realización preferida de la preparación de la presente invención, el compuesto lipófilo activo se selecciona de una camptotecina, una estatina, un depsipéptido, talidomida, otros agentes que interactúan con los microtúbulos, tales como discodermolida, laulimalida, isolaulimalida, eleuterobina, sarcodictina A y B, y en una realización más preferida, el compuesto activo lipófilo se selecciona de camptotecina, o cualquier derivado lipófilo de los mismos.
- 30 En una realización descrita, dicha preparación de liposomas comprende un taxano, preferiblemente paclitaxel o docetaxel o un derivado lipófilo de los mismos en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 20% en moles, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 5% en moles para paclitaxel o preferiblemente en 1 cantidad de al menos 5% en moles para docetaxel o succinil-paclitaxel. En una realización más preferida, dicha preparación liposómica comprende camptotecina-lactona en una cantidad de aproximadamente 0,1% en moles a aproximadamente 1% en moles.
- 35 En una realización preferida, la preparación de inventiva comprende un agente estabilizador tal como trehalosa en el intervalo de aproximadamente 5% (m/v) a aproximadamente 15% (m/v) con respecto al volumen total de la preparación.
- 40 También se describe una preparación de liposomas catiónicos que comprende al menos un compuesto anfifílico seleccionado de lípidos catiónicos de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos otro compuesto anfifílico de hasta aproximadamente 65% en moles, paclitaxel aproximadamente 5% en moles y un agente estabilizador de aproximadamente 0,1% (m/v) a aproximadamente 20% (m/v), caracterizada porque dicha preparación de liposomas es física y químicamente estable en una solución acuosa durante al menos 12 horas a 2.°C hasta 8°C y al menos 4 horas a la temperatura ambiente, y que tiene un valor de pH de entre 3 y 6,5, cuando está presente en una solución acuosa.
- 45 Se describe además una preparación de liposomas catiónicos que comprende al menos un compuesto anfifílico seleccionado de lípidos catiónicos de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos otro compuesto anfifílico de hasta aproximadamente 65% en moles, docetaxel de al menos aproximadamente 5% en moles y un agente estabilizador de aproximadamente 0,1% (m/v) a aproximadamente 20% (m/v) que tiene un valor de pH de entre 3 y 6,5 cuando está presente en una solución acuosa.
- 50 Se describe además una preparación de liposomas catiónicos que comprende al menos un lípido catiónico de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos otro compuesto anfifílico de hasta aproximadamente 65% en moles, succinil-paclitaxel de al menos aproximadamente 5% en moles y un agente estabilizador de aproximadamente 0,1% (m/v) a aproximadamente 20% (m/v) que tiene un valor de pH de entre 3 y 6,5 cuando está presente en una solución acuosa.
- 55 Es una característica de la presente invención que los liposomas catiónicos tienen un potencial zeta positivo en solución de KCl aproximadamente 0,05M a aproximadamente pH 7,5 a la temperatura ambiente, preferiblemente un potencial zeta en el intervalo de aproximadamente 25 mV a 100 mV en solución de KCl aproximadamente 0,05M a

aproximadamente pH 7,5 a la temperatura ambiente y más preferiblemente un potencial zeta en el intervalo de aproximadamente 35 mV a 70 mV en solución de KCl aproximadamente 0,05M a aproximadamente pH 7,5 a la temperatura ambiente.

5 Una característica adicional de la presente invención es que cualquier preparación de liposomas de la invención comprende liposomas con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 400 nm, con preferencia aproximadamente 100 nm a aproximadamente 300 nm.

10 La composición de liposomas de la presente invención puede encontrarse en una forma seca liofilizada o en forma de una suspensión líquida. Se prefiere la forma liofilizada, dado que puede mantenerse de manera estable durante periodos de hasta varios meses o años. Las suspensiones de la composición de liposomas de la presente invención en pH débilmente ácido (tamponado o acidificado) son estables durante periodos de horas hasta meses, dependiendo de la temperatura, el contenido del compuesto, y los constituyentes fosfolípidicos.

Se describe una composición farmacéutica que comprende una cualquiera de las preparaciones de liposomas de la invención junto con un portador, diluyente, y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

15 La composición de liposomas de la presente invención es activa en el campo del tratamiento del cáncer, la curación de las heridas y varias enfermedades crónicas, y en general en el tratamiento de enfermedades asociadas con actividad angiogénica aumentada por administración de la composición a pacientes en una cantidad eficaz. Los liposomas de la presente invención pueden administrarse solos o en combinación con portadores o diluyentes farmacéuticos adecuados. Formas de aplicación adecuadas son las rutas de administración parenterales tales como administración intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Las formas de dosificación adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones y análogos, bien conocidas en la técnica.

El objeto de la invención se define en las reivindicaciones.

## Ejemplos

### 1. Ejemplo 1: Preparación de liposomas cargados con paclitaxel (LipoPac™)

25 El ejemplo siguiente describe la fabricación de liposomas cargados con paclitaxel (LipoPac™) que es aplicable a una escala de 41, 12 l y al menos 66 l. Todas las formulaciones líquidas están compuestas estequiométricamente por:

|                       |               |
|-----------------------|---------------|
| - DOTAP-Cl            | 50 % en moles |
| - DOPC                | 47 % en moles |
| - paclitaxel          | 3 % en moles  |
| - trehalosa-dihidrato | 108,2 g/l     |
| - etanol              | 1,33 % (m/m)  |

El etanol es un producto intermedio. Se supone que el etanol se elimina al menos parcialmente por liofilización. Se determinaron las cantidades residuales de etanol para los Protocolos 2 y 3 y se encontró que eran inferiores a 1%.

#### 1.1 Solución etanólica de lípido

30 Una cantidad apropiada de DOTAP-Cl, DOPC y paclitaxel se disuelve en etanol para dar una concentración final de 400 mM de compuestos lipófilos totales en etanol. Se obtuvo una solución clara (solución etanólica de lípido). La solución etanólica de lípido puede guardarse durante una noche a 2-8°C.

#### 1.2 Preparación de solución de Trehalosa

35 Se disuelve una cantidad apropiada de trehalosa-dihidrato en agua para inyección (Wfi) y se agita durante al menos 5 min hasta que se obtiene una solución clara. La solución preparada se filtra a través de una membrana de filtración plana de 0,22 µm de PVDF (Millipak) a la temperatura ambiente. Alternativamente, la solución de trehalosa puede filtrarse a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,22 µm (Sartobran® P) a la temperatura ambiente o a través de una membrana de filtración estéril de grado esterilizante (0,22 µm) a la temperatura ambiente. Antes de iniciar la inyección de etanol se ajustan el pH y la temperatura a pH 3-7 y 2-8°C respectivamente, y se mantiene a esta temperatura.

#### 1.3 Inyección de etanol

40 Se inyecta una solución lipídica de etanol en la solución agitada de trehalosa con una velocidad de al menos 0,433 ml/min, pero puede aumentarse dependiendo de las circunstancias. La solución de trehalosa se agita con una velocidad de al menos 280 rpm pero puede aumentarse de acuerdo con las circunstancias. La inyección se realiza

con un embudo de goteo o a través de un capilar utilizando una bomba de pistón. La dispersión bruta obtenida se agita durante al menos 5 min.

#### 1.4 Extrusión

5 La dispersión bruta se extrude 5 veces a través de una membrana de policarbonato de 200 nm. La dispersión de liposomas se fuerza 5 veces a través de la membrana aplicando una presión de al menos 2 bar. Durante la extrusión, la temperatura se mantiene a 2-8°C.

#### 1.5 Filtración estéril

10 Después de la extrusión, la dispersión de liposomas se filtra a través de un filtro de grado esterilizante (MilliPak 200, 0,22 µm). Se aplica inmediatamente una presión de al menos 2,5 bar. Se realiza la filtración estéril a 2-8°C. Puede realizarse un segundo paso de filtración estéril para asegurar la eliminación completa de las bacterias.

#### 1.6 Liofilización

La liofilización tiene que ajustarse al tamaño de la escala de preparación determinada, dando como resultado preparaciones similares.

Protocolo 1 para una escala de 4 l, viales 6R con un volumen de llenado de 2,1 ml/vial:

15 La liofilización se realiza utilizando un liofilizador Christ (Epsilon 2-12D). Resumidamente, las muestras se congelan a -40°C durante 3 horas. El secado primario se realizó a -40°C, -30°C y -16°C. La presión se ajustó a 0,1 mbar. El secado secundario se realizó a +20°C y se aplicó vacío (0,01 mbar). Los viales se cierran a aprox. 800 mbar de presión bajo nitrógeno.

Protocolo 2 para una escala de 12 l, viales 50 H con un volumen de llenado de 14 ml/vial:

20 La liofilización se realiza utilizando un liofilizador Christ. Resumidamente, las muestras se congelan a 0-30°C durante 3 h. Después de la congelación, la temperatura y la presión se ajustan a -16°C y 0,1 mbar. Después de 60 h de secado primario, la temperatura se aumenta a +20°C y la presión se reduce a 0,001 mbar dentro de 3 h. El secado secundario se realiza durante 12 h a +20°C y 0,001 mbar. Los viales se cierran a aprox. 800 mbar de presión bajo nitrógeno.

25 Protocolo 3 para una escala de 66 l, viales 100 H con un volumen de llenado de 25 ml/vial:

30 La liofilización se realiza utilizando un liofilizador Kniese EK-10. Resumidamente, las muestras se congelan a -40°C durante al menos 3 h. Después de la congelación, la temperatura del producto se eleva a -16°C. La presión se ajusta a 0,1 mbar. Después de 12 h de secado primario, la temperatura se aumenta a 0°C en el transcurso de 59 h. El secado secundario se realiza durante 12 h a +20°C y 0,01 mbar utilizando una rampa de 3 h para ajustar la presión y la temperatura. Los viales se cierran a aprox. 800 mbar de presión bajo nitrógeno.

Protocolo 4 para una escala de 66 l, viales 100 H con un volumen de llenado de 25 ml/vial:

35 La liofilización se realiza utilizando un liofilizador Kniese EK-10. Resumidamente, las muestras se congelan a -40°C durante al menos 3 h. Después de la congelación, la temperatura del producto se eleva a -16°C. La presión se ajusta a 0,1 mbar. La temperatura y la presión se mantienen constantes durante un periodo de tiempo de 60 a 100 h. El secado secundario se realiza durante 12 h a +20°C y 0,01 mbar utilizando una rampa de 3 h para ajustar la presión y la temperatura. Los viales se cierran a aprox. 800 mbar de presión bajo nitrógeno.

40 Se fabricó LipoPac™ de acuerdo con el procedimiento arriba descrito. Todas las preparaciones eran de tamaño homogéneo (Zave y PI) después de extrusión y filtración estéril (Zave aproximadamente 220 nm y PI aproximadamente 0,2-0,3). Después de la liofilización, se obtuvieron muestras con un índice PI de 0,27 (lote GB100, Fig. 1) o respectivamente 0,56 (GB 261, Fig. 2) dependiendo del protocolo de liofilización utilizado.

GB 100 se ha fabricado de acuerdo con un protocolo de liofilización similar al protocolo 4, en tanto que GB 261 se ha fabricado de acuerdo con un protocolo de liofilización similar al protocolo 3.

45 Se realizaron análisis HPLC de diferentes lotes con el foco puesto en la degradación del paclitaxel como puede observarse por la formación de 7-epitaxol, un producto principal de la degradación. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1: Formación de 7-epitaxol en diferentes lotes**

| Lote | Temperatura durante la fabricación | 7-Epitaxol |
|------|------------------------------------|------------|
| 1    | Temperatura ambiente               | 1,5 %      |
| 2    |                                    | 1,2 %      |
| 3    |                                    | 0,9 %      |
| 4    | 2 - 8 °C                           | 0,4 %      |
| 5    |                                    | 0,2 %      |
| 6    |                                    | 0,3 %      |
| 7    |                                    | 0,7 %      |
| 8    |                                    | 0,7 %      |
| 9    |                                    | 0,5 %      |

La formación de 7-epitaxol depende de la temperatura de fabricación del material a granel. Los lotes 1-3 se fabricaron a la temperatura ambiente en escala de 8-12 l. Se encontró que 7-epitaxol estaba comprendido en el intervalo de 0,9-1,5%. La disminución de la temperatura de fabricación hasta 2-8°C dio como resultado una disminución del contenido de 7-epitaxol hasta 0,2-0,7%. El pH de todas las suspensiones de liposomas durante la fabricación estaba comprendido entre 4,7 y 6.

## 2. Ejemplo 2: Influencia del valor de pH sobre la estabilidad durante el uso del paclitaxel liposómico después de reconstitución

### 2.1 Sumario

El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de la temperatura y el valor de pH sobre la estabilidad durante la utilización de paclitaxel liposómico después de reconstitución de las preparaciones liofilizadas. Se realizaron estudios con diferentes muestras de paclitaxel liposómico, lote Si 175 a dos temperaturas diferentes y 7 valores de pH diferentes (pH 5,0 a 8,0).

Muestras liofilizadas de paclitaxel liposómico, lote Si175 (preparado como se ha descrito arriba en el Ejemplo 1) se reconstituyeron en soluciones tampón 10 mM BISTRIS o TRIS, que se ajustaron previamente a valores de pH en el intervalo de 5,0 a 8,0. Las dispersiones acuosas se guardaron a la temperatura ambiente o en un frigorífico (2-8°C) durante hasta 32 h.

**Temperatura ambiente:** La degradación del paclitaxel liposómico depende acusadamente del valor de pH de la dispersión acuosa. El paclitaxel es estable a valores de pH de 6,0 e inferiores durante hasta 32 h. Sólo aproximadamente 1% de la sustancia activa se degradaba durante 32 h a pH 6,0. A valores de pH mayores, la degradación aumentaba de modo espectacular desde aproximadamente 8% a pH 6,5 a aproximadamente 70% a pH 8,0 en el transcurso de 32 h.

El producto de degradación principal era 7-epi-taxol. Su cantidad formada durante 32 h aumentaba desde aproximadamente 1% a pH 6,0 a aproximadamente 25% a pH 8,0. Bacatina III y 10-desacetiltaxol aumentaban linealmente hasta aproximadamente 12% después de 32 h a pH 8,0. Una estabilidad aceptable durante el uso de no más de 2% de degradación del paclitaxel liposómico a la temperatura ambiente podía alcanzarse únicamente si el valor de pH de la solución acuosa era 6,0 o inferior. En estas condiciones, la formación de compuestos de degradación podía despreciarse prácticamente. Pudo alcanzarse una estabilidad durante el uso de 12 h sin problemas en este intervalo de pH. Por encima de valores de pH de 6,0, la estabilidad durante el uso de 12 h tiene que reducirse y ajustarse de acuerdo con las cantidades de productos de degradación aceptadas en la dispersión.

**Frigorífico:** La degradación del paclitaxel liposómico podía ralentizarse significativamente a temperaturas inferiores. El paclitaxel es estable a valores de pH de 6,5 o inferiores. Esto significa que el valor crítico de pH podría incrementarse desde 6,0 a 6,5 comparado con los experimentos realizados a la temperatura ambiente. A valores de pH más altos aumentaba la degradación, pero en menores grados que a la temperatura ambiente. A pH 8,0, pudieron recuperarse cantidades de paclitaxel mayores del doble después de 32 h.

Se formaban productos de degradación en las mismas proporciones que en los experimentos conducidos a la temperatura ambiente, pero en cantidades significativamente inferiores. Una vez más, 7-epi-taxol era el producto principal de degradación de paclitaxel (10% a pH 8,0). Bacatina III y 10-desacetiltaxol se formaban en proporciones de aproximadamente 5 a 6% a pH 8,0. Las sustancias desconocidas encontradas eran las mismas.

La estabilidad durante el uso del paclitaxel liposómico podía aumentarse significativamente a temperaturas más bajas (2-8°C). En un intervalo de pH de 5,0 a 6,5, las muestras reconstituidas pueden guardarse durante hasta 32 h

sin la formación de productos de degradación. La degradación es mucho más lenta comparada con la temperatura ambiente incluso a valores de pH más altos.

Estos experimentos demostraron que el almacenamiento del paclitaxel liposómico en un medio ácido (pH inferior a 6,5) en el frigorífico reducía los procesos de degradación de la sustancia activa paclitaxel. La estabilidad durante el uso de las dispersiones podía prolongarse hasta más de 12 h en estas condiciones.

## 2.2 Experimental:

### 2.2.1 Sistema de Test - Formulación

En este estudio se utilizó una formulación de lipomas de paclitaxel como se muestra en la Tabla 2:

**Tabla 2: Formulación de liposomas investigada**

| Formulación                  | Lote No.      | Composición teórica [mM] |            |            | Volumen de Liofilizado por Vial [ml] |
|------------------------------|---------------|--------------------------|------------|------------|--------------------------------------|
|                              |               | DOTAP                    | DOPC       | Paclitaxel |                                      |
| <i>Paclitaxel liposómico</i> | <i>Si 175</i> | <i>5,0</i>               | <i>4,7</i> | <i>0,3</i> | <i>2,1</i>                           |

### 2.2.2 Instrumentos

#### Sistema HPLC:

- Autoinyector: SIL-10ADVP con bandeja de muestras No. 11
  - Bomba isocrática: LC-10ADVP
  - Desgasificador: DGU-14A
  - Horno de columna: CTO-10ASVP
  - Detector DAD: SPD-M10AVP
  - Controlador: SCL-10AVP
  - Software para evaluación: CLASS VP, Versión 6.10
- Shimadzu Deutschland GmbH; 47269 Duisburg, Alemania

#### Medidor de pH:

- InoLab pH Level 2; WTW GmbH und Co. KG; 82362 Weinheim, Alemania

Refrigerador y frigorífico disponibles habitualmente en el laboratorio.

### 2.2.3 Método HPLC

#### Columnas:

LiChroCART<sup>®</sup> 250-4, LiChrospher<sup>®</sup> 60, RP-select B, longitud 250 mm,

ID: 4 mm, tamaño de partícula: 5 µm; Pedido No.: 1.50839.0001

Pre-columna: v.g. 8/4 LiChrospher<sup>®</sup> 100-5 C18; Pedido No.1-

50957 Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Alemania

Volumen de Inyección: 10 µl

Temperatura del Horno: 35°C

Fase Móvil: acetonitrilo/THF/acetato de amonio 2 mM (32/12/56, v/v/v; v = % volumen)

Caudal: 1,00 ml/min

Longitud de Onda del Detector: 229 nm

### 2.2.4 Preparación de las Muestras

Las muestras liofilizadas (preparación descrita en el Ejemplo) se reconstituyeron en soluciones tampón BISTRIS o TRIS 10 mM, que se ajustaron a valores de pH en el intervalo de 5,0 a 8,0 con ácido clorhídrico. Las soluciones se agitaron cuidadosamente hasta que se obtuvo una dispersión homogénea, ligeramente turbia, que estaba exenta de partículas visibles. Las soluciones se utilizaron 30 min después de su preparación, lo más pronto posible.

#### 5 Preparación de las soluciones tampón BISTRIS 10 mM:

Se pesaron aproximadamente 1,26 g de BISTRIS en un vaso de precipitados de 1000 ml y se diluyeron con 600 ml de agua (agua para inyección, medida exactamente con una probeta graduada). Se ajustaron luego 5 partes alícuotas de 100 ml de esta solución con ácido clorhídrico (HCl) 1M a valores de pH de 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 y 7,0. Fueron necesarios aproximadamente 0,5 ml (pH 7,0) a 4,0 ml (pH 5,0) del ácido para el ajuste de los valores de pH. El HCl 1M se preparó por dilución de aproximadamente 9 g de HCl (37%) con 100 ml de agua (agua para inyección).

La capacidad de tamponamiento del tampón BISTRIS a valores de pH inferiores a 5,5 es baja y puede despreciarse a un valor de pH de 5,0. Sin embargo, se eligió la misma debido a que la mayoría de los tampones no podían utilizarse en combinación con liposomas catiónicos.

#### Preparación de las soluciones tampón TRIS:

15 Se pesaron aproximadamente 1,21 g de TRIS en un matraz aforado de 1000 ml y se llenaron hasta el volumen total con agua (agua para inyección). A continuación, se ajustaron dos partes alícuotas de 100 ml de esta solución con HCl 1M a valores de pH de 7,5 y 8,0. Se necesitaron aproximadamente 1 ml (pH 8,0) y 1,5 ml (pH 7,5) del ácido.

### 2.2.5 Condiciones de Almacenamiento y Protocolo de Toma de Muestras

20 Después de la preparación, se guardaron las muestras como se describe en la Tabla 3. La toma de muestras se realizó después de 0, 1, 3, 6, 8, 24 y 32 h después de la reconstitución. Para cada intervalo de toma de muestra, se extrajeron del vial partes alícuotas de 200 µl de la dispersión y se determinaron los parámetros pureza y contenido de paclitaxel por análisis HPLC. Adicionalmente, se determinó el valor de pH de la dispersión para cada fecha de toma de muestras.

**Tabla 3: Condiciones de Almacenamiento**

| Muestra No. | Valor de pH | Temperatura [°C] | Tiempo máx. de almacenamiento [h] |
|-------------|-------------|------------------|-----------------------------------|
| 001         | 5,0         | 2 — 8 °C         | 34                                |
| 002         | 5,5         |                  |                                   |
| 003         | 6,0         |                  |                                   |
| 004         | 6,5         |                  |                                   |
| 005         | 7,0         |                  |                                   |
| 006         | 7,5         |                  |                                   |
| 007         | 8,0         |                  |                                   |
| 008         | 5,0         | Temp. ambiente   | 34                                |
| 009         | 5,5         |                  |                                   |
| 010         | 6,0         |                  |                                   |
| 011         | 6,5         |                  |                                   |
| 012         | 7,0         |                  |                                   |
| 013         | 7,5         |                  |                                   |
| 014         | 8,0         |                  |                                   |

25

## 2.3 Resultados y Discusión

### 2.3.1 Degradación del Paclitaxel Liposómico a la Temperatura Ambiente

La degradación del paclitaxel liposómico depende acusadamente del valor de pH de la solución acuosa después de la reconstitución. Como puede verse en la Tabla 4, el paclitaxel es químicamente estable a valores de pH de 6,0 e

inferiores durante hasta 32 h. Se degradaba sólo aproximadamente 1% de la sustancia activa durante 32 h a pH 6,0. La degradación apreciable del paclitaxel comienza a valores de pH superiores a 6,0 (véanse la Tabla 6 y la Tabla 7). A pH 6,5 se degradaba aproximadamente 10% de la sustancia activa durante 32 h. Al aumentar el valor de pH desde 7,0 a 8,0, la cantidad de productos de degradación aumentaba espectacularmente (véase Tabla 8). A pH 8,0, sólo pudo recuperarse aproximadamente 30% de la cantidad original de paclitaxel. Incluso en la primera muestra (0 h), a pH 8,0, se degradaba ya 10% del paclitaxel, dado que la primera toma de muestras se realizó media hora después de la reconstitución del vial.

Una estabilidad aceptable durante el uso de los liposomas cargados con paclitaxel a la temperatura ambiente podría conseguirse únicamente si el valor de pH de la solución acuosa es 6,0 o menor. Entonces, la formación de compuestos de degradación podía considerarse prácticamente insignificante. Pudo alcanzarse una estabilidad de 12 h durante la utilización sin problemas en este intervalo de pH.

Por encima de valores de pH de 6,0, la estabilidad de 12 h durante el uso tiene que reducirse y ajustarse de acuerdo con las cantidades de productos de degradación aceptadas en la dispersión.

El producto principal de degradación observado en este estudio era 7-epi-taxol. Sus cantidades formadas durante 32 h aumentaban desde aproximadamente 1% a pH 6,0 hasta aproximadamente 25% a pH 8,0. Bacatina III y 10-desacetiltaxol aumentaban de manera lineal hasta aproximadamente 12% después de 32 h a pH 8,0. (Véanse Tabla 6, Tabla 7 y Tabla 8).

**Tabla 4: Influencia del tiempo de almacenamiento y el pH sobre la degradación a la temperatura ambiente**

| Valor de pH | Producto Total de Degradación [% Área] |                |                 | Diferencia Absoluta |
|-------------|--|----------------|-----------------|---------------------|
|             | Después de 0 h                         | Después de 8 h | Después de 32 h |                     |
| 5,0         | 3,4                                    | 3,4            | 2,8             | -0,6                |
| 5,5         | 3,3                                    | 3,3            | 3,4             | +0,1                |
| 6,0         | 3,4                                    | 3,8            | 4,5             | +1,1                |
| 6,5         | 3,6                                    | 5,4            | 9,4             | +5,8                |
| 7,0         | 4,3                                    | 12,9           | 27,1            | +22,8               |
| 7,5         | 5,1                                    | 16,7           | 35,6            | +30,5               |
| 8,0         | 9,6                                    | 40,2           | 56,9            | +46,5               |

### 2.3.2 Degradación del Paclitaxel liposómico a 2-8°C

La degradación del paclitaxel liposómico podía ralentizarse a temperaturas inferiores. Como puede verse en la Tabla 5, el paclitaxel es estable a valores de pH  $\leq 6,5$ . Esto significa que el valor crítico de pH podría aumentarse desde 6,0 a 6,5 comparado a la temperatura ambiente. En el intervalo de pH 5,0 a 6,5, el sistema acuoso es estable (véanse también Tabla 9 y Tabla 10).

La descomposición comienza a valores de pH superiores a 6,5. A pH 7,0, aproximadamente el 7% de la sustancia activa se degradaba durante 32 h. A valores de pH más altos, la degradación aumentaba, pero en menor grado comparada con los experimentos conducidos a la temperatura ambiente (véanse Tabla 10 y Tabla 11). A pH 8,0, pudieron recuperarse cantidades de paclitaxel mayores del doble (30% a la temperatura ambiente frente a 64% a 2-8°C) después de 32 h.

La estabilidad durante el uso del paclitaxel liposómico podría aumentarse significativamente a temperaturas más bajas (2-8°C). En un intervalo de pH de 5,0 a 6,5, las muestras reconstituidas pueden guardarse durante hasta 32 h sin formación de productos de degradación. La degradación es mucho más lenta comparada a la temperatura ambiente incluso a valores de pH más altos. Por encima de valores de pH de 6,5, la estabilidad durante el uso debe ajustarse de acuerdo con las cantidades de productos de degradación aceptadas en la dispersión.

Se formaban productos de degradación en las mismas proporciones que en los experimentos conducidos a la temperatura ambiente, pero en cantidades significativamente menores. De nuevo, 7-epi-taxol era el producto principal de degradación del paclitaxel. Sus cantidades formadas durante 32 h aumentaban desde aproximadamente 3% a pH 7,0 a aproximadamente 10% a pH 8,0 (véase Tabla 11). Bacatina III y 10-desacetiltaxol se formaban en proporciones de aproximadamente 5 a 6% a pH 8,0.

40

**Tabla 5: Influencia del tiempo de almacenamiento y el pH sobre la degradación a 2-8°C**

| Valor de pH | Producto Total de Degradación [% Área] |                |                 | Diferencia Absoluta |
|-------------|--|----------------|-----------------|---------------------|
|             | Después de 0 h                         | Después de 8 h | Después de 32 h |                     |
| 5,0         | 3,3                                    | 3,0            | 2,9             | -0,4                |
| 5,5         | 3,2                                    | 3,0            | 2,8             | - 0,4               |
| 6,0         | 3,3                                    | 3,1            | 3,1             | - 0,2               |
| 6,5         | 3,5                                    | 3,7            | 3,9             | + 0,4               |
| 7,0         | 4,4                                    | 6,7            | 10,0            | + 5,6               |
| 7,5         | 5,3                                    | 10,3           | 12,8            | + 7,5               |
| 8,0         | 10,2                                   | 25,0           | 31,8            | + 21,6              |

Se encontraron las mismas sustancias desconocidas que en los experimentos conducidos a la temperatura ambiente, aunque en cantidades mucho menores.

### 5 3 Datos Brutos

**Tabla 6: Degradación del paclitaxel liposómico y formación de productos de degradación a pH 5,0, 5,5 y 6,0 a la temperatura ambiente (datos presentados en % de área)**

| Temperatura ambiente | Tiempo [h] | Bacatina | 10-Desacetil-Taxol |       | 7-Epi-Taxol | Desconoc. |   |   | Productos de Degradac. Totales |
|----------------------|------------|----------|--------------------|-------|-------------|-----------|---|---|--------------------------------|
|                      |            |          | Paclitaxel         | Taxol |             | 1         | 2 | 3 |                                |
| pH 5,0               | 0          | 0,34     | 96,6               | 0,59  | 2,5         | 0*        | 0 | 0 | 3,4                            |
|                      | 1          | 0,33     | 96,9               | 0,56  | 2,3         | 0*        | 0 | 0 | 3,2                            |
|                      | 3          | 0*       | 96,9               | 0,47  | 2,7         | 0*        | 0 | 0 | 3,2                            |
|                      | 6          | 0,39     | 96,7               | 0,52  | 2,4         | 0*        | 0 | 0 | 3,3                            |
|                      | 8          | 0,38     | 96,7               | 0,52  | 2,5         | 0*        | 0 | 0 | 3,4                            |
|                      | 24         | 0*       | 95,3               | 0,55  | 2,4         | 1,7       | 0 | 0 | 2,9                            |
|                      | 32         | 0,37     | 97,2               | 0*    | 2,4         | 0*        | 0 | 0 | 2,8                            |
| pH 5,5               | 0          | 0,35     | 96,7               | 0,59  | 2,3         | 0*        | 0 | 0 | 3,3                            |
|                      | 1          | 0,37     | 96,7               | 0,59  | 2,4         | 0*        | 0 | 0 | 3,3                            |
|                      | 3          | 0*       | 96,9               | 0,51  | 2,6         | 0*        | 0 | 0 | 3,1                            |
|                      | 6          | 0,41     | 96,6               | 0,61  | 2,4         | 0*        | 0 | 0 | 3,4                            |
|                      | 8          | 0,37     | 96,7               | 0,54  | 2,4         | 0*        | 0 | 0 | 3,3                            |
|                      | 24         | 0*       | 94,3               | 0,57  | 2,6         | 2,5       | 0 | 0 | 3,2                            |
|                      | 32         | 0,44     | 96,6               | 0*    | 2,9         | 0*        | 0 | 0 | 3,4                            |
| pH 6,0               | 0          | 0,29     | 96,6               | 0,62  | 2,5         | 0*        | 0 | 0 | 3,4                            |
|                      | 1          | 0,38     | 96,4               | 0,67  | 2,5         | 0*        | 0 | 0 | 3,6                            |
|                      | 3          | 0*       | 96,8               | 0,52  | 2,7         | 0*        | 0 | 0 | 3,2                            |
|                      | 6          | 0,43     | 96,4               | 0,69  | 2,5         | 0*        | 0 | 0 | 3,7                            |
|                      | 8          | 0,43     | 96,2               | 0,65  | 2,7         | 0*        | 0 | 0 | 3,8                            |
|                      | 24         | 0*       | 94,0               | 0,80  | 3,3         | 1,9       | 0 | 0 | 4,1                            |
|                      | 32         | 0,64     | 95,5               | 0*    | 3,9         | 0*        | 0 | 0 | 4,5                            |

\*\* : los picos correspondientes no pudieron evaluarse debido a interferencias con el tampón BISTRIS; el % de área de los productos de degradación totales se calculó sin el compuesto Desconocido 1, dado que muy probablemente no es un metabolito de paclitaxel.

**Tabla 7: Degradación del paclitaxel liposómico y formación de productos de degradación a pH 6,5 y 7,0 a la temperatura ambiente (datos presentados en % de área)**

| Temp. ambiente | Tiempo [h] | Bacatina | 10-Desacetil-Taxol | Paclitaxel | 7-Epi-Taxol | Desconoc. |     |      | Productos de Degradac. Totales |
|----------------|------------|----------|--------------------|------------|-------------|-----------|-----|------|--------------------------------|
|                |            |          |                    |            |             | 1         | 2   | 3    |                                |
| pH 6,5         | 0          | 0,37     | 0,64               | 96,4       | 2,5         | 0*        | 0   | 0    | 3,6                            |
|                | 1          | 0,36     | 0,72               | 96,1       | 2,8         | 0*        | 0   | 0    | 3,9                            |
|                | 3          | 0*       | 0,65               | 96,0       | 3,4         | 0*        | 0   | 0    | 4,0                            |
|                | 6          | 0,59     | 0,87               | 95,1       | 3,5         | 0*        | 0   | 0    | 4,9                            |
|                | 8          | 0,64     | 1,0                | 94,6       | 3,8         | 0*        | 0   | 0    | 5,4                            |
|                | 24         | 0*       | 1,6                | 90,1       | 6,2         | 2,1       | 0   | 0    | 7,8                            |
| 32             | 0*         | 1,8      | 88,1               | 7,6        | 2,5         | 0         | 0   | 9,4  |                                |
| Temp. ambiente | Tiempo [h] | Bacatina | 10-Desacetil-Taxol | Paclitaxel | 7-Epi-Taxol | Desconoc. |     |      | Productos de Degradac. Totales |
|                |            |          |                    |            |             | 1         | 2   | 3    |                                |
| pH 7,0         | 0          | 0,48     | 0,78               | 95,7       | 3,0         | 0*        | 0   | 0    | 4,3                            |
|                | 1          | 0,66     | 1,0                | 94,6       | 3,7         | 0*        | 0   | 0    | 5,4                            |
|                | 3          | 0*       | 1,3                | 93,1       | 5,6         | 0*        | 0   | 0    | 6,9                            |
|                | 6          | 1,3      | 2,0                | 89,1       | 7,6         | 0*        | 0   | 0    | 10,9                           |
|                | 8          | 1,5      | 2,4                | 87,1       | 9,0         | 0*        | 0   | 0    | 12,9                           |
|                | 24         | 4,0      | 4,5                | 69,7       | 16,9        | 4,0       | 1,0 | 0    | 26,4                           |
| 32             | 0*         | 4,8      | 67,1               | 20,8       | 4,8         | 1,5       | 0   | 27,1 |                                |

\*: los picos correspondientes no pudieron evaluarse debido a interferencias con el tampón BISTRIS; el % de área de los productos de degradación totales se calculó sin el compuesto Desconocido 1, dado que muy probablemente el mismo no es un metabolito de paclitaxel.

**Tabla 8: Degradación del paclitaxel liposómico y formación de productos de degradación a pH 7,5 y 8,0 a la temperatura ambiente (datos presentados en % de área)**

| Temp. ambiente, | Tiempo [h] | Bacatina | 10-Desacetil-Taxol | Paclitaxel | 7-Epi-Taxol | Desconoc. |      |      | Productos de Degradac. Totales |
|-----------------|------------|----------|--------------------|------------|-------------|-----------|------|------|--------------------------------|
|                 |            |          |                    |            |             | 1         | 2    | 3    |                                |
| pH 7,5          | 0          | 0,61     | 0,93               | 94,1       | 3,5         | 0,80      | 0    | 0    | 5,1                            |
|                 | 1          | 0,81     | 1,3                | 92,1       | 5,1         | 0,66      | 0    | 0    | 7,2                            |
|                 | 3          | 0,93     | 1,8                | 88,8       | 7,2         | 1,4       | 0    | 0    | 9,9                            |
|                 | 6          | 1,9      | 2,5                | 84,5       | 9,7         | 1,5       | 0    | 0    | 14,1                           |
|                 | 8          | 2,2      | 3,0                | 81,2       | 11,2        | 2,0       | 0,46 | 0    | 16,7                           |
|                 | 24         | 4,4      | 5,1                | 65,7       | 19,6        | 3,8       | 1,4  | 0    | 30,4                           |
|                 | 32         | 5,2      | 6,7                | 59,6       | 22,1        | 4,8       | 1,7  | 0    | 35,6                           |
| Temp. ambiente  | Tiempo [h] | Bacatina | 10-Desacetil-Taxol | Paclitaxel | 7-Epi-Taxol | Desconoc. |      |      | Productos de Degradac. Totales |
|                 |            |          |                    |            |             | 1         | 2    | 3    |                                |
| pH 8,0          | 0          | 1,2      | 1,8                | 89,4       | 6,6         | 1,1       | 0    | 0    | 9,6                            |
|                 | 1          | 2,0      | 2,9                | 83,3       | 10,7        | 1,1       | 0    | 0    | 15,6                           |
|                 | 3          | 2,6      | 4,4                | 73,0       | 16,7        | 2,2       | 1,2  | 0    | 24,9                           |
|                 | 6          | 5,4      | 6,6                | 60,8       | 21,9        | 3,6       | 1,8  | 0    | 35,6                           |
|                 | 8          | 6,3      | 7,0                | 55,1       | 24,5        | 4,8       | 2,4  | 0    | 40,2                           |
|                 | 24         | 10,5     | 10,8               | 32,5       | 29,4        | 12,1      | 4,3  | 0,43 | 55,3                           |
|                 | 32         | 11,1     | 12,8               | 27,9       | 28,4        | 15,2      | 4,7  | 0    | 56,9                           |

\*: los picos correspondientes no pudieron evaluarse debido a interferencias con el tampón BISTRIS; el % de área de los productos de degradación totales se calculó sin el compuesto Desconocido 1, dado que muy probablemente el mismo no es un metabolito de paclitaxel; el compuesto Desconocido 3 es muy probablemente un artefacto (v.g. una impureza de la preparación de las muestras).

Tabla 9: Degradación del paclitaxel liposómico y formación de productos de degradación a pH 5,0, 5,5 y 6,0 a 2-8°C (datos presentados en % de área)

| Refrigerador<br>(2-8 °C) | Tiempo [h] | Bacatina | 10-Desacetil-<br>Taxol | Paclitaxel | 7-Epi-Taxol | Desconoc. |   |   | Productos de<br>Degradac. Totales |
|--------------------------|------------|----------|------------------------|------------|-------------|-----------|---|---|-----------------------------------|
|                          |            |          |                        |            |             | 1         | 2 | 3 |                                   |
| pH 5,0                   | 0          | 0,34     | 0,59                   | 96,7       | 2,3         | 0*        | 0 | 0 | 3,3                               |
|                          | 1          | 0,35     | 0,43                   | 96,7       | 2,5         | 0*        | 0 | 0 | 3,3                               |
|                          | 3          | 0*       | 0,41                   | 96,8       | 2,8         | 0*        | 0 | 0 | 3,2                               |
|                          | 6          | 0,38     | 0,50                   | 96,7       | 2,4         | 0*        | 0 | 0 | 3,3                               |
|                          | 8          | 0*       | 0,56                   | 97,0       | 2,4         | 0*        | 0 | 0 | 3,0                               |
|                          | 24         | 0*       | 0,53                   | 95,8       | 2,4         | 1,3       | 0 | 0 | 2,9                               |
|                          | 32         | 0*       | 0,53                   | 95,0       | 2,3         | 2,1       | 0 | 0 | 2,9                               |
| pH 5,5                   | 0          | 0,31     | 0,59                   | 96,8       | 2,3         | 0*        | 0 | 0 | 3,2                               |
|                          | 1          | 0,33     | 0,43                   | 96,6       | 2,6         | 0*        | 0 | 0 | 3,4                               |
|                          | 3          | 0,38     | 0,51                   | 96,8       | 2,3         | 0*        | 0 | 0 | 3,2                               |
|                          | 6          | 0,38     | 0,55                   | 96,7       | 2,3         | 0*        | 0 | 0 | 3,3                               |
|                          | 8          | 0*       | 0,54                   | 97,0       | 2,5         | 0*        | 0 | 0 | 3,0                               |
|                          | 24         | 0*       | 0,58                   | 95,7       | 2,3         | 1,5       | 0 | 0 | 2,9                               |
|                          | 32         | 0*       | 0,57                   | 95,1       | 2,2         | 2,2       | 0 | 0 | 2,8                               |
| pH 6,0                   | 0          | 0,34     | 0,62                   | 96,7       | 2,3         | 0*        | 0 | 0 | 3,3                               |
|                          | 1          | 0,32     | 0,45                   | 96,6       | 2,6         | 0*        | 0 | 0 | 3,4                               |
|                          | 3          | 0,40     | 0,61                   | 96,7       | 2,3         | 0*        | 0 | 0 | 3,3                               |
|                          | 6          | 0,40     | 0,54                   | 96,7       | 2,4         | 0*        | 0 | 0 | 3,3                               |
|                          | 8          | 0*       | 0,56                   | 96,9       | 2,5         | 0*        | 0 | 0 | 3,1                               |
|                          | 24         | 0*       | 0,59                   | 95,8       | 2,4         | 1,2       | 0 | 0 | 3,0                               |
|                          | 32         | 0*       | 0,58                   | 95,1       | 2,5         | 1,8       | 0 | 0 | 3,1                               |

\*: los picos correspondientes no pudieron evaluarse debido a interferencias con el tampón BISTRIS; el % de área de los productos de degradación totales se calculó sin el compuesto Desconocido 1, dado que muy probablemente el mismo no es un metabolito de paclitaxel.0

**Tabla 10: Degradación del paclitaxel liposómico y formación de productos de degradación a pH 6,5 y 7,0 a 2-8°C (datos presentados en % de área)**

| Refrigerador<br>(2-8 °C) | Tiempo<br>[h] | Bacatina | 10-Desacetil-<br>Taxol | Paclitaxel | 7-Epi-Taxol | Desconoc.1 | Desconoc.2 | Desconoc.3 | Productos de<br>Degradac. Totales |
|--------------------------|---------------|----------|------------------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----------------------------------|
| pH 6,5                   | 0             | 0,40     | 0,63                   | 96,5       | 2,4         | 0*         | 0          | 0          | 3,5                               |
|                          | 1             | 0,30     | 0,51                   | 96,3       | 2,9         | 0*         | 0          | 0          | 3,7                               |
|                          | 3             | 0,43     | 0,67                   | 96,3       | 2,6         | 0*         | 0          | 0          | 3,7                               |
|                          | 6             | 0,45     | 0,60                   | 96,4       | 2,6         | 0*         | 0          | 0          | 3,6                               |
|                          | 8             | 0*       | 0,74                   | 96,3       | 3,0         | 0*         | 0          | 0          | 3,7                               |
|                          | 24            | 0*       | 0,87                   | 94,8       | 2,9         | 1,4        | 0          | 0          | 3,8                               |
|                          | 32            | 0*       | 0,86                   | 94,0       | 3,0         | 2,2        | 0          | 0          | 3,9                               |
| Refrigerador<br>(2-8 °C) | Tiempo<br>[h] | Bacatina | 10-Desacetil-<br>Taxol | Paclitaxel | 7-Epi-Taxol | Desconoc.1 | Desconoc.2 | Desconoc.3 | Productos de<br>Degradac. Totales |
| pH 7,0                   | 0             | 0,52     | 0,82                   | 95,6       | 3,1         | 0*         | 0          | 0          | 4,4                               |
|                          | 1             | 0,29     | 0,81                   | 95,5       | 3,4         | 0*         | 0          | 0          | 4,5                               |
|                          | 3             | 0,56     | 0,89                   | 95,2       | 3,4         | 0*         | 0          | 0          | 4,8                               |
|                          | 6             | 0,63     | 1,0                    | 94,9       | 3,5         | 0*         | 0          | 0          | 5,2                               |
|                          | 8             | 0*       | 1,5                    | 92,3       | 5,2         | 1,0        | 0          | 0          | 6,7                               |
|                          | 24            | 0*       | 1,9                    | 90,3       | 5,7         | 2,1        | 0          | 0          | 7,6                               |
|                          | 32            | 2,3      | 1,9                    | 87,8       | 5,7         | 2,2        | 0          | 0          | 10,0                              |

\*: los picos correspondientes no pudieron evaluarse debido a interferencias con el tampón BISTRIS; el % de área de los productos de degradación totales se calculó sin el compuesto Desconocido 10, dado que muy probablemente el mismo no es un metabolito de paclitaxel.

Tabla 11: Degradación del paclitaxel liposómico y formación de productos de degradación a pH 7,5 y 8,0 a 2-8°C (datos presentados en % de área)

| Refrigerador<br>(2-8 °C) | Tiempo [h] | Bacatina | 10-Desacetil-<br>Taxol | Paclitaxel | 7-Epi-Taxol | Desconoc.1 | Desconoc.<br>2 | Desconoc.3 | Productos de<br>Degradac. Totales |            |            |            |      |      |      |      |   |      |
|--------------------------|------------|----------|------------------------|------------|-------------|------------|----------------|------------|-----------------------------------|------------|------------|------------|------|------|------|------|---|------|
|                          |            |          |                        |            |             |            |                |            |                                   | Desconoc.1 | Desconoc.2 | Desconoc.3 |      |      |      |      |   |      |
| pH 7,5                   | 0          | 0,63     | 0,93                   | 93,9       | 3,8         | 0,75       | 0              | 0          | 5,3                               |            |            |            |      |      |      |      |   |      |
|                          | 1          | 0,62     | 1,1                    | 93,0       | 4,3         | 1,0        | 0              | 0          | 5,9                               |            |            |            |      |      |      |      |   |      |
|                          | 3          | 0,94     | 1,3                    | 91,9       | 4,6         | 1,2        | 0              | 0          | 6,9                               |            |            |            |      |      |      |      |   |      |
|                          | 6          | 1,1      | 1,5                    | 91,2       | 4,7         | 1,5        | 0              | 0          | 7,3                               |            |            |            |      |      |      |      |   |      |
|                          | 8          | 1,4      | 2,1                    | 88,0       | 6,8         | 1,7        | 0              | 0          | 10,3                              |            |            |            |      |      |      |      |   |      |
|                          | 24         | 1,8      | 2,8                    | 85,8       | 7,7         | 1,9        | 0              | 0          | 12,4                              |            |            |            |      |      |      |      |   |      |
|                          | 32         | 2,0      | 3,0                    | 85,1       | 7,8         | 2,1        | 0              | 0          | 12,8                              |            |            |            |      |      |      |      |   |      |
| Refrigerador<br>(2-8 °C) | Tiempo [h] | Bacatina | 10-Desacetil-<br>Taxol | Paclitaxel | 7-Epi-Taxol | Desconoc.1 | Desconoc.<br>2 | Desconoc.3 | Productos de<br>Degradac. Totales |            |            |            |      |      |      |      |   |      |
|                          |            |          |                        |            |             |            |                |            |                                   | 0          | 1,3        | 1,9        | 89,0 | 7,1  | 0,80 | 0    | 0 | 10,2 |
|                          |            |          |                        |            |             |            |                |            |                                   | 1          | 1,3        | 2,3        | 87,2 | 8,3  | 0,98 | 0    | 0 | 11,8 |
|                          |            |          |                        |            |             |            |                |            |                                   | 3          | 2,1        | 2,9        | 84,5 | 9,1  | 1,4  | 0    | 0 | 14,1 |
|                          |            |          |                        |            |             |            |                |            |                                   | 6          | 2,5        | 3,5        | 82,3 | 9,7  | 1,7  | 0,35 | 0 | 16,0 |
|                          |            |          |                        |            |             |            |                |            |                                   | 8          | 3,8        | 4,8        | 72,6 | 15,2 | 2,4  | 1,1  | 0 | 25,0 |
|                          |            |          |                        |            |             |            |                |            |                                   | 24         | 5,1        | 6,7        | 66,3 | 17,2 | 3,3  | 1,4  | 0 | 30,4 |
| 32                       | 5,5        | 7,6      | 63,9                   | 17,1       | 4,3         | 1,6        | 0              | 31,8       |                                   |            |            |            |      |      |      |      |   |      |

\*: los picos correspondientes no pudieron evaluarse debido a interferencias con el tampón BISTRIS; el % de área de los productos de degradación totales se calculó sin el compuesto Desconocido 1, dado que muy probablemente el mismo no es un metabolito de paclitaxel.

### 3. Ejemplo 3: Aumento de la estabilidad durante el uso del Paclitaxel cargado en liposomas catiónicos

Con objeto de investigar la estabilidad del paclitaxel cargado en liposomas catiónicos en diferentes condiciones de pH, se añaden durante la preparación varios aditivos, preferiblemente aditivos que constituyen un pH ácido. De este modo se examina la epimerización en C-7 y la formación de 7-epi-taxol. Estos compuestos pueden tomarse del grupo de ácidos inorgánicos y orgánicos. Ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico (HCl), ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido carbónico u otros ácidos utilizados comúnmente. Ejemplos de ácidos orgánicos son de la fórmula general para ácidos monobásicos  $R-CO_2H$  con  $R=CH_3-(CH_2)_n$ ;  $C_6H_5-(CH_2)_n$  y  $n = 0-6$ , por ejemplo ácido acético o ácido benzoico. Adicionalmente, se pueden emplear ácidos dibásicos de la fórmula general  $HO_2C-(CH_2)_n-CO_2H$ , con  $n = 0-6$  tales como ácido succínico, ácido adípico, o derivados insaturados, tales como ácido maleico o ácido fumárico, o ácidos aromáticos tales como ácido ftálico. Son también aditivos preferidos los ácidos hidroxí-carboxílicos tales como ácido cítrico, ácido láctico y ácido tartárico.

#### Preparación:

Una preparación de liposomas que comprende DOTAP/DOPC/paclitaxel 50/47/3 10 mM se prepara por el método de la inyección de etanol como se ha descrito anteriormente. La solución acuosa comprende 10% de trehalosa (p/v),  $p = 5,5$ . La solución de trehalosa puede ajustarse a pH 4,5 por adición de ácido clorhídrico, ácido cítrico, o ácido láctico. Después de la inyección etanólica de una solución que contiene a la vez lípido y compuesto activo, la solución resultante se extrude a 4°C y se liofiliza como se ha descrito anteriormente. El liofilizado se analiza por PCS en cuanto a la distribución de tamaños de sus liposomas y por HPLC en cuanto a su contenido de paclitaxel y 7-epi-taxol. La estabilidad durante el uso de los liofilizados se establece como sigue: el liofilizado (preparado como se ha descrito anteriormente) se reconstituye con agua de calidad MilliQ y se deja durante 24 horas a la temperatura ambiente o a 4°C antes de su examen. Se realizan análisis tanto PCS como HPLC.

Se ha preparado otra preparación de liposomas a la temperatura ambiente como se ha descrito arriba con ácido cítrico y ácido láctico como aditivos para la solución acuosa de trehalosa. Sin liofilización, estas formulaciones se caracterizaban por su tamaño y distribución de tamaños de los liposomas (PCS) y por la concentración de fármaco y contenido de 7-epitaxol (% área, HPLC).

#### Resultado:

Cuando los liposomas se preparan a 4°C, se liofilizan y se guardan en el frigorífico, no se observa formación de 7-epi-taxol después de reconstitución como se muestra por los datos de la Tabla 12. La estabilidad durante el uso (24 h, temperatura ambiente) de los liofilizados reconstituidos depende, sin embargo, de la presencia y volatilidad de los aditivos empleados, como se muestra en la Tabla 13. Cuando no se utiliza aditivo alguno, se encuentra 6% de 7-epi-taxol. Esta cantidad se reduce ligeramente por el uso de ácido clorhídrico volátil. Después de 24 h a la temperatura ambiente, se encuentra poco o nada de 7-epi-taxol empleando ácidos orgánicos sólidos no volátiles, tales como ácido cítrico o ácido láctico (Tabla 13). Pueden prepararse formulaciones de liposomas de paclitaxel a 25°C como se muestra en la Tabla 14, en la que no se observó degradación alguna del paclitaxel incluso después de almacenamiento de 24 h a 25°C. El análisis HPLC después de 120 h de almacenamiento ulterior a 25°C no mostró cantidad alguna de 7-epi-taxol (datos no presentados).

**Tabla 12: Liposomas catiónicos cargados con paclitaxel, preparados a 4°C**

| Preparación                 | pH  | Z <sub>media</sub> [nm] | Valor PI | Paclitaxel [%] | 7-Epi-taxol [%] |
|-----------------------------|-----|-------------------------|----------|----------------|-----------------|
| 10% trehalosa               | 5,5 | 166                     | 0,20     | 100            | 0               |
| 10% trehalosa/HCl           | 4,5 | 164                     | 0,17     | 100            | 0               |
| 10% trehalosa/ácido cítrico | 4,5 | 171                     | 0,182    | 100            | 0               |
| 10% trehalosa/ácido láctico | 4,5 | 170                     | 0,17     | 100            | 0               |

**Tabla 13: Estabilidad durante el uso (24 h) de los liposomas catiónicos cargados con paclitaxel preparados a 4°C**

| Preparación       | pH  | Z <sub>media</sub> [nm] | Valor PI [nm] | Paclitaxel [%] | 7-Epi-taxol [%] |
|-------------------|-----|-------------------------|---------------|----------------|-----------------|
| 10% trehalosa     | 5,5 | 152                     | 0,17          | 93,8           | 6,2             |
| 10% trehalosa/HCl | 4,5 | 154                     | 0,17          | 95,7           | 4,3             |

|                              |     |     |      |      |     |
|------------------------------|-----|-----|------|------|-----|
| 10% trehalosa/ ácido cítrico | 4,5 | 159 | 0,16 | 98,7 | 1,3 |
| 10% trehalosa/ ácido láctico | 4,5 | 148 | 0,21 | 100  | 0   |

**Tabla 14: Estabilidad durante el uso (24 h, sin liofilización) de los liposomas catiónicos cargados con paclitaxel preparados a 25°C**

| Preparación                 | pH  | Z <sub>media</sub> [nm] | Valor PI | Paclitaxel [%] | 7-Epi-taxol [%] |
|-----------------------------|-----|-------------------------|----------|----------------|-----------------|
| 10% trehalosa/ácido cítrico | 4,5 | 163,2                   | 0,142    | 100            | 0               |
| 10% trehalosa/ácido láctico | 4,5 | 158,4                   | 0,188    | 100            | 0               |

#### 5 4. Ejemplo 4: Preparación de liposomas catiónicos cargados con docetaxel

##### 4.1 Preparación de los liposomas por el método de película lipídica

Se prepararon formulaciones de liposomas que comprendían docetaxel utilizando el método de película de lípido como sigue: se disuelven los lípidos de elección y el docetaxel en cloroformo en un matraz de fondo redondo. El matraz se mantiene luego en rotación a vacío (100 a 200 mbar, 40°C) hasta que se forma una película delgada de lípidos. La película lipídica se seca concienzudamente a 40°C a vacío total (3 a 5 mbar) durante aproximadamente 30 minutos. La película lipídica seca se enfría en un baño de hielo y se rehidrata con una solución fría (4°C) de glucosa o trehalosa (pH 5-7) dando como resultado una suspensión de vesículas lipídicas multilaminares en una concentración total de aproximadamente 10 a 20 mM. Una vez que se forma una dispersión homogénea (después de 15-20 min de rotación) la dispersión de liposomas se extrude (filtración a presión) preferiblemente a una temperatura entre 4°C y 8°C, 1-5 veces a través de membranas de policarbonato de tamaño apropiado, típicamente entre 150 y 250 nm, seguido opcionalmente por filtración estéril. Se encontró que la baja temperatura durante la fabricación era crítica debido a la estabilidad química incrementada del docetaxel y los lípidos y debido al descubrimiento de que puede alcanzarse una ratio mayor de compuesto activo a lípido (contenido mayor de docetaxel). La dispersión de liposomas formada se caracteriza plenamente por análisis HPLC, PCS y microscópico.

##### 20 4.2 Preparación de Liposomas por Inyección de Etanol

Se prepararon también formulaciones de liposomas que comprendían docetaxel utilizando el método de inyección de etanol como sigue: se disolvieron docetaxel y lípidos en etanol (u otro disolvente orgánico adecuado) usualmente con una concentración total de lípidos de aproximadamente 200-400 mM. Se preparó a pH 5-7 una solución acuosa de un crioprotector, preferiblemente trehalosa al 10% y se enfrió a una temperatura entre 4 y 8°C antes de la inyección del disolvente orgánico. La solución etanólica se inyectó (velocidad de inyección 3-300 ml/min) en la solución de trehalosa fría agitada enérgicamente, alcanzándose una concentración total final de lípidos de 10 mM. Una vez que se forma una dispersión homogénea, se extrude 1-5 veces la dispersión de liposomas (filtración a presión) preferiblemente a una temperatura comprendida entre 4°C y 8°C, a través de membranas de policarbonato de tamaño apropiado, típicamente entre 150 y 250 nm, seguido opcionalmente por filtración estéril. Se encontró que la temperatura baja durante la fabricación es crítica debido a la estabilidad química incrementada del docetaxel y los lípidos y debido al descubrimiento de que puede alcanzarse una mayor ratio de compuesto activo a lípido (contenido mayor de docetaxel). La dispersión de liposomas formada se caracteriza plenamente por análisis HPLC, PCS y microscópico.

##### 30 4.3 Variación del Contenido de Docetaxel

35 Se forman liposomas (concentración total de lípidos 10 mM, 10% trehalosa) que comprenden DOTAP y DOPC, con contenidos diferentes de docetaxel. La composición general se define como 50% en moles de DOTAP, (50-X)% en moles de DOPC y X% en moles de docetaxel, variando el contenido de docetaxel de 3 a 13% en moles. La Tabla 15 enumera formulaciones liposómicas de docetaxel y sus características típicas, tales como tamaño medio de los liposomas, distribución de tamaños (PI), concentración de compuesto activo y de lípidos (HPLC), existencia de docetaxel extraliposómico (cristales de docetaxel) y su carga superficial.

Tabla 15: Formulaciones liposómicas de docetaxel

| Contenido de docetaxel | Tamaño de los liposomas (PI) | HPLC, Microscopía                                      | Potencial Zeta |
|------------------------|------------------------------|--|----------------|
| 3% en moles            | 175 nm (0,20)                | De acuerdo con las expectativas, ausencia de cristales | 65 mV          |
| 5% en moles            | 168 nm (0,20)                | De acuerdo con las expectativas, ausencia de cristales | 64 mV          |
| 7% en moles            | 162 nm (0,24)                | De acuerdo con las expectativas, ausencia de cristales | 60 mV          |
| 9% en moles            | 166 nm (0,18)                | De acuerdo con las expectativas, ausencia de cristales | 65 mV          |
| 11% en moles           | 162 nm (0,20)                | De acuerdo con las expectativas, ausencia de cristales | 62 mV          |
| 13% en moles           | 162 nm (0,14)                | De acuerdo con las expectativas, ausencia de cristales | 65 mV          |

5 Empleado el método de película de lípido y el sistema DOTAP/DOPC, pueden prepararse liposomas que contienen hasta aproximadamente 13% en moles de docetaxel. Es notable, que puede cargarse un mayor contenido de docetaxel en la membrana liposómica cuando la fabricación tiene lugar a bajas temperaturas (4°-8°C) comparadas con temperaturas más altas (temperatura ambiente, 40°C). El diámetro medio de los liposomas que contienen docetaxel está comprendido entre 160 y 170 nm, y el bajo valor PI de ≤0,2 indica una distribución favorable de tamaños pequeños. Las concentraciones determinadas (HPLC) están de acuerdo con los valores teóricos. De acuerdo con el análisis HPLC, docetaxel, DOTAP y DOPC eran químicamente estables durante el proceso de fabricación a 4°C. Una temperatura superior a 10°C durante la fabricación dio como resultado la formación de producto de degradación de docetaxel como se observa en los cromatogramas HPLC. Todas las formulaciones se comprobaron por microscopía (aumento de 10 veces) respecto a agregados/cristales. Dado que docetaxel es sólo ligeramente soluble en trehalosa o agua (~20 µM), la presencia de cristales podría indicar una fracción importante de docetaxel que no está embebida (solubilizada) en la membrana liposómica. Ninguna de las formulaciones investigadas dio resultado positivo para cristales de docetaxel. El potencial zeta (60-65 mV, Zetasizer 3000, Malvern) no cambiaba con el contenido diferente de docetaxel.

#### 4.4 Liofilización de Liposomas que contienen Docetaxel

20 La liofilización de liposomas que contienen docetaxel se ha realizado con éxito aplicando un procedimiento como el descrito anteriormente. Como se muestra en la Tabla 16, el tamaño de los liposomas no cambia, en tanto que el valor PI (distribución de tamaños) del liofilizado reconstituido respectivo se reduce ligeramente comparado con los de la formulación no liofilizada.

Tabla 16: Efecto de la Liofilización sobre el Tamaño de los Liposomas y el valor PI

| Contenido de Docetaxel | Tamaño de los Liposomas (PI) |                             |
|------------------------|------------------------------|-----------------------------|
|                        | Antes de la Liofilización    | Después de la Liofilización |
| 3 mol%                 | 175 nm (0,20)                | 171 nm (0,10)               |
| 5 mol%                 | 168 nm (0,20)                | 162 nm (0,08)               |
| 7 mol%                 | 162 nm (0,24)                | 166 nm (0,09)               |
| 9 mol%                 | 166 nm (0,18)                | 160 nm (0,08)               |
| 11 mol%                | 162 nm (0,20)                | 156 nm (0,09)               |
| 13 mol%                | 162 nm (0,14)                | 158 nm (0,07)               |

La liofilización no tiene influencia negativa alguna sobre la estabilidad de los liposomas. Como se comprueba por HPLC, los lípidos y el docetaxel se mantienen químicamente estables.

#### 4.5 Determinación de Docetaxel no Liposómico

5 Se realizaron experimentos de centrifugación para determinar si existe cualquier cantidad de docetaxel libre, no liposómico en las formulaciones de liposomas de docetaxel. Este experimento se llevó a cabo con tubos Centricon® (tubos de centrifugación con una membrana semipermeable que permite el paso de las moléculas pequeñas y retiene las macromoléculas). Formulaciones liposómicas (10 mM, 10% trehalosa) basadas en DOTAP y DOPC con 7, 11 y 13% en moles de docetaxel se centrifugaron a 4500 g y a 4°C con tubos Centricon® (especificación de membrana de 30.000 MWCO). Después de 30 min de centrifugación, el sobrenadante se diluyó con trehalosa cuyo volumen se había encontrado como permeabilizado. Los análisis HPLC se resumen en la Tabla 17.

**Tabla 17: Determinación de Docetaxel no liposómico (HPLC)**

| Contenido de Docetaxel | Sobrenadante | Permeabilizado | Fracción no liposómica |
|------------------------|--------------|----------------|------------------------|
| 7 % en moles           | 0,719 mM     | 0,026 mM       | 4 %                    |
| 11 % en moles          | 1,040 mM     | 0,038 mM       | 3 %                    |
| 13 % en moles          | 1,305 mM     | 0,059 mM       | 4 %                    |

Los resultados muestran que el docetaxel puede incorporarse en la membrana liposómica a una concentración de al menos 13% en moles sin aumentar la fracción de docetaxel no liposómico.

#### 15 4.6 Estabilidad Fisicoquímica de las Formulaciones de Docetaxel

Se ha utilizado una formulación liposómica que contiene 5% en moles de docetaxel para estudiar la estabilidad fisicoquímica. Un primer experimento reveló que el contenido de docetaxel en la formulación no tiene influencia alguna sobre la estabilidad. Tampoco se ha encontrado diferencia alguna para la formulación líquida (no liofilizada) y la liofilizada. La estabilidad al almacenamiento a 4°C, 25°C y 40°C se ha caracterizado por PCS (tamaño y distribución de tamaños de los liposomas), medidas de obstrucción de la luz (dispositivo PAMAS), microscopía y HPLC. La estabilidad física se muestra en Fig. 3. A todas las temperaturas, el tamaño y la distribución de tamaños de los liposomas no cambiaban en el transcurso de 24 h.

En principio, un número de partículas incrementado en la formulación tal como se mide por medidas de obstrucción de la luz (dispositivo PAMAS) indica una deficiente estabilidad física debido a la agregación progresiva de los liposomas que da como resultado agregados de mayor tamaño (mayores que 1 µm). Utilizando una disposición experimental adecuada, no se ha encontrado dicho aumento. Fig. 4 muestra los números de partículas que se han encontrado durante el almacenamiento a 25°C. El recuento de partículas después de 24 h está dentro del mismo intervalo comparado con el valor a las 8 h.

El análisis HPLC de la formulación en momentos diferentes revelaba claramente una estabilidad química satisfactoria a 4°C. A 40°C, se ha observado un aumento de la degradación de hasta 20% después de almacenamiento durante 24 h.

#### 4.7 Experimentos in Vitro

La eficacia de la formulación liposómica de docetaxel se determina *in vitro* por análisis de la disminución de la viabilidad de las células en correlación con la concentración de compuesto activo. La concentración de compuesto activo para la cual la viabilidad de las células se inhibe hasta 50% (CI<sub>50</sub>) se utiliza como índice para el potencial de inhibición.

Se siembran células C-26 (línea de células de carcinoma de colon murino) y Ea.Hy 926 (línea de células endoteliales humanas transformadas) a una densidad constante ( $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) en placas de 24 pocillos y se cultivan durante una noche en condiciones de 5-5,5% de CO<sub>2</sub>, 37°C y ~90% humedad. El día 1, se reemplaza el medio de cultivo de las células por una mezcla de medio nuevo y se añaden a cada pocillo una serie de 11 diluciones consecutivas del compuesto activo (por duplicado) para cubrir un intervalo entre 0,1 y 1000 nM de concentración final del compuesto activo. Después de 72 h, se determina la viabilidad de las células en cada pocillo por medida de la actividad de deshidrogenasas mitocondriales (ensayo MTT). En las células viables, el sustrato MTT se convierte en un tinte azul impermeable a las células (Formazano). Después de 1 h, se retira el medio, se lisan las células con isopropanol/0,04% HCl y se cuantifica la cantidad del formazano azul expresada como densidad óptica a una longitud de onda de 550 nm (DO<sub>550nm</sub>) en un lector ELISA. El experimento se evalúa utilizando el software de análisis Sigma Plot por representación gráfica del valor medio de DO<sub>550nm</sub> contra la concentración respectiva de compuesto

activo. Se calcula una curva de ajuste óptimo basada en un algoritmo supuesto doble-sigmoide y se determina el valor  $CI_{50}$  de acuerdo con esta curva de ajuste óptimo, obteniéndose los resultados que se presentan en la Tabla 18.

**Tabla 18: Valores  $CI_{50}$  de liposomas cargados con Taxotere y docetaxel**

| Formulación                         | $CI_{50}$ (C-26) | $CI_{50}$ (EA.hy 926) |
|-------------------------------------|------------------|-----------------------|
| Taxotere®                           | 5 nM             | 4 nM                  |
| Formulación liposómica de docetaxel | 4 nM             | 7 nM                  |

- 5 Los valores  $CI_{50}$  revelan claramente una eficacia igual del docetaxel formulado con Polisorbato 80 (Taxotere®, Aventis) y la formulación liposómica de docetaxel (composición: DOTAP/DOPC/docetaxel 50:39:11) en ambas líneas de células, C-26 y EA.hy 926.

#### 4.8 Experimentos in Vivo (melanoma A-375 de ratones lampiños)

##### Materiales y métodos:

- 10 Se adquirieron ratones lampiños NMRI de Elevage Janvier y se alojaron en jaulas aisladas ventiladas en condiciones ambientales seguras (instalación SPF, 22°C, 30-70% de humedad, ciclo de 12 horas luz/oscuridad) con comida y agua *ad libitum*. El diseño experimental fue revisado y aprobado por el gobierno local.

- 15 Se cultivaron células tumorales (líneas de células de melanoma humano A-375, ATCC No.: CRL-1619) como se describe en la hoja de datos suministrada por ATCC. Las células tumorales ( $5 \times 10^6$  en PBS) se inocularon por vía subcutánea en el ijar dorsal derecho de los ratones en un volumen de 50  $\mu$ l el día 0.

- 20 Se asignaron los ratones a los grupos experimentales (8 animales por jaula), se alojaron y se manipularon (con inclusión de la monitorización del aumento de peso corporal) al menos cinco días antes de la inoculación del tumor (= día -6 a 0). El tratamiento comienza después que los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>. Se administraron los fármacos y las preparaciones de liposomas por cinco inyecciones i.v. en días alternos a dosis equivalentes. Las preparaciones liposómicas se prepararon como se ha descrito previamente. Las soluciones se administraron lentamente en un volumen de ~5  $\mu$ l/g de peso corporal.

- 25 Los animales se monitorizaron clínicamente durante todo el experimento y durante al menos una semana después del final del tratamiento. La monitorización del tamaño de los tumores se realizó tres veces por semana después de la estadificación y antes de la aplicación durante el periodo de tratamiento (al menos una semana). Las dimensiones de los tumores se midieron con un calibre y se calculó el tamaño del tumor de acuerdo con la fórmula siguiente:  $V = \pi LW^2/6$  (L = longitud máxima, W = anchura del eje perpendicular). El peso corporal de los animales individuales se monitorizó al menos dos veces durante el periodo de manipulación (v.g. día -6 y 0), después de la inoculación del tumor y después del comienzo del tratamiento para todos los grupos. Se recogió EDTA-sangre del plexo retrobulbar en cuatro momentos diferentes: durante la manipulación (día -3), la estadificación (día 14) y a mitad del tratamiento (día 19) de cuatro animales de todos los grupos de tratamiento para hematología. Se determinó el número de glóbulos rojos y blancos y de plaquetas utilizando un contador automático de células (Abbott Cell Dyn 3500). Los resultados se muestran en Fig. 5.

- 35 Mientras que los tumores en el grupo de control acusaban un crecimiento rápido y progresivo del tumor, LipoDoc™ (DOTAP:DOPC:docetaxel 50:39:11) presentaba una fuerte reducción en la tasa de crecimiento del tumor; Taxotere® reducía el crecimiento del tumor sólo en un grado limitado.

**Tabla 19: Grupos experimentales y dosis**

| Grupo | Formulación   | Dosis [mg/kg] | No. de ratones |
|-------|---------------|---------------|----------------|
| 0     | 10% trehalosa | -             | 8              |
| 1     | LipoDoc™      | 5             | 8              |
| 2     | Taxotere®     | 5             | 8              |

#### 5. Ejemplo 5: Paclitaxel Liposómico (5% en moles)

##### 5.1 Preparación de Liposomas por Inyección de Etanol

Se preparó una formulación de liposomas que comprendía 5% en moles de paclitaxel utilizando el método de inyección de etanol como sigue: se disolvieron paclitaxel y lípidos de una ratio molar de 50:45:5 DOTAP/DOPC/paclitaxel en etanol (u otro disolvente orgánico adecuado) usualmente a una concentración total de lípidos de aproximadamente 200-400 mM. Se preparó una solución acuosa de un crioprotector, preferiblemente trehalosa al 10%, pH 5-7, y se enfrió a una temperatura comprendida entre 4 y 8°C, preferiblemente 4°C, antes de la inyección del disolvente orgánico. La solución etanólica se inyectó (velocidad de inyección 3-300 ml/min) en la dispersión de liposomas (filtración a presión) preferiblemente a temperaturas comprendidas entre 4°C y 8°C, con preferencia 4°C, 1-5 veces a través de membranas de policarbonato de tamaño apropiado, típicamente entre 150 y 250 nm, seguido opcionalmente por filtración estéril. Además de la temperatura de fabricación de aproximadamente 4°C, se evaluaron temperaturas de 25°C y 40°C respecto a su efecto sobre la calidad del producto. Las dispersiones de liposomas formadas se caracterizaron plenamente por análisis HPLC, PCS y microscópico.

## 5.2 Efecto de la Temperatura sobre el Proceso de Preparación

El control del proceso durante el procedimiento de preparación se realizó después de inyección de etanol, después de la extrusión y después de la liofilización.

Después de la inyección de etanol: A las tres temperaturas, la inyección de etanol dio como resultado liposomas con un tamaño de liposoma de aproximadamente 220 nm y una distribución amplia de tamaños (PI) de aproximadamente 0,4-0,6 (de acuerdo con las medidas PSC). El análisis HPLC reveló la degradación del paclitaxel cuando se formulaba a 40°C, mientras que a 4 y 25°C, se ha comprobado la estabilidad química de cada constituyente. La microscopía mostró una pequeña cantidad de cristales de paclitaxel a 40°C, pero no a 4 y 25°C.

Después de la extrusión: A 40°C se presentaron dificultades durante la extrusión debido a obstrucción de las membranas. El reemplazamiento de la membrana obstruida no resolvió el problema. La microscopía de la solución de liposomas que no pasaba a través de la membrana reveló una cantidad incrementada de cristales de paclitaxel no liposómicos que bloqueaban obviamente la membrana. La extrusión a 40°C no fue factible. Esto no sucedió cuando la extrusión se realizó a temperaturas inferiores. En tal caso, el análisis HPLC dio una concentración de acuerdo con las expectativas sin pérdida alguna de material por el procedimiento de extrusión (5 veces, membrana de 0,2 µm). Los datos PCS después de la extrusión a 4 y 25°C eran comparables: tamaño de los liposomas de aproximadamente 170 nm y una distribución pequeña de tamaños (PI) de aproximadamente 0,1-0,2.

Después de la liofilización: La liofilización de la formulación preparada a 4°C y 25°C se ha realizado con éxito utilizando un procedimiento descrito en el ejemplo y caracterizado por HPLC, PCS y análisis microscópico.

## 5.3 Experimentos in Vivo

### 5.3.1 Eficacia terapéutica de LipoPac™ en el melanoma A-375 de ratones lampiños

#### Materiales y métodos:

Se adquirieron ratones lampiños NMRI de Elevage Janvier y se alojaron en jaulas aisladas y ventiladas en condiciones ambientales seguras (instalación SPF, 22°C, humedad 30-70%, ciclo luz/oscuridad de 12 horas) con comida y agua *ad libitum*. El diseño experimental fue revisado y aprobado por el gobierno local.

Células tumorales (línea de células de melanoma humano A-375, ATCC No.: CRL-1619) se dejaron crecer como se describe en la hoja de datos suministrada por ATCC. Las células tumorales ( $5 \times 10^6$  en PBS) se inocularon por vía subcutánea en el ijar dorsal derecho de los ratones en un volumen de 50 µl el día 0.

Se asignaron los ratones a los grupos experimentales (8 animales por jaula), se alojaron y se manipularon (con inclusión de la monitorización del aumento de peso corporal) al menos cinco días antes de la inoculación del tumor (= día -6 a 0). El tratamiento comienza después que los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>. Se administraron los fármacos y las preparaciones de liposomas por inyección i.v., tres veces por semana (lunes, miércoles, viernes) durante las tres semanas siguientes a dosis equivalentes. Las preparaciones de liposomas se prepararon como se ha descrito arriba. Las soluciones se administraron lentamente en un volumen de ~10 µl/g de peso corporal.

Los animales se monitorizaron clínicamente durante todo el experimento y durante al menos una semana después de acabado el tratamiento. La monitorización del tamaño de los tumores se realizó tres veces por semana después de la estadificación, antes de la aplicación durante el pretratamiento y durante el periodo de recuperación (al menos una semana). Las dimensiones de los tumores se midieron por medio de un calibre y se calculó el tamaño de los tumores de acuerdo con la fórmula siguiente:  $V = \pi LW^2/6$  (L = longitud máxima, W = anchura del eje perpendicular). El peso corporal de los animales individuales se monitorizó al menos dos veces durante el periodo de manipulación (v.g. día -6 y 0), después de la inoculación del tumor, después del comienzo del tratamiento y durante el periodo de recuperación (al menos una semana) para todos los grupos. Se recogió EDTA-sangre del plexo retrobulbar en cuatro momentos diferentes: durante la manipulación (día -3), la estadificación del tumor (día 7), a la mitad del tratamiento (~día 21), y al final del periodo de recuperación (día 28) de 4 animales de todos los grupos de

tratamiento para hematología. Se determinó el número de glóbulos rojos y blancos y plaquetas utilizando un contador automático de células (Abbott Cell Dyn 3500).

En tanto que los tumores en el grupo de control acusaban un crecimiento rápido y progresivo del tumor, LipoPac™ (DOTAP:DOPC:paclitaxel 50:45:5) presentaba una reducción fuerte en la tasa de crecimiento del tumor; Taxol® reducía el crecimiento del tumor sólo en una proporción limitada (Tabla 20, Fig. 6).

**Tabla 20: Grupos experimentales y dosis**

| Grupo | Formulación      | Dosis [mg/kg] | No. de ratones |
|-------|------------------|---------------|----------------|
| 0     | Trehalosa al 10% | -             | 8              |
| 1     | LipoPac™         | 5             | 8              |
| 2     | Taxol®           | 5             | 8              |

**5.3.2 Eficacia terapéutica de LipoPac™ en el melanoma B-16 de los ratones C57/BL6**

Materiales y Métodos

10 Se adquirieron ratones C57/Black6 de Charles River y se alojaron en jaulas aisladas y ventiladas en condiciones ambientales seguras (instalación SPF, 22°C, 30-70% de humedad, ciclo luz/oscuridad de 12 horas) con comida y agua *ad libitum*. El diseño experimental fue revisado y aprobado por el gobierno local.

15 Se cultivaron células tumorales (línea de células de melanoma humano B-16: CRL-6322) como se describe en la hoja de datos suministrada por ATCC. Las células tumorales ( $5 \times 10^6$  en PBS) se inocularon por vía subcutánea en el ijar dorsal derecho de los ratones en un volumen de 50 µl el día 0.

El tratamiento comenzó el día 6 después de la inyección del tumor. Tres inyecciones por semana hasta el final del experimento. Se planificó que el final del estudio estaría determinado por el tamaño del tumor de los animales y consideraciones éticas.

20 Se asignaron los ratones a los grupos experimentales (8 animales por jaula), se alojaron y se manipularon (con inclusión de la monitorización del aumento de peso corporal) al menos cinco días antes de la inoculación del tumor (= día -6 a 0). Las preparaciones de liposomas se prepararon como se ha descrito arriba. Las soluciones se administraron lentamente en un volumen de ~10 µl/g de peso corporal.

25 Los animales se monitorizaron clínicamente durante todo el experimento. La monitorización del tamaño de los tumores se realizó tres veces por semana después de estadificación y antes de la aplicación durante el periodo de tratamiento. Las dimensiones de los tumores se midieron mediante un calibre y se calculó el tamaño de los tumores de acuerdo con la fórmula siguiente:  $V = \pi LW^2/6$  (L = longitud máxima, W = anchura del eje perpendicular). El peso corporal de los animales individuales se monitorizó al menos dos veces durante el periodo de manipulación (v.g. días -6 y 0), después de la inoculación del tumor y después del comienzo del tratamiento para todos los grupos. Se recogió EDTA-sangre del plexo retrobulbar en cuatro momentos diferentes: durante la manipulación (día -3), la estadificación del tumor (día 6) y a la mitad del tratamiento (~día 14) de cuatro animales de todos los grupos de tratamiento para hematología. Se determinó el número de glóbulos rojos y blancos y plaquetas utilizando un contador automático de células (Abbott Cell Dyn 3500).

35 Mientras que los tumores en el grupo de control acusaban un crecimiento rápido y progresivo del tumor, LipoPac™ (DOTAP:DOPC:paclitaxel 50:45:5) presentaba una fuerte reducción en la tasa de crecimiento del tumor, y Taxol® reducía el crecimiento del tumor sólo en una proporción limitada (Tabla 21, Fig. 7).

**Tabla 21: Grupos experimentales y dosis**

| Grupo | Formulación      | Dosis [mg/kg] | No. de ratones |
|-------|------------------|---------------|----------------|
| 0     | Trehalosa al 10% | /             | 8              |
| 1     | LipoPac™         | 5             | 8              |
| 2     | Taxol®           | 5             | 8              |

**6. Ejemplo 6: Preparación de Liposomas que Comprenden Lípidos Catiónicos y Camptotecina Lipófila o Derivados de Camptotecina**

Se describe la preparación de liposomas que comprenden lípidos catiónicos y camptotecina (CPT) lipófila o derivados de camptotecina en el intervalo de pH entre 3-7. La CPT se carga en el liposoma. Los liposomas se pueden preparar mediante diferentes métodos. Todas las técnicas tienen en común el hecho de que se proporciona una mezcla de lípidos más compuesto activo en un disolvente orgánico adecuado, y entonces se dispersa en un medio acuoso. Subsiguientemente, tras el procesamiento, como extrusión, se puede aplicar filtración estéril o liofilización. La relación de compuesto activo/lípido se ajusta mezclando cantidades adecuadas de lípido y compuesto activo en un disolvente orgánico. Las relaciones molares típicas de compuesto activo/lípido oscilan de 1:1000 a 1,10.

Subsiguientemente, se describen dos métodos para detallar mejor las preparaciones con camptotecina. Los métodos descritos se pueden aplicar a cualquier derivado de CPT, que es lipófilo al pH deseado.

## 6.1 Formación de Liposomas

### 6.1.1 Método de Película

El disolvente se evapora de la solución orgánica que comprende lípido más compuesto activo, y se forma una película delgada más compuesto activo en la pared interna de un matraz. La película molecular delgada se resuspende en una fase acuosa, que puede contener otros componentes tales como tampones, iones, crioprotectores, y similares. Con este procedimiento, se forman suspensiones liposómicas en un procedimiento de autoensamblaje. Una preparación estándar se obtiene formando una película de 99,5  $\mu\text{M}$  de DOTAP y 0,5  $\mu\text{M}$  de camptotecina en una solución en  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (10:1). La película se reconstituye entonces con 10 ml de la fase acuosa, a fin de lograr una suspensión en la que la concentración liposómica total (lípido + compuesto activo) es 10 mM. La solución acuosa comprende un crioprotector, por ejemplo glucosa o trehalosa, y (opcionalmente) un tampón, para lograr un pH deseado tras la reconstitución. Para camptotecina en forma de lactona, se usa un pH de 5-6. Para otras formulaciones y derivados de CPT, el pH puede variar en el intervalo entre 3 y 7.

Se obtiene una preparación liposómica con una relación de compuesto activo/lípido de 1:200, y con una concentración total (lípido + compuesto activo) de 10 mM. Otras molaridades totales típicas son 15 mM, 20 mM o 25 mM. Si es necesario, se pueden formular molaridades de hasta 50 mM o mayores. El porcentaje molar del compuesto activo puede estar en el intervalo de 0,1 a 10, dependiendo de las necesidades experimentales (asignación de los liposomas, tipo de derivado de CPT). La fase lipídica puede comprender solamente un lípido catiónico, tal como DMTAP, DOTAP, DPTAP, DSTAP, DOTMA, o DDAB, o puede comprender hasta 60% de colípidos cargados y/o no cargados. Las preparaciones estándar que se han usado más frecuentemente comprenden DOTAP/DOPC = 1:1 o DOTAP/Chol 1:1. En consecuencia, se pueden usar otros lípidos catiónicos, tales como DMTAP, DSTAP, DDAB, DOTMA y similares.

### 6.1.2 Inyección de Solución Orgánica

Las dispersiones liposómicas se pueden preparar mediante inyección de una solución que comprende lípido más compuesto activo en un disolvente orgánico, en una solución acuosa, pH 3-7, preferiblemente 5-6, para lactona de camptotecina. Un disolvente típico es etanol ("inyección de etanol"). La solución tiene una concentración (lípido) entre 200-400 mM. Se inyecta un volumen adecuado de la solución con agitación vigorosa. Todas las composiciones y concentraciones como se describen en la sección previa se pueden preparar mediante este enfoque. Como alternativa al etanol, se pueden utilizar otros disolventes adecuados o sus mezclas. Típicamente, éstos son alcoholes, éteres, cloroformo, hidrocarburos, etc. Así como también se pueden aplicar disolventes en el estado supercrítico, tales como hidrocarburos, dióxido de carbono, compuestos perfluorados, etc. Subsiguientemente al procedimiento de preparación descrito, se puede llevar a cabo la diálisis por extrusión, un paso de concentración o la liofilización.

### 6.1.3 Extrusión

Las preparaciones liposómicas como se preparan mediante los métodos descritos anteriormente no tienen necesariamente la distribución de tamaños deseada. Por lo tanto, se puede llevar a cabo subsiguientemente una extrusión a través de una membrana de tamaño de poros definido. Habitualmente se puede llevar a cabo al menos una extrusión a través de una membrana con un tamaño de poros de 200 nm (Osmonics Inc., Poretics, policarbonato 0,2  $\mu\text{m}$ ). Otras membranas de extrusión típicas tienen un tamaño de poros de 100 nm o 400 nm. Las distribuciones de tamaños se controlan mediante dispersión de luz casi elástica (Malvern, Herrenberg, Alemania).

Se puede llevar a cabo un procesamiento adicional, como filtración estéril o liofilización. La preparación liposómica se puede liofilizar y reconstituir con agua al estado original sin cambiar la distribución de tamaños ni la relación de compuesto activo/lípido.

## 6.2 Caracterización

La distribución de tamaños de las preparaciones liposómicas se determina mediante dispersión de luz casi elástica (Malvern, Herrenberg, Alemania), y la composición se controla mediante HPLC. Como control adicional para la carga exitosa, se aplica espectroscopía de UV-VIS, que permite la determinación in situ de camptotecina en la preparación

liposómica. Se encuentran diferentes espectros del compuesto activo en la solución madre, en el liposoma, y tras disolver la preparación liposómica en disolvente orgánico. Como ejemplo, se dan datos de una preparación liposómica que comprende camptotecina con una relación de compuesto activo/lípido de 1:1000. Con esta relación de compuesto activo/lípido, las medidas espectroscópicas se pudieron llevar a cabo sin dilución adicional de las muestras. La preparación que comprende 10 mM de DOTAP/DOPC 1:1 se produjo mediante el método de película en una solución acuosa de trehalosa a pH 5,5. La preparación se extruyó 5 veces a través de una membrana con un tamaño de poros de 200 nm (Osmonics Inc). Mediante dispersión de luz casi elástica, se determinó un  $Z_{media}$  de 156 nm con un PI de 0,15. En la figura se muestran los espectros de camptotecina en la solución madre (CHCl<sub>3</sub>/MeOH), en la preparación liposómica, y tras disolver los liposomas en THF/MeOH/HCl (1:5). Para la medida de la preparación liposómica, se usó una preparación vacía (DOTAP/DOPC pura) con la misma composición lipídica, para la medida del blanco. De la misma manera, para la medida en THF/MeOH/HCl, se disolvieron liposomas vacíos para la medida del blanco. Para una mejor comparación, los espectros están desplazados verticalmente, y los datos de la medida tras la dilución de los liposomas en THF/MeOH/HCl están multiplicados por 5. Como se puede observar en la Fig. 8, se obtienen diferentes espectros para los tres casos. Se puede observar una forma de pico característica para la camptotecina liposómica (Fig. 8, espectro b). Tras disolver los liposomas en THF/MeOH/HCl, se obtiene desplazamiento espectral adicional.

**6.2.1 Ejemplo: Mejora de la estabilidad química de epotilonas en liposomas catiónicos**

Se describe como ejemplo específico el encapsulamiento de epotilona B. Sin embargo, otras epotilonas conocidas en la técnica, tales como epotilona A, E o F, o derivados de epotilona A, B, E o F, se pueden encapsular de la misma manera [14, 11, 13, 15].

Los liposomas catiónicos que contienen epotilona B se prepararon según el método de película. De forma breve, para 10 ml de una suspensión liposómica 10 mM, se disolvieron 95 µmoles de DOTAP y 5 µmoles de epotilona B en 15 ml de cloroformo en un matraz de fondo redondo. El cloroformo se evaporó usando un evaporador giratorio, y la película lipídica delgada resultante se secó durante 60 min. a 7-10 mbares. Subsiguientemente, la película lipídica se disolvió en 10 ml de solución acuosa (véase la Tabla 22). La suspensión se extruyó 5 veces (extrusora Northern Lipids) a través de membranas de policarbonato de 200 nm (Osmonics Inc.). La composición y el tamaño de los lípidos se comprobaron mediante HPLC y PCS.

**Tabla 22: Sumario de liposomas con epotilona B**

| Formulación                        | Componentes de solución acuosa                    | Concentración de epotilona B | Semivida de epotilona B |
|------------------------------------|---|------------------------------|-------------------------|
| DOTAP/epotilona B = 95/5% en moles | 10 % trehalosa, pH 5,5                            | 0,5 mM = 200 mg/l            | 600 días                |
| DOTAP/epotilona B = 95/5% en moles | 10 % trehalosa y tampón de Tris/HCl 10 mM, pH 7,0 | 0,5 mM = 200 mg/l            | 285 días                |

Ensayo de estabilidad. En las formulaciones, se investigó la estabilidad química de epotilona B. Las formulaciones se dividieron en alícuotas, y la mitad de las alícuotas se almacenó a -80°C (formulaciones de referencia). La otra mitad (formulaciones de ensayo) se almacenó a 4-8°C. En puntos de tiempo seleccionados, se determinó la concentración de epotilona B mediante HPLC en una formulación de ensayo selectiva y en una formulación de referencia. La concentración de epotilona B encontrada en la formulación de ensayo se expresó como % de la concentración de epotilona B en la formulación de referencia (que se supuso que era 100%). La última columna de la Tabla 22 presenta la semivida de la epotilona B, definida como el punto de tiempo en el que la concentración de epotilona B en la formulación de ensayo ascendió a 50% de la concentración de epotilona B en la formulación de referencia respectiva.

Los datos muestran que cuando se compara la estabilidad de la epotilona en formulaciones liposómicas, a pH menor (5,5) la estabilidad fue mejor que aquella a pH mayor (7,0). Esto contrasta fuertemente con la bibliografía, en la que se describe una inestabilidad creciente de las epotilonas a pH bajo.

Los siguientes apartados también son parte de la descripción:

1. Un método para producir una preparación de liposomas catiónicos que comprende al menos un compuesto anfifílico seleccionado de lípidos catiónicos en una cantidad de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos un compuesto anfifílico adicional en una cantidad de hasta aproximadamente 69,9% en moles, un compuesto activo lipófilo en una cantidad de al menos aproximadamente 0,1% en moles y un agente estabilizador en una cantidad de aproximadamente 0,1% (m/v) hasta aproximadamente 20% (m/v),

que comprende los pasos de

- a) proporcionar
- i. una solución orgánica que comprende un disolvente orgánico, dicho compuesto activo y dicho lípido catiónico, y opcionalmente dicho compuesto anfifílico adicional,
  - ii. una solución acuosa que comprende dicho agente estabilizador,
- 5 b) preparar una preparación de liposomas catiónicos a partir de dicha solución a) i. y a) ii., en donde dicha preparación comprende liposomas catiónicos en un medio acuoso,
- c) opcionalmente, homogeneizar dicha preparación al menos una vez y/o
- d) opcionalmente, filtrar dicha preparación en condiciones estériles,
- e) deshidratar dicha preparación y
- 10 f) opcionalmente, reconstituir dichos liposomas catiónicos del paso e) en una solución acuosa, y en donde opcionalmente antes del paso c) y/o d) se incluye un paso de ultrafiltración,
2. El método del apartado 1, en donde dicha preparación liposómica que comprende dicho compuesto activo es física y químicamente estable en uno cualquiera de los pasos b) a d) o f) durante al menos 12 horas a aproximadamente 2 a aproximadamente 8°C o al menos aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente.
- 15 3. El método del apartado 1 o 2, en donde el valor del pH del medio acuoso en uno cualquiera de los pasos b) a d) o f) está entre aproximadamente 3 y 7, preferiblemente entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6,5.
4. El método de uno cualquiera de los apartados 1 a 3, en donde al menos uno de los pasos b) a d) y f) se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente -1°C y aproximadamente 15°C, preferiblemente entre aproximadamente 1°C y aproximadamente 10°C, y más preferido entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C.
- 20 5. El método de uno cualquiera de los apartados 1 a 4, en donde la etapa b) se lleva a cabo mediante un procedimiento de película lipídica o de inyección de disolvente.
- 25 6. El método de uno cualquiera de los apartados 1 a 5, en donde dicho compuesto anfifílico adicional es no catiónico, y preferiblemente se selecciona de esteroides tales como colesterol, fosfolípidos, lisolípidos, lisofosfolípidos, esfingolípidos o lípidos pegilados, y sus combinaciones.
7. El método de uno cualquiera de los apartados 1 a 6, en donde dicho compuesto anfifílico es diacilfosfatidilcolina.
- 30 8. El método de uno cualquiera de los apartados 1 a 7, en donde dicho compuesto activo lipófilo se selecciona de un taxano, una camptotecina, una epotilona, una estatina, un depsipéptido, talidomida, otros agentes que interaccionan con microtúbulos, tales como discodermolida, laulimalida, isolaulimalida, eleuterobina, sarcodictina A y B.
- 35 9. Un método para producir una preparación de liposomas catiónicos que comprende al menos un compuesto anfifílico seleccionado de lípidos catiónicos en una cantidad de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos un compuesto anfifílico adicional en una cantidad de hasta aproximadamente 68% en moles, un taxano en una cantidad de al menos aproximadamente 2% en moles, y un agente estabilizador en una cantidad de aproximadamente 0,1% (m/v) hasta aproximadamente 20% (m/v),
- 40 que comprende los pasos de
- a) proporcionar
- i. una solución orgánica que comprende un disolvente orgánico, dicho taxano y dicho lípido catiónico, y opcionalmente dicho compuesto anfifílico adicional,
  - ii. una solución acuosa que comprende dicho agente estabilizador,
- 45 b) preparar una preparación de liposomas catiónicos a partir de dicha solución a) i) y a) ii), en donde dicha preparación comprende liposomas catiónicos en un medio acuoso,
- c) opcionalmente, homogeneizar dicha preparación al menos una vez y/o

d) opcionalmente, filtrar dicha preparación en condiciones estériles,

e) deshidratar dicha preparación y

f) opcionalmente, reconstituir dichos liposomas catiónicos del paso e) en una solución acuosa, y

en donde opcionalmente antes del paso c) y/o d) se incluye un paso de ultrafiltración,

- 5 10. El método del apartado 9, en donde dicha preparación liposómica que comprende dicho taxano es física y químicamente estable en uno cualquiera de los pasos b) a d) o f) durante al menos 12 horas a aproximadamente 2 a aproximadamente 8°C o al menos aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente.
- 10 11. El método del apartado 9 o 10, en donde dicho taxano se selecciona de paclitaxel o docetaxel, o cualquier derivado lipófilo del mismo.
12. El método de uno cualquiera de los apartados 9 a 11, en donde dicha preparación liposómica comprende paclitaxel en una cantidad de aproximadamente 5% en moles.
13. El método de uno cualquiera de los apartados 9 a 11, en donde dicha preparación liposómica comprende docetaxel en una cantidad de al menos aproximadamente 5% en moles.
- 15 14. El método de uno cualquiera de los apartados 9 a 11, en donde dicha preparación liposómica comprende succinil-paclitaxel en una cantidad de aproximadamente 5% en moles.
15. El método de uno cualquiera de los apartados 1 a 14, en donde dicha preparación liposómica comprende liposomas con un tamaño medio de partículas de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 400 nm, preferiblemente aproximadamente 100 nm a aproximadamente 300 nm.
- 20 16. Una preparación liposómica catiónica obtenible mediante un procedimiento de uno cualquiera de los apartados 1 a 15.
- 25 17. Una preparación liposómica catiónica que comprende al menos un lípido catiónico de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos un compuesto anfifílico adicional de hasta aproximadamente 69,9% en moles, un compuesto activo lipófilo de al menos aproximadamente 2% en moles, y un agente estabilizador de aproximadamente 0,1% (m/v) a aproximadamente 20% (m/v), caracterizada por que dicha preparación liposómica es física y químicamente estable en una solución acuosa durante al menos 12 horas a 2 a 8°C y al menos 4 horas a temperatura ambiente.
- 30 18. Una preparación liposómica catiónica que comprende al menos un lípido catiónico de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos un compuesto anfifílico adicional de hasta aproximadamente 65% en moles, paclitaxel de al menos aproximadamente 5% en moles, y un agente estabilizador de aproximadamente 0,1% (m/v) a aproximadamente 20% (m/v), caracterizada por que dicha preparación liposómica es física y químicamente estable en una solución acuosa durante al menos 12 horas a 2 a 8°C y al menos 4 horas a temperatura ambiente.
- 35 19. Una preparación liposómica catiónica que comprende al menos un lípido catiónico de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos un compuesto anfifílico adicional de hasta aproximadamente 65% en moles, docetaxel de al menos aproximadamente 5% en moles, y un agente estabilizador de aproximadamente 0,1% (m/v) a aproximadamente 20% (m/v).
- 40 20. Una preparación liposómica catiónica que comprende al menos un lípido catiónico de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos un compuesto anfifílico adicional de hasta aproximadamente 65% en moles, succinil-paclitaxel de al menos aproximadamente 5% en moles, y un agente estabilizador de aproximadamente 0,1% (m/v) a aproximadamente 20% (m/v).
- 45 21. La preparación del apartado 19 o 20, caracterizada por que dicha preparación liposómica es física y químicamente estable en una solución acuosa durante al menos 12 horas a 2 a 8°C y al menos 4 horas a temperatura ambiente.
22. La preparación del apartado 16 a 21, que comprende un agente estabilizador en el intervalo de aproximadamente 5% (m/v) a aproximadamente 15% (m/v).
23. La preparación del apartado 16 a 22, en la que dicha preparación liposómica comprende liposomas con un tamaño medio de partículas de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 400 nm, preferiblemente aproximadamente 100 nm a aproximadamente 300 nm.
- 50 24. La preparación del apartado 16 a 23, en la que dicha preparación liposómica comprende liposomas que tienen un potencial zeta positivo en una solución de KCl de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente

pH 7,5 a temperatura ambiente.

25. Una composición farmacéutica que comprende una preparación liposómica de uno cualquiera de los apartados 16 a 24, junto con un vehículo, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

#### Referencias

- 5 1. Sharma, A. y R.M. Straubinger, Novel Taxol Formulations - Preparation and Characterization of Taxol-Containing Liposomes. *Pharmaceutical Research*, 1994. 11(6): p. 889-896.
2. Thurston, G., et al., Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *J Clin Invest*, 1998. 101(7): p. 1401-13.
- 10 3. Campbell, R.B., S.V. Balasubramanian, y R.M. Straubinger, Influence of cationic lipids on the stability and membrane properties of paclitaxel-containing liposomes. *J Pharm Sci*, 2001. 90(8): p. 1091-105.
4. Dordunoo, S. y H.M. Burt, Solubility and Stability of taxol: effects of buffers and cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 1996. 133: p. 191-201.
5. Vernooij, E., et al., Chemical hydrolysis of DOTAP and DOPE in a liposomal environment. *Journal of Controlled Release*, 2002. 79(1-3): p. 299-303.
- 15 6. Sharma, A., E. Mayhew, y R.M. Straubinger, Antitumor effect of taxol-containing liposomes in a taxol-resistant murine tumor model. *Cancer Res*, 1993. 53(24): p. 5877-81.
7. Grit, M., Crommelin, D.J.A., Chemical stability of liposomes: implicatins for their physical stability. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1993. 64: p. 3-18
- 20 8. N. J. Zuidam, D.J.A Crommelin, Chemical Hydrolysis of Phospholipids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1995 . 84: p. 1113 - 1119.
9. M. Sefkow, M. Kiffe, G. Höfle, Derivatization of the C12-C13 functional groups of epothilones A, Band C. *Bioorg. & Medicinal Chem. Lett.*, 1998, 8: 3031-3036.
10. A. Regueiro-Ren et al., SAR and pH Stability of Cyano-Substituted Epothilones. *Org. Lett.* 2002, 4: 3816-3818.
- 25 11. K.C. Nicolaou, A. Ritzen, K. Namoto Recent developments in the chemistry, biology and medicine of the epothilones. *Chem. Comm.* 2001, 1523-1535.
12. F.Y.F. Lee et al., BMS-247550 : A novel epothilone analog with a mode of action similar to paclitaxel but possessing superior antitumor activity. *Clin. Cancer Res.* 2001, 7: 1429-1437.
- 30 13. T.-C- Chou et al., The synthesis, discovery and development of a highly promising class of microtubule stabilization agents. *PNAS* 2001, 98: 8113-8118.
14. K.-H. Altmann, M. Wartmann, T. O'Reilly. Epothilones and related structures. *Biochim. Et Biophys. Acta* 2000, 1470: M79-M91.
15. S. J. Stachel et al., On the total synthesis and preliminary biological evaluations of 15(R) and 15(S) Aza-dEpoB. *Org. Lett.* 2000, 2: 1637-1639.

35

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una preparación de liposomas catiónicos que comprende al menos un compuesto anfifílico seleccionado de lípidos catiónicos en una cantidad de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos un compuesto anfifílico adicional en una cantidad de hasta aproximadamente 69,9% en moles, un compuesto activo lipófilo en una cantidad de al menos aproximadamente 0,1% en moles y un agente estabilizador en una cantidad de aproximadamente 0,1% (m/v) hasta aproximadamente 20% (m/v), que comprende los pasos de
- 10 a) proporcionar
- i. una solución orgánica que comprende un disolvente orgánico, dicho compuesto activo y dicho lípido catiónico, y opcionalmente dicho compuesto anfifílico adicional,
- ii. una solución acuosa que comprende dicho agente estabilizador,
- b) preparar una preparación de liposomas catiónicos a partir de dicha solución a) i.) y a) ii.), en donde dicha preparación comprende liposomas catiónicos en un medio acuoso,
- c) opcionalmente, homogeneizar dicha preparación al menos una vez y/o
- 15 d) opcionalmente, filtrar dicha preparación en condiciones estériles,
- e) deshidratar dicha preparación y
- f) opcionalmente, reconstituir dichos liposomas catiónicos del paso e) en una solución acuosa,
- en donde opcionalmente antes del paso c) y/o d) se incluye un paso de ultrafiltración, y
- 20 en donde el valor del pH del medio acuoso en uno cualquiera de los pasos b) a d) o f) está entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6,5.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha preparación liposómica que comprende dicho compuesto activo es física y químicamente estable en uno o más de los pasos b) a d) o f) durante al menos 12 horas a aproximadamente 2 a aproximadamente 8°C, o al menos aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente.
- 25 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el paso b) se lleva a cabo mediante un procedimiento de película de lípido o de inyección de disolvente.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichos lípidos catiónicos es DOTAP, y dicho compuesto anfifílico adicional es diacilfosfatidilcolina.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho compuesto activo lipófilo se selecciona de un taxano, una camptotecina, una epotilona, una estatina, un depsipéptido, talidomida, otros agentes que interactúan con microtúbulos, tales como discodermolida, laulimalida, isolaulimalida, eleuterobina, sarcodictina A y B.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho taxano se selecciona de paclitaxel o docetaxel, o cualquier derivado lipófilo del mismo.
7. Una preparación liposómica catiónica obtenible mediante un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 35 8. Una preparación liposómica catiónica que comprende al menos un lípido catiónico de al menos aproximadamente 30% en moles, opcionalmente al menos un compuesto anfifílico adicional de hasta aproximadamente 69,9% en moles, un compuesto activo lipófilo de al menos aproximadamente 2% en moles, y un agente estabilizador de aproximadamente 0,1% (m/v) a aproximadamente 20% (m/v), caracterizada por que dicha preparación liposómica es física y químicamente estable en una solución acuosa durante al menos 12 horas a 2 a 8°C y al menos 4 horas a temperatura ambiente, y tiene un valor de pH de entre 3 y 6,5.
- 40 9. La preparación liposómica catiónica de la reivindicación 8, en la que dicho compuesto activo lipófilo se selecciona de una camptotecina, una epotilona, una estatina, un depsipéptido, talidomida, otros agentes que interactúan con microtúbulos, tales como discodermolida, laulimalida, isolaulimalida, eleuterobina, sarcodictina A y B.
- 45 10. La preparación liposómica catiónica de la reivindicación 8 o 9, que comprende un agente estabilizador en el intervalo de aproximadamente 5% (m/v) a aproximadamente 15% (m/v).
11. La preparación liposómica catiónica de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende menos de 5% de productos de degradación de dicho compuesto activo.

Fig. 1: Diámetro y valores PI de los liposomas para LipoPac™ (Lote GB 100)

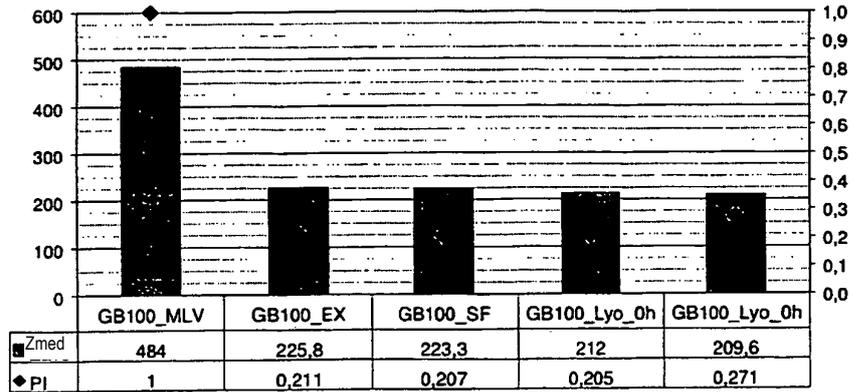


Fig. 2: Diámetro y valores PI de los liposomas para LipoPac™ (Lote GB 261)

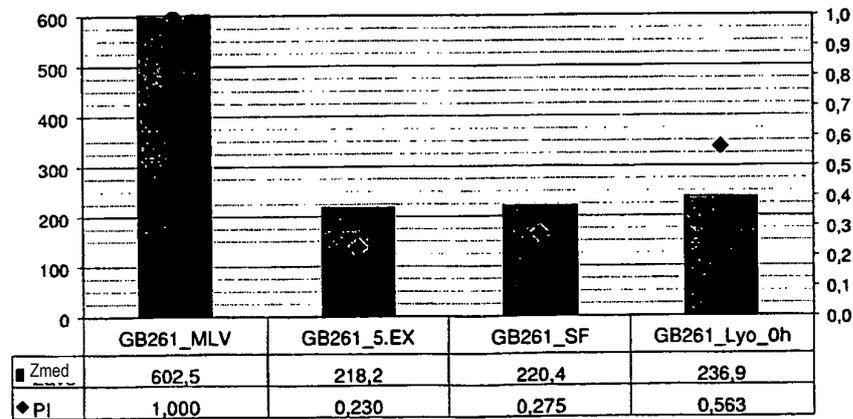


Fig. 3: Estabilidad al almacenamiento como se determina por medidas PCS

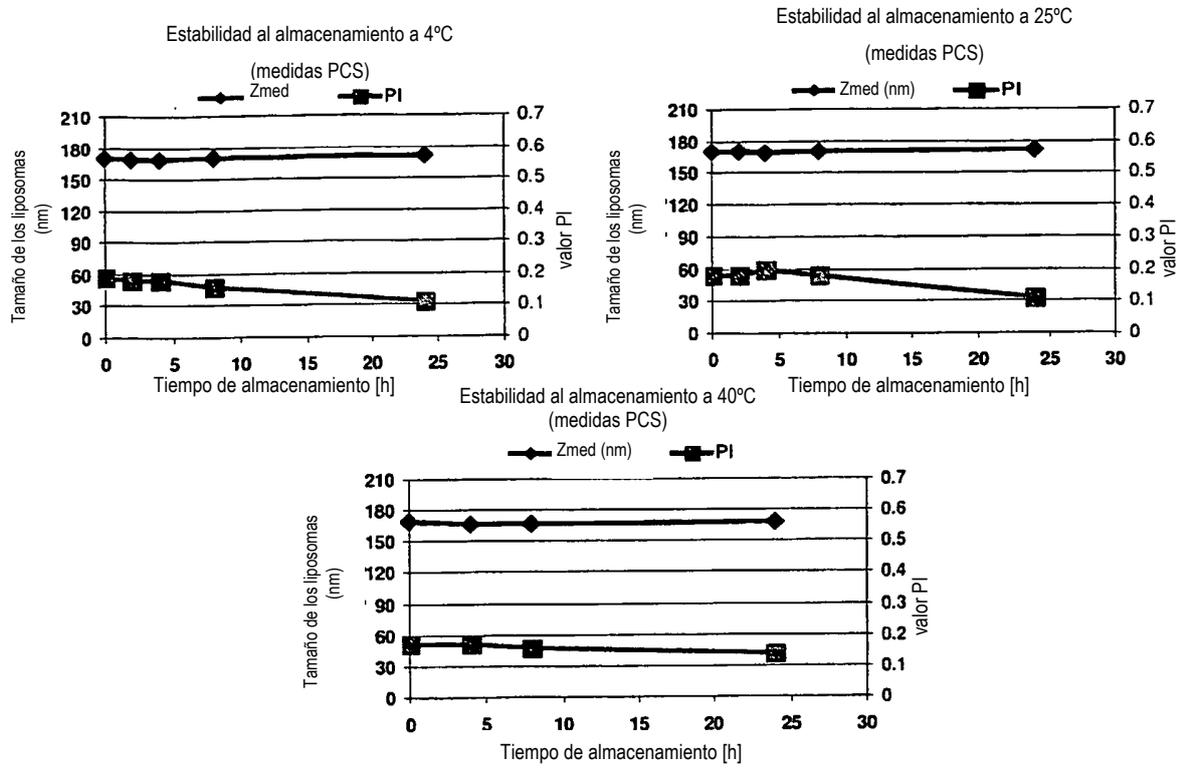


Fig. 4: Recuentos de partículas (0-8 h)

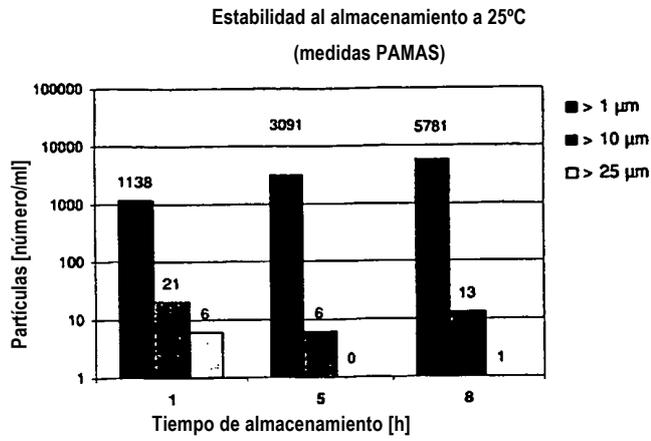


Fig. 5 Eficacia terapéutica de LipoDoc™ frente a Taxotere® en el melanoma A-375 de los ratones lampiños

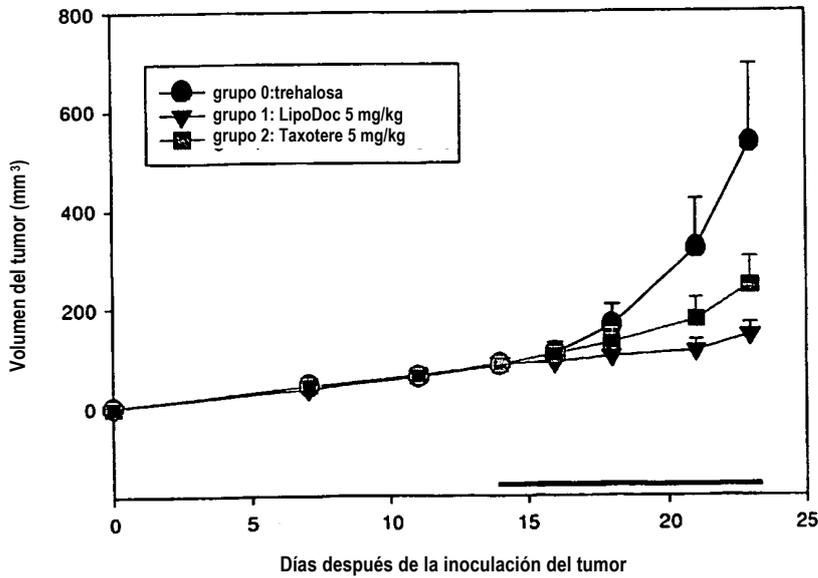


Fig. 6: Eficacia terapéutica de LipoPac™ frente a Taxol® en el melanoma A-375 de los ratones lampiños

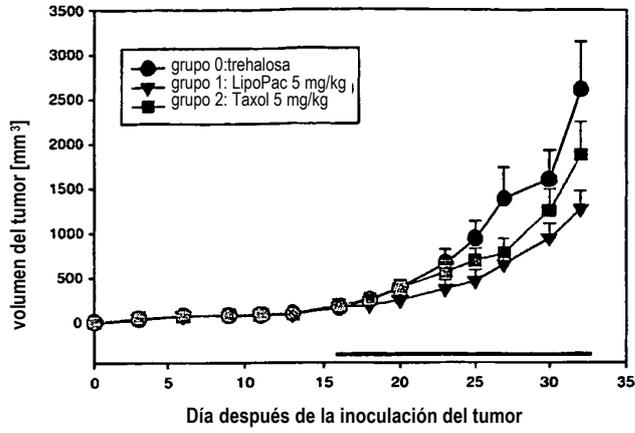


Fig. 7: Eficacia terapéutica de LipoPac™ frente a Taxol® en el melanoma B-16 de los ratones C57/BL6

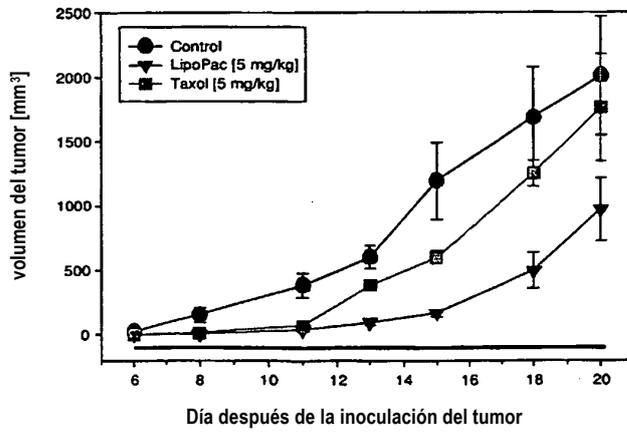


Fig. 8: Espectros UV-VIS de camptotecina en solución stock  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (a), en una preparación de liposomas DOTAP/DOPC 10 mM, ratio compuesto activo/lípido 1:1000 (b), y después de disolución de una preparación de liposomas 1:5 en  $\text{THF}/\text{MeOH}/\text{HCl}$  (c).

