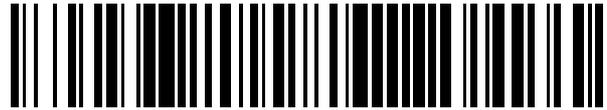


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 047**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 31/4745** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2005 PCT/US2005/015349**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2005 WO05107712**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2005 E 05745505 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 1746976**

54 Título: **Liposomas útiles para la administración de fármacos**

30 Prioridad:

**03.05.2004 US 567921 P**

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

**09.06.2017**

73 Titular/es:

**MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
One Kendall Square Suite B7201  
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**HONG, KEELUNG;  
DRUMMOND, DARYL C. y  
KIRPOTIN, DMITRI B.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 616 047 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).

**Liposomas útiles para la administración de fármacos****DESCRIPCIÓN**

5

**Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere con carácter general al campo de los liposomas, y más específicamente a las composiciones de liposomas útiles para la administración de entidades terapéuticas o diagnósticas.

**Antecedentes de la invención**

15 Los liposomas, o vesículas de doble capa lípida, se han utilizado o propuesto para usar en diversas aplicaciones de investigación, industria y medicina, especialmente para el uso como portadores de compuestos diagnósticos o terapéuticos *in vivo*. Consulte, entre otros: Lasic, D. *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier, Amsterdam, 1993. Lasic, D, and Papahadjopoulos, D., eds. *Medical Applications of Liposomes*. Elsevier, Amsterdam, 1998. Los liposomas suelen caracterizarse por tener un espacio interior aislado del medio exterior por una membrana de una o varias bicapas que forman un saco microscópico o vesícula. Las membranas bicapa de los liposomas suelen estar formadas por lípidos, es decir, moléculas anfífilas de origen sintético o natural que incluyen dominios hidrofóbicos e hidrofílicos especialmente separados. Consulte Lasic D., 1993, *supra*. Las membranas bicapa de los liposomas también pueden formarse por polímeros anfífilos y tensioactivos (polimerosomas, niosomas). Un liposoma suele actuar como portador de una entidad como, por ejemplo, sin carácter restrictivo, un compuesto químico, una combinación de compuestos, un complejo supramoleclar de origen natural o sintético, un material genético, un organismo vivo, una porción de los anteriores, o una derivación de los anteriores, que es capaz de tener propiedades útiles o ejercer una actividad útil. Para ello, los liposomas se preparan para contener la entidad deseada en una forma de liposoma incorporado. El proceso de incorporación de una entidad deseada en un liposoma suele conocerse como "carga". La entidad de liposoma incorporado puede cargarse total o parcialmente en el espacio interior del liposoma, dentro de la membrana bicapa del liposoma, o bien puede asociarse con la superficie exterior de la membrana del liposoma. La incorporación de entidades en liposomas también se conoce como encapsulación o captura, y estos tres términos se utilizan en el presente documento de forma indistinta y con el mismo significado. El propósito de la encapsulación liposómica de una entidad suele ser proteger la entidad del entorno destructivo, al tiempo que ofrece la oportunidad a la entidad encapsulada de ejercer su actividad mayoritariamente en el lugar o en el entorno donde dicha actividad resulta ventajosa pero menos que en otros lugares donde dicha actividad puede ser inútil o indeseada. Este fenómeno suele conocerse como administración. Por ejemplo, una sustancia farmacológica dentro del liposoma puede estar protegida de la destrucción por las enzimas del organismo, pero son liberadas del liposoma y proporcionan tratamiento en el lugar de la enfermedad.

40 Idealmente, dichos liposomas pueden prepararse para incluir el compuesto deseado (i) con una alta eficacia de carga, es decir, un alto porcentaje de la entidad encapsulada respecto de la cantidad capturada durante el proceso de encapsulación; (ii) alta cantidad de entidad encapsulada por unidad de material bicapa de liposoma; (iii) en una concentración alta de la entidad encapsulada, y (iv) en una forma estable, como, por ejemplo, con una liberación escasa (fuga) de una entidad encapsulada tras su almacenamiento o generalmente antes de que el liposoma aparezca en el lugar o en el entorno donde se prevé que la entidad capturada en el liposoma ejerza su actividad prevista.

45 WO2005/002546, WO98/17256, US-4321259, US-5316771, US-5785987 y US-6110491 describen liposomas para encapsulación y los métodos de producción.

50 Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de proporcionar varias composiciones de liposomas que sean útiles para la administración de diversos compuestos, especialmente entidades terapéuticas, diagnósticas o de creación de imágenes.

**Sumario de la invención**

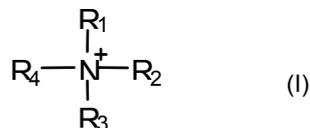
55 La presente invención se basa en el descubrimiento de que el amonio sustituido y el polianión son útiles para cargar y retener las entidades dentro de los liposomas. En consecuencia, la descripción presente proporciona métodos y composiciones de liposomas que resultan útiles para administrar diversas entidades, especialmente las entidades terapéuticas, es decir, entidades útiles en el diagnóstico, pronóstico, realización de pruebas, exploración, tratamiento o prevención de una afección no deseada, por ejemplo, una enfermedad en un organismo vivo, como un ser humano, una planta o un animal.

60 La invención proporciona una composición formada por un liposoma en un medio, donde el liposoma comprende 1,2-distearoil-SN-fosfatidilcolina, colesterol y N-(omega-metoxi-poli(etilenglicol)oxycarbonil)-1,2-distearoilfosfatidil-etanolamina en la relación molar 3:2:0,015, y capturado dentro del liposoma se encuentran irinotecán y octasulfato de sacarosa.

65 La invención también proporciona una composición farmacéutica formada por la composición del liposoma de la invención, un portador aceptable a nivel farmacéutico y una sustancia tampón.

En una realización, la presente descripción proporciona una composición formada por un liposoma en un medio, donde el interior del liposoma contiene un amonio sustituido

5



10 en donde cada  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  es independientemente un hidrógeno o un grupo orgánico que tiene, inclusivamente, un total de hasta 18 átomos de carbono, donde al menos uno de los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  es un grupo orgánico, donde el grupo orgánico es independientemente un grupo hidrocarburo con hasta un total de 8 átomos de carbono, y es un grupo alquilo, alquilideno, alquilo heterocíclico, cicloalquilo, arilo, alquenilo o cicloalquenilo o bien un derivado hidroxilado sustituido de los anteriores, que incluye opcionalmente dentro de su cadena de hidrocarburo átomos de S, O o N, que forma un éter, éster, tioéter, amina o enlace amida, donde al menos tres de los  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  son grupos orgánicos, o el amonio sustituido es un amonio con impedimento estérico como, por ejemplo, los casos en que al menos uno de los grupos orgánicos tienen un átomo de carbono secundario o terciario unido directamente al átomo de nitrógeno amoniaco. Preferiblemente, el compuesto de amonio sustituido encapsulado en liposomas tiene un logaritmo negativo de la constante de disociación ácida (desprontación) (pKa) de al menos aproximadamente 8,0, al menos aproximadamente 8,5 al menos aproximadamente 9,0, al menos 9,5, o al menos 10,0, según se ha determinado en una solución acuosa a temperatura ambiente.

En otra realización, la presente descripción proporciona una composición formada por un liposoma en un medio, donde el espacio interior del liposoma contiene un polianión y donde el polianión es un poliol polianionizado o un azúcar polianionizado. El liposoma contiene preferiblemente un gradiente transmembrana que puede efectuar la carga de cualquier entidad en el liposoma. En una realización, el gradiente transmembrana es un gradiente de un amonio, un amonio cuaternario o un amonio sustituido primario, secundario o terciario que tiene en una solución acuosa diluida a temperatura ambiente un logaritmo negativo de la constante de disociación ácida (desprontación) (pKa) de al menos aproximadamente 8,0, al menos 8,5, al menos 9,0, al menos 9,5 o al menos 10,0 aproximadamente. El liposoma contiene opcionalmente una entidad capturada, por ejemplo, un marcador terapéutico detectable o una molécula orgánica catiónica globalmente.

En otra realización, la composición proporcionada por la presente descripción contiene además una entidad encapsulada en los liposomas de la presente descripción. Preferiblemente, la entidad está encapsulada dentro del espacio interior del liposoma. Por ejemplo, el espacio interior del liposoma contiene un compuesto terapéutico antineoplásico, en el cual el nivel de toxicidad de la composición para un sujeto es al menos igual o inferior al nivel de toxicidad del compuesto terapéutico antineoplásico administrado a un sujeto sin la composición.

En otra realización, la composición proporcionada por la presente descripción es una composición de liposoma que forma un compuesto de camptotecina. La composición tiene una actividad anti-cancerígena de al menos dos veces, cuatro veces, o diez superior al compuesto de camptotecina administrado de forma similar en ausencia de la composición, mientras que la toxicidad de la composición no se supere, es de al menos dos veces, o al menos cuatro veces inferior a la toxicidad del compuesto de camptotecina administrado de forma similar en ausencia de la composición. En una realización, el compuesto de camptotecina es un profármaco y está contenido en el liposoma en al menos 0,1 mg, al menos 0,2 mg, al menos 0,3 mg, al menos 0,5 mg o al menos 1 mg por 1 mg de los materiales de la membrana del liposoma, p. ej. lípidos. El compuesto de camptotecina está encapsulado preferiblemente en el liposoma sustancialmente dentro del espacio interno del liposoma. En un caso, el compuesto de camptotecina es irinotecán (CPT-11).

En otra realización, la composición proporcionada por la presente descripción es una composición de liposoma de un alcaloide de la vinca o un derivado del mismo. La composición tiene una retención del fármaco de 24 horas dentro del liposoma después de una exposición de 24 horas en la sangre de un mamífero *in vivo* de al menos el 50%, al menos el 60% o al menos el 70% de la carga de fármaco original. El alcaloide de la vinca o un derivado del mismo está encapsulado preferiblemente en el liposoma sustancialmente dentro del espacio interior del liposoma. Un ejemplo de mamífero es una rata. Algunos alcaloides de la vinca ilustrativos y sus derivados son vincristina, vinblastina y vinorelbina.

En otra realización adicional, la presente descripción proporciona un método de encapsular una entidad en un liposoma. El método incluye poner en contacto los liposomas de la presente descripción con una entidad, p. ej. entidad terapéutica o detectable. Preferiblemente, el contacto se realiza bajo las condiciones cuando la concentración del amonio sustituido o un polianión de la presente descripción en el medio es inferior a la del espacio interno de los liposomas. En una realización, la composición del liposoma entra en contacto con una entidad en un medio acuoso.

En otra realización adicional, la presente descripción proporciona un método de encapsular una entidad en un liposoma. El método comprende poner en contacto de la composición que contiene el liposoma de la presente descripción con una pre-entidad, donde la pre-entidad es capaz de convertirse en una entidad bajo una condición, y proporcionar la condición dentro del liposoma, convirtiendo de esta forma la pre-entidad en la entidad dentro del liposoma. En un caso, la entidad es un compuesto orgánico y la pre-entidad es un derivado básico del mismo.

En otra realización adicional, la presente descripción proporciona un kit para crear entidades encapsuladas en liposomas. El kit está formado por un liposoma de la descripción actual y, opcionalmente, un recipiente que contiene una entidad y/o instrucciones para el usuario, *por ejemplo*, para encapsular una entidad.

5 **Breve descripción de los dibujos**

10 La Figura 1 muestra la farmacocinética en sangre del lípido del liposoma (círculos) y el fármaco (triángulos) después de la administración intravenosa del bolo de liposomas cargados con CPT-11 a una rata. Los liposomas se cargan usando el método TEA-Pn (consulte el Ejemplo 9).

15 La Figura 2 muestra la dinámica de la relación lipídica de fármaco-liposoma en la sangre de una rata *in vivo* después de una administración intravenosa del bolo del liposoma cargado con CPT-11 usando el método TEA-Pn (consulte el Ejemplo 9).

La Figura 3 muestra la eficacia antitumoral de CPT-11 libre y CPT-11 liposomal frente a xenoinjertos de cáncer de mama humano BT-474 en ratones lampiños. “Control” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 10).

20 La Figura 4 muestra la dinámica de pesos corporales de los animales durante el tratamiento de ratones lampiños con tumores BT-474 con CPT-11 libre o CPT-11 liposomal. “Control” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 10).

25 La Figura 5 muestra la dinámica de la relación lipídica fármaco-liposoma en la sangre de una rata después de una administración intravenosa *in vivo* del bolo del liposoma cargado con CPT-11 usando el método TEA-SOS. (Consulte el Ejemplo 14).

30 La Figura 6 muestra la eficacia antitumoral de CPT-11 libre y CPT-11 liposomal frente a xenoinjertos de cáncer de colon humano HT-29 en ratones. La leyenda del panel indica el método de carga del fármaco y la dosis administrada por inyección. “Control salino” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 15).

35 La Figura 7 muestra la dinámica de los pesos corporales de los animales durante el tratamiento de ratones lampiños con tumores HT-29 con formulaciones de CPT-11 libre o CPT-11 liposomal. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. “Control salino” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 15).

40 La Figura 8A muestra la farmacocinética en sangre del lípido de liposoma después de la administración intravenosa a una rata del bolo de liposomas cargados con topotecán. La leyenda del panel indica el método de carga del fármaco y el contenido de fármaco de los liposomas. (Consulte el Ejemplo 24).

45 La Figura 8B muestra la dinámica de la relación lipídica fármaco-a-liposoma en la sangre de una rata después de una administración intravenosa *in vivo* del bolo con topotecán. La leyenda del panel indica el método de carga del fármaco y el contenido de fármaco de los liposomas. (Consulte el Ejemplo 24).

La Figura 9 muestra la citotoxicidad *in vitro* de topotecán libre, liposomal, o inmunoliposomal dirigido a HER2 (método TEA-Pn) contra las células de carcinoma de mama SKBr-3. (Consulte el Ejemplo 27).

50 La Figura 10 muestra la citotoxicidad *in vitro* de topotecán libre, liposomal o inmunoliposomal dirigido a HER2 (método TEA-SOS) contra las células de carcinoma de mama SKBr-3. (Consulte el Ejemplo 32).

55 La Figura 11 muestra la eficacia antitumoral de varias formulaciones de topotecán (TPT) frente a xenoinjertos de cáncer de mama humano BT-474 en ratones. “Control salino” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 29).

60 La Figura 12 muestra la dinámica de pesos corporales de los animales durante el tratamiento de ratones lampiños con tumores BT-474 con topotecán libre (TPT), topotecán liposomal (Ls-TPT) o topotecán inmunoliposomal dirigido contra HER2 (F5 ILs-TPT). “Control” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 29).

65 La Figura 13A muestra la eficacia antitumoral de formulaciones de topotecán frente a xenoinjertos de cáncer de mama humano BT-474 en ratones lampiños. Se administraron topotecán libre (TPT libre) o topotecán liposomal (Ls-TPT) a una octava parte de sus dosis máximas toleradas. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. “Control” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 31).

- La Figura 13B muestra la eficacia antitumoral de formulaciones de topotecán frente a xenoinjertos de cáncer de mama humano BT-474 en ratones. Se administraron topotecán libre (TPT libre) o topotecán liposomal (Ls-TPT) a una cuarta parte de sus dosis máximas toleradas. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. “Control” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 31).
- 5 La Figura 13C muestra la eficacia antitumoral de formulaciones de topotecán frente a xenoinjertos de cáncer de mama humano BT-474 en ratones. Se administraron topotecán libre (TPT libre) o topotecán liposomal (Ls-TPT) a la mitad de sus dosis máximas toleradas. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. “Control” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 31).
- 10 La Figura 13D muestra la eficacia antitumoral de formulaciones de topotecán frente a xenoinjertos de cáncer de mama humano BT-474 en ratones. Se administraron topotecán libre (TPT libre) o topotecán liposomal (Ls-TPT) a sus dosis máximas toleradas. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. “Control” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 31).
- 15 La Figura 14 muestra la dinámica pesos corporales promedio durante el tratamiento de ratones lampiños con tumores BT-474 con topotecán libre (TPT libre), o topotecán liposomal (Ls-TPT) administrados a sus dosis máximas toleradas. “Control” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 31).
- 20 La Figura 15 muestra la citotoxicidad de 6-(3-aminopropil)-elipticina libre (AE libre), 6-(3-aminopropil)-elipticina liposomal (Ls-AE) o 6-(3-aminopropil)-elictina (F5 ILs-AE) inmunoliposomal dirigida a HER2 contra células de carcinoma de mama BT-474 *in vitro*. (Consulte el Ejemplo 35).
- 25 La Figura 16 muestra la citotoxicidad *in vitro* de 6-(3-aminopropil)-elipticina libre (APE libre), 6-(3-aminopropil)-elipticina liposomal (Ls-APE) o 6-(3-aminopropil)-elipticina inmunoliposomal (C225-ILs-APE) dirigido a EGFR contra células de carcinoma de mama con una expresión baja (MCF-7) o alta (MDA-MB468) del receptor EGF. (Consulte el Ejemplo 36).
- 30 La Figura 17 muestra los atributos farmacocinéticos en sangre de la 6-(3-aminopropil)elipticina (APE) formulada liposómicamente: farmacocinética en sangre del lípido de liposoma (panel A, círculos abiertos), el fármaco (Panel A, círculos llenos) y la dinámica de la relación lipídica fármaco-a-liposoma (Panel B) después de la administración intravenosa del bolo de liposomas APE a una rata. (Consulte el Ejemplo 37).
- 35 La Figura 18 muestra los atributos farmacocinéticos en sangre de la vinorelbina formulada en liposomas (Ls-VRB), y los inmunoliposomas dirigidos contra HER2 (F5-ILs-VRB): farmacocinética en sangre del lípido de liposoma (Panel A), el fármaco (Panel B) y dinámica de la relación lipídica fármaco-a-liposoma (Panel C) después de la administración intravenosa del bolo de liposomas de vinorelbina a una rata. (Consulte el Ejemplo 43).
- 40 La Figura 19 muestra la farmacocinética en sangre del lípido de liposoma después de la administración intravenosa del bolo de liposomas cargados con vinorelbina a una rata. Los liposomas se cargan usando dextranulfato de trietilamonio (DS-TEA), dextranulfato de amonio (DS-A) o sulfato de amonio (S-A) pre-capturado. (Consulte el Ejemplo 44).
- 45 La Figura 20 muestra la dinámica de la relación lipídica fármaco-liposoma en la sangre de una rata después de una administración intravenosa *in vivo* del bolo del liposoma cargado con vinorelbina usando dextranulfato de trietilamonio (DS-TEA), dextranulfato de amonio (DS-A) o sulfato de amonio (S-A) pre-capturado. (Consulte el Ejemplo 44).
- 50 La Figura 21 muestra la farmacocinética en sangre del lípido de liposoma después de la administración intravenosa del bolo de liposomas cargados con vinorelbina a una rata. Los liposomas se cargan usando octasulfato de trimetilamonio sacarosa (TEA-SOS) pre-capturado y tienen el tamaño medio indicado en la leyenda del panel. (Consulte el Ejemplo 45).
- 55 La Figura 22 muestra la dinámica de la relación lipídica fármaco-liposoma en la sangre de una rata después de una administración intravenosa *in vivo* del bolo del liposomas cargados con vinorelbina. Los liposomas se cargan usando trimetilamonio octasulfato de sacarosa (TEA-SOS) pre-capturado y tienen el tamaño medio indicado en la leyenda del panel. (Consulte el Ejemplo 45).
- 60 La Figura 23 muestra la farmacocinética en sangre del lípido de liposoma en una rata después de la administración intravenosa del bolo de vinorelbina formulada en liposomas (Ls-VRB) o inmunoliposomas dirigidos contra HER2 (F5-ILs-VRB) usando el método TEA-SOS. (Consulte el Ejemplo 46).
- 65 La Figura 24 muestra la dinámica de la relación lipídica fármaco-liposoma en la sangre de una rata después de una administración intravenosa *in vivo* del bolo del vinorelbina formulada en liposomas (Ls-VRB) o inmunoliposomas dirigidos contra HER2 (F5-ILs-VRB) usando el método TEA-SOS. (Consulte el Ejemplo 46).
- La Figura 25 muestra la citotoxicidad *in vitro* de vinorelbina libre (VRB libre), vinorelbina liposomal (Ls-VRB) o vinorelbina inmunoliposomal dirigida a HER2 (F5-ILs-VRB) contra células de cáncer de mama humano MDA-MB-453 con una sobreexpresión de HER2. (Consulte el Ejemplo 48).

- 5 La Figura 26 muestra la citotoxicidad *in vitro* de vinorelbina libre (VRB libre), vinorelbina liposomal (Ls-VRB) o vinorelbina inmunoliposomal dirigida a HER2 (F5-ILs-VRB) contra células de cáncer de pulmón humano no microcíticas CaLu-3 con una sobreexpresión de HER2. (Consulte el Ejemplo 49).
- 10 La Figura 27 muestra la citotoxicidad *in vitro* de vinorelbina libre (VRB libre), vinorelbina liposomal (Ls VRB/SOS-TEA) o vinorelbina inmunoliposomal dirigida a HER2 (F5-ILs VRB/SOS-TEA) contra células de cáncer de mama humano SKBr-3 con una sobreexpresión de HER2. (Consulte el Ejemplo 50).
- 15 La Figura 28 muestra la eficacia antitumoral de la vinorelbina libre (VRB libre) o vinorelbina liposomal (Ls VRB) frente a xenoinjertos de cáncer de colon humano Ht-29 en ratones lampiños. “Salino” hace referencia al ratón tratado solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. (Consulte el Ejemplo 51).
- 20 La Figura 29 muestra la dinámica de pesos corporales promedio durante el tratamiento de ratones lampiños con tumores HT-29 con vinorelbina libre (VRB libre), vinorelbina liposomal (Ls VRB) o solo vehículo (salino). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. (Consulte el Ejemplo 51).
- 25 La Figura 30 muestra la eficacia antitumoral de la vinorelbina libre (VRB libre) o vinorelbina liposomal (Ls VRB) en un modelo singénico de cáncer de colon murino C-26. La dosis del fármaco por inyección se ha indicado en la leyenda del panel. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. “Salino” hace referencia al ratón tratado solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 52).
- 30 La Figura 31 muestra la dinámica de pesos corporales promedio durante el tratamiento de ratones con tumores singénicos de carcinoma de colon murino C-26 con varias dosis de vinorelbina libre (VRB libre), vinorelbina liposomal (Ls VRB) o solo con vehículo (salino). La dosis del fármaco por inyección se ha indicado en la leyenda del panel. (Consulte el Ejemplo 52).
- 35 La Figura 32 muestra la eficacia antitumoral de vinorelbina libre (fármaco libre) o conjugada con scFv F5, vinorelbina inmunoliposomal dirigida contra HER2 preparada usando un método TEA-SOS (F5-ILs-VRB TEA-SOS), vinorelbina inmunoliposomal dirigida contra HER2 preparada usando un método TEA-Pn (F5-ILs-VRB TEA-Pn) frente a xenoinjertos de carcinoma de mama humano (BT-474) con una sobreexpresión de HER2 en ratones lampiños. “Control salino” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 53).
- 40 La Figura 33 muestra la dinámica de los pesos corporales promedio durante el tratamiento de ratones con xenoinjertos de carcinoma de mama humano (BT-474) con una sobreexpresión de HER2 con vinorelbina libre, scFv conjugado con F5, vinorelbina inmunoliposomal dirigida contra HER2 preparada usando un método TEA-SOS, vinorelbina inmunoliposomal dirigida contra HER2 preparada usando un método TEA-Pn, o solo con vehículo. Para ver una explicación de los símbolos, consulte la leyenda de la Figura 32. (Consulte también el Ejemplo 53).
- 45 La Figura 34 muestra la eficacia antitumoral de la vinorelbina libre (fármaco libre) o scFv conjugado con F5, la vinorelbina inmunoliposomal dirigida contra HER2 preparada usando diversas cantidades de lípido PEG frente a xenoinjertos de carcinoma de mama humano (BT-474) con una sobreexpresión de HER2 en ratones lampiños. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. “Control del vehículo” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 54).
- 50 La Figura 35 muestra la eficacia antitumoral de la vinorelbina libre (NAV libre), la vinorelbina liposomal (NAV Lip) o la vinorelbina inmunoliposomal dirigida contra EGFR (C225-NAV Lip) conjugada con FC225Fab' frente a xenoinjertos de glioblastoma humano (U87) con sobreexposición de EGR en ratones lampiños. “Salino” hace referencia al ratón tratado solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 55).
- 55 La Figura 36 muestra la farmacocinética en sangre del lípido de liposoma y la dinámica de la relación lipídica fármaco/liposoma en la sangre de una rata después de la administración intravenosa del bolo de doxorubicina formulada en liposomas usando el método de sulfato de trietilamonio. (Consulte el Ejemplo 56).
- 60 La Figura 37 muestra la eficacia antitumoral de la doxorubicina liposomal (Ls-Dox) o de la doxorubicina inmunoliposomal dirigida contra HER2 (F5 ILs-Dox) conjugada con scFv F5 preparada usando diversas cantidades de lípido PEG frente a xenoinjertos de carcinoma de mama humano (BT-474) con una sobreexpresión de HER2 en ratones lampiños. La leyenda del panel muestra la cantidad del lípido PEG expresada en mol.% de fosfolípidos de liposoma. “Control salino” hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 57).
- 65 La Figura 38 muestra la farmacocinética en sangre de la vinblastina liposomal en una rata. (Consulte el Ejemplo 58).
- La Figura 39 muestra la dinámica de la relación lipídica de liposoma/fármaco en la sangre de una rata después de una administración intravenosa del bolo de vinblastina liposomal. (Consulte el Ejemplo 58).

La Figura 40 muestra la citotoxicidad *in vitro* de vinblastina libre (VCR libre), vinblastina liposomal (Ls-VCR) o vinblastina inmunoliposomal dirigida a HER2 (F5-ILs-VCR) contra células de cáncer de mama humano SKBr-3 con una sobreexpresión de HER2. (Consulte el Ejemplo 61).

5 La Figura 41 muestra la farmacocinética en sangre del lípido de liposoma en una rata después de la administración intravenosa del bolo de vincristina formulada en liposomas de distinto tamaño promedio (indicados en la leyenda del panel). (Consulte el Ejemplo 62).

10 La Figura 42 muestra la dinámica de la relación lipídica de liposoma/fármaco en una rata después de la administración intravenosa del bolo de vincristina formulada en liposomas de distinto tamaño promedio (indicados en la leyenda del panel). (Consulte el Ejemplo 62).

15 La Figura 43 muestra la eficacia antitumoral de la vincristina libre (VCR libre), la vincristina liposomal preparada con el método de citrato de trietilamonio (citrato Ls-VCR), la vincristina liposomal preparada usando el método de trimetilamonio octasulfato de sacarosa (Ls-VCR SOS), o la vincristina inmunoliposomal dirigida contra HER2 conjugada con scFv F5, preparada usando el método de trimetilamonio octasulfato de sacarosa (F5 ILs-VCR SOS) contra xenoinjertos de cáncer de mama humano (BT-474) con una sobreexpresión de HER2 en ratones. "Control salino" hace referencia a ratones tratados solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 64).

20 La Figura 44 muestra la dinámica de los pesos corporales medios durante el tratamiento de ratones con xenoinjertos de cáncer de mama humano (BT-474) con una sobreexpresión de HER2 con vincristina libre (VCR libre), vincristina liposomal preparada usando el método de citrato de trietilamonio (citrato Ls-VCR), vincristina liposomal preparada usando el método de trimetilamonio octasulfato de sacarosa (Ls-VCR SOS), vincristina inmunoliposomal dirigida contra HER2 conjugada con scFv F5 preparada usando el método de trimetilamonio octasulfato de sacarosa (F5 ILs-VCR SOS), o solo con vehículo (control salino). (Consulte el Ejemplo 64).

25 La Figura 45 muestra la eficacia antitumoral de la vincristina libre (vincristina), la vincristina liposomal (nt-vcr) o la vincristina inmunoliposomal dirigida contra EGFR conjugada con C225 Fab' (C225-vcr) frente a xenoinjertos de cáncer de cerebro humano (U87) con una sobreexpresión de EGFRvIII en ratones lampiños. "Salino" hace referencia al ratón tratado solo con un vehículo exento de fármacos y liposomas. (Consulte el Ejemplo 65).

30 La Figura 46 muestra la farmacocinética en sangre de CPT-11 y la dinámica del porcentaje de CPT-11 presente en la forma activa (lactona) en la sangre de una rata después de la administración intravenosa del bolo de CPT-11 liposomal. (Consulte el Ejemplo 69).

35 La Figura 47 muestra la farmacocinética en sangre de CPT-11 y la dinámica del porcentaje de CPT-11 presente en la forma activa (lactona) en la sangre de una rata después de la administración intravenosa del bolo de solución CPT-11 (CPT-11 libre). (Consulte el Ejemplo 69).

40 **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

La presente descripción se refiere en general a métodos y composiciones de liposomas que son útiles para administrar diversas entidades, especialmente agentes terapéuticos y de formación de imágenes. El descubrimiento de la presente descripción es que el amonio y el polianión sustituidos son útiles para cargar y conservar las entidades, por ejemplo, los compuestos dentro de los liposomas. Por consiguiente, la presente descripción proporciona composiciones de liposomas y kits que contienen amonio y/o polianión sustituido, así como métodos para realizar estas composiciones de liposomas.

Según una característica de la presente descripción, proporciona una composición de liposomas que contienen en su espacio interno uno o varios compuestos de amonio sustituido de una fórmula



en donde cada R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub> es independientemente un hidrógeno o grupo orgánico, y donde al menos un R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub> es un grupo orgánico, como un grupo alquilo, alquilideno, alquilo heterocíclico, cicloalquilo, arilo, alquenoilo o cicloalquelino o bien un derivado hidroxilo sustituido de los anteriores, que incluye opcionalmente dentro de su cadena de hidrocarburos átomos S, O u N, *por ej.* formando un enlace éter (incluyendo un acetal o cetal), éster, sulfuro (tioéter), amina o amida en los anteriores. Si menos de tres de los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, y R<sub>4</sub> son grupos orgánicos, entonces, según esta descripción, al menos uno, y preferiblemente dos, de los grupos orgánicos tienen átomos de carbono secundarios o terciarios (*p. ej.* átomos de carbono que tienen 2 o 3 uniones carbono-carbono, respectivamente) directamente unidos al nitrógeno de amonio, es decir, el amonio sustituido es un amonio con impedimento estérico. En general, la presencia de un amonio tituable, como el ion amonio no sustituido (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), así como los iones alquilamonio de cadena lineal primarios y secundarios en el espacio interior del liposoma de la presente descripción

60

65

se sabe que proporcionan una mejora en la encapsulación de las bases anfífilas débiles, por ejemplo, a través de un mecanismo de carga “activa”, “remota” o “impulsada por gradiente transmembrana” (Haran, y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, v. 1152, pág. 253-258; Maurer-Spurej, y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, v. 1416, pág. 1-10). Sin embargo, estos compuestos de amonio contienen átomos de hidrógeno que entran más fácilmente en reacciones de sustitución nucleofílica y por el contrario reaccionan químicamente con las entidades capturadas en el liposoma. Por lo tanto, pueden afectar negativamente a la integridad química de las entidades durante o después del proceso de carga (captura) de liposomas. Por ello, es deseable que el compuesto de amonio sustituido capturado sea más inerte a nivel químico, sin funciones químicas que son inestables o reactivas con los componentes del liposoma, que pueden incluir una entidad encapsulada. Inesperadamente, los inventores han descubierto que las composiciones de liposomas que contienen en su espacio interno un amonio terciario y cuaternario sustituido no tienen un hidrógeno sustituible, o un amonio primario o secundario con impedimento estérico, donde el acceso a un átomo de hidrógeno de amonio tiene impedimento estérico por un grupo orgánico voluminoso vecino, tal como tener uno o dos átomos de carbono secundarios o terceros asociados a un nitrógeno de amonio, muestran no solo una capacidad de carga de entidad excelente, sino también una mejora de la estabilidad de la entidad con el liposoma capturado, p. ej. un fármaco contra la liberación prematura del liposoma en el cuerpo vivo.

En una realización descrita en la presente memoria, el compuesto de amonio sustituido capturado en el liposoma es inerte a nivel farmacéutico, no genera una respuesta fisiológica adversa cuando se administra a un sujeto vivo, p. ej. un ser humano o un animal, dentro de la cantidad de material de membrana del liposoma que es suficiente para administrar una dosis efectiva de la entidad capturada en el liposoma. En otra realización, el amonio sustituido tiene un nivel de toxicidad aceptable para un sujeto. Normalmente, un nivel de toxicidad aceptable significa que la dosis tóxica, p. ej., una dosis máxima tolerada (MTD), o una dosis que provoca un 50% de letalidad (DL50) del amonio sustituido es al menos dos veces, al menos cuatro veces, al menos ocho veces o al menos diez veces superior a la dosis tóxica de una entidad capturada en el liposoma, p. ej. fármaco, cargado dentro de los liposomas. Por ejemplo, el sulfato de trietilamonio tiene un nivel de toxicidad aceptable ya que su DL50 es de unas 40 veces superior a la DL50 de la doxorubicina, un fármaco anti-cancerígeno. Los niveles de toxicidad de las respuestas fisiológicas de los amonios sustituidos, así como de las entidades de interés, si todavía no se conocen, pueden determinarse fácilmente a través de técnicas rutinarias bien conocidas por las personas expertas en la técnica biomédica. Consulte, entre otros, S.C. Gad. *Drug Safety Evaluation*, Wiley, New York, 2002. En el ejemplo 16 de la presente memoria se describe un método para cuantificar la toxicidad de fármacos formulados libres y/o con liposomas.

En una realización preferida, los grupos orgánicos de sustitución entre R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, o R<sub>4</sub> tienen el tamaño y las propiedades físico-químicas suficientes para garantizar que se forma el amonio sustituido en entornos acuosos sustancialmente una solución verdadera (molecular), pero no ocurre lo mismo con micelas, bicapas o estructuras autoensambladas similares. Por lo tanto, el amonio sustituido tiene preferiblemente poca o sustancialmente nula distribución en la porción de bicapa de los liposomas, reduciendo por tanto el riesgo de desestabilización, solubilización o permeabilización de los liposomas que capturan el amonio sustituido.

El grupo orgánico del amonio sustituido suele ser un hidrocarburo que contiene de forma inclusiva hasta 8 átomos de carbono, hasta 6 átomos de carbono o hasta 4 átomos de carbono y en total los grupos sustituyentes contienen de forma inclusiva hasta 18, hasta 16, hasta 12 o hasta 9 átomos de carbono. Estos grupos hidrocarburo sustituyentes incluyen cualquier combinación de átomos de carbono primarios, secundarios o terciarios unidos entre sí, así como grupos cicloalquilo asociados en sus extremos directamente al nitrógeno de amonio para formar un heterociclo, o a un átomo de carbono de un grupo sustituyente de hidrógeno de amonio. Estos grupos alquilo también pueden incluir heteroátomos, p. ej. oxígeno, nitrógeno o azufre en sus cadenas de carbono para formar un grupo funcional, p. ej. grupo, éter, acetal, amina o sulfuro, así como formar un grupo funcional, p. ej., un grupo hidroxilo, asociado a la cadena de carbono del alquilo. Algunos ejemplos del grupo orgánico de la presente descripción incluyen, sin carácter restrictivo, alquilos, alquilidenos, alquilos heterocíclicos, cicloalquilos, arilos, alquenos o cicloalquenos o sus derivados hidroxilados, p. ej. un alquilideno hidroxilado sustituido que forman un anillo que incluye N en el amonio sustituido.

En otra realización, el amonio sustituido es: un amonio heterocíclico, es decir, un amonio en el que al menos dos de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, o R<sub>4</sub> forman un anillo; un amonio primario con impedimento estérico; o un amonio secundario con impedimento estérico. En general, un amonio primario o secundario con impedimento estérico incluye cualquier amonio sustituido con uno o dos de los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> sustituidos con grupos alquilos que desplazan estéricamente la molécula, p. ej. cualquier amonio sustituido con uno o dos de los R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> sustituidos con uno o dos grupos cicloalquilo o grupos alquilo que tengan al menos un átomo de carbono del alquilo secundario o terciario asociado al nitrógeno del amonio sustituido. Algunos ejemplos de dichos amonios primarios heterocíclicos con impedimento estérico y amonios secundarios con impedimento estérico incluyen, sin ninguna limitación, isopropilamonio, isopropilmetilamonio, disopropilamonio, *terc*-butilmetilamonio, diciticloxilamonio, formas protonizadas de morfolina, piridina, piperidina, pirrolidina, piperazina, *terc*-butilamina, 2-amino-2-metilpropanol-1, 2-amino-2-metil-propanodiol-1,3 y *tris*-(hidroximetil)-aminometano. Estos compuestos de amonio sustituido suelen estar disponibles comercialmente en forma de diversas sales, o están preparados en base a sus aminas correspondientes mediante neutralización con ácidos.

En otra realización, el amonio sustituido es un amonio terciario o cuaternario que incluye, sin carácter restrictivo, trimetilamonio, trietilamonio, tributilamonio, dietilmetilamonio, diisopropilamonio, trisopropilamonio, N-metilmorfolina, N-hidroxietilpiperidina, N-metilpirrolidina y N, N'-dimetilpiperidina, tetrametilamonio, tetraetilamonio y

tetrabutilamonio. Estos compuestos de amonio sustituido suelen estar disponibles comercialmente en forma de diversas sales, o están preparados en base a sus aminas correspondientes mediante neutralización con ácidos.

5 En otra realización, el compuesto de amonio sustituido es un compuesto catiónico global, es decir, bajo las condiciones de la encapsulación de la entidad, normalmente una solución acuosa a un pH de entre aproximadamente pH 2 y aproximadamente pH 8 lleva una carga positiva neta, *p. ej.* como resultado de la ionización (prontación) del átomo de nitrógeno.

10 En otra realización, el compuesto de amonio sustituido primario, secundario o terciario encapsulado en liposomas tiene un logaritmo negativo de la constante de disociación ácida (desprontación) (pKa) de al menos aproximadamente 8,0, de al menos aproximadamente 8,5 al menos aproximadamente 9,0, al menos el 9,5, o de al menos aproximadamente 10,0, según se ha determinado en una solución acuosa diluida a temperatura ambiente (normalmente 25 °C). El parámetro pKa es una característica bien conocida de los compuestos de amonio que suele caracterizar la fuerza de sus propiedades básicas, y los métodos para la determinación del pKa son convencionales y rutinarios en esta técnica. Los valores pKa para muchas aminas y sus formas protonadas (amonios) aparecen en los libros de referencia de química y farmacología. Consulte, por ejemplo, IUPAC Handbook of Pharmaceutical Salts, ed. por P.H. Stahl and C.G. Wermuth, Wiley-VCH, 2002; CRC Handbook of Chemistry and Physics, 82ª Edición, ed. por D.R. Lide, CRC Press, Florida, 2001, p. 8-44 a 8-56. En general, un valor pKa alto caracteriza las bases más fuertes. Los compuestos de amonio sustituido ilustrativos y de amonio no sustituido (enumerados como sus bases de amina conjugada) tienen los siguientes valores pKa: pirrolidina, 11,31; piperidina, 11,12; diisopropilamina, 11,05; dietilamina, 10,93; trietilamina, 10,75; dimetilamina, 10,73; terc-butilamina, 10,68; ciclohexilamina, 10,66; metilamina, 10,66; etilamina, 10,65; propilamina, 10,54; Isopropilamina, 10,53; N-etilpiperidina, 10,45; dicitclohexilamina; 10,4; N-metilpiperidina, 10,38; dietilmetilamina, 10,35; dimetilpropilamina, 10,15; trimetilamina, 9,8; piperazina, 9,73 (I),5,33 (II); 2-amino-2-metilpropanol, 9,69; N,N'-dimetilpiperazina, 9,66 (I),52 (II); dietil-(2-hidroxietyl)amina, 9,58; etanolamina, 9,5; N-hidroxietylpirrolidina, 9,44; dietanolamina, 9,28; amoniaco, 9,27; dimetil-(2-hidroxietyl)amina, 8,83; 2-amino-2-metilpropanodiol-1,3, 8,8; morfolina, 8,5; tris-(hidroximetil)-aminometano, 8,3; N-metilglucamina, 8,03; trietanolamina, 7,76; N-etilformolina, 7,67; N-hidroxietylformolina, 7,39; imidazol, 7,03; piridina, 5,23. Como norma general, la sustitución del grupo alquilo o cicloalquilo por un hidrógeno en un compuesto de amonio aumenta el valor pKa. En particular, las múltiples funciones de hidroxilo o éter en los grupos alquilo sustituyentes, o la presencia de aromaticidad en un grupo heterocíclico que contiene nitrógeno, reducen el valor pKa respecto del amonio sustituido similar sin funciones de hidroxilo o éter. Los compuestos con más de un grupo de amonio suelen tener el pKa del segundo y posterior grupo de amonio muy inferior al primero. Los inventores han descubierto de forma inesperada que el amoniaco sustituido con valores kPa más altos, es decir, formado por aminas más intensamente básicas, era más efectivo que los amonios formados con aminas más débiles a la hora de estabilizar el fármaco dentro de los liposomas. Por ejemplo, tanto las sales IHP como las SOS de trietilamonio (pKa = 10,75) fueron más notablemente efectivas que las sales correspondientes de trietanolamonio (pKa = 7,76) a la hora de estabilizar el irinotecán dentro de los liposomas in vivo (Ejemplo 73).

40 El amonio sustituido contenido en la composición del liposoma puede estar en cualquier forma adecuada, *p. ej.* sal. Las sales adecuadas son las sales aceptables para uso farmacéutico. Consulte, *por ejemplo*, P.H. Stahl, C.G. Wermuth (eds), *Handbook of Pharmaceutical Salts*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002. En una realización, el amonio sustituido es una sal que contiene uno o varios polianiones. De manera óptima, el contraión (anión) en la sal de amonio sustituido vuelve la sal soluble en agua, es inerte a nivel farmacéutico, puede formar precipitados o geles cuando entra en contacto con una entidad terapéutica o detectable, y/o es menos permeable a través de la membrana del liposoma que el amonio sustituido o su forma de amina no disociada. En general, las sales de amonio sustituido forman una verdadera solución en *p. ej.*, el espacio acuoso intraliposomal, y no forma una cantidad significativa de fase condensada como la fase cristalina, gel, bicapa o micela. La cantidad relativa de un amonio sustituido y un anión con formación de sal, *p. ej.* un polianión, está en el punto de equivalencia estequiométrico o cerca de este, y normalmente tiene el pH dentro del intervalo 3-9, más a menudo, pH 4-8, dependiendo, por ejemplo, de la constante de disociación de la base conjugada del ion amonio sustituido.

55 En general, el amonio sustituido está contenido dentro, es decir, es el espacio interno de los liposomas. En una realización, el amonio sustituido se extrae parcial o completamente de forma sustancial del medio externo que rodea los liposomas. Dicha extracción puede realizarse usando un medio adecuado conocido por un experto en la materia, *p. ej.* dilución, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de exclusión por tamaños, diálisis, ultrafiltración, precipitación, etc.

60 Según otra característica de la presente descripción, proporciona una composición de liposomas que contiene un polianión. El polianión de la presente descripción puede ser cualquier entidad química adecuada con más de un grupo cargado negativamente que provoca una carga iónica negativa de más dos unidades en, *por ejemplo*, el espacio acuoso interno del liposoma. El polianión de la presente descripción puede ser un anión divalente, un anión trivalente, un anión polivalente, un anión polivalente polimérico, un poliol polianionizado o un azúcar polianionizado. El sulfato, el fosfato, el pirofosfato, el tartrato, el succinato, el maleato, el borato y el citrato son, sin limitación, los ejemplos de estos aniones divalentes y trivalentes. En una realización preferida, el polianión de la presente descripción es un polímero polianiónico que tiene una estructura principal orgánica (carbono) o inorgánica, y una pluralidad de grupos funcionales aniónicos, *p. ej.* grupos funcionales inonizables a una carga negativa en solución acuosa neutra, e integrados o anexos a la estructura principal. Un polímero es un compuesto

natural o sintético, normalmente de alto peso molecular, que está formado por unidades asociadas repetidas, y cada una tiene una molécula simple y relativamente ligera. Algunos ejemplos de polímeros polianiónicos son polifosfatos, polivinilsulfatos, polivinilsulfonatos, polímeros poliacrílicos anionizados, *p. ej.* poliaminas polisulfonadas anionizadas, como la poli(etileno imina) polisulfonada; polisacáridos polisulfatados, policarboxilados o polifosforilados; poliaminoácidos ácidos; polinucleótidos; otros polímeros polifosforilados, polisulfatados, polisulfonados, poliborados o policarboxilados. Estos polímeros y aniones polivalentes son bien conocidos en la materia y muchos están disponibles comercialmente. Un anión polimérico de la presente descripción es preferiblemente biodegradable, es decir, capaz de descomponer las unidades no tóxicas dentro del organismo vivo. Un ejemplo de anión polimérico biodegradable es polifosfato.

En otra realización preferida, el polianión es un poliol polianionizado o un azúcar polianionizado. Un poliol es una molécula orgánica que tiene una pluralidad de grupos hidroxilo asociados a una estructura principal de carbono lineal, ramificado o cíclico. Además, un poliol puede caracterizarse en otros términos como un compuesto polihidroxilado. Preferiblemente, una mayoría de átomos de carbono en un poliol son hidroxilados. Los polioles (alcoholes poliatómicos) son moléculas muy conocidas en esta materia. Pueden usarse polioles de cadena lineal (recta o ramificada) y polioles cíclicos. Algunos ejemplos de polioles de la presente descripción son, sin carácter restrictivo: etilenglicol; glicerol, treitol, eritritol, pentaeritritol, manitol, glucitol, sorbitol, sorbitán, xilitol, lactitol, maltitol, fructitol e inositol. Un azúcar suele estar formado por un acetal cíclico, un cetol cíclico, una cetona o un grupo aldehído, o un aducto de los anteriores, dentro de un grupo de átomos de carbono unidos entre sí predominantemente hidroxilados hidroxilados. Los azúcares son compuestos que se producen de forma natural. La hidrólisis de azúcares en medios acuosos genera unidades conocidas como monosacáridos. Normalmente, en una solución acuosa, una molécula de azúcar monosacárido de cinco o seis átomos de carbono forma una estructura de anillo de tipo hemiacetal cíclico. Preferiblemente, los azúcares de las presentes descripciones son monosacáridos o disacáridos, es decir, están formados por una o varias unidades monosacáridas, cada una con de tres a siete, preferiblemente de tres a seis átomos de carbono. Algunos ejemplos de azúcar de la presente descripción son, sin limitación, hexosas monosacáridas, como glucosa (dextrosa), galactosa, manosa, fructosa; pentosas monosacáridas, como la xilosa, ribosa, arabinosa y disacáridos como lactosa, trehalosa, sacarosa, maltosa y celobiosa. También pueden usarse compuestos formados por varias unidades de azúcar unidas entre sí formando un anillo (ciclodextrinas) y sus derivados. La reducción de azúcares es un método para obtener polioles. Se prefieren los disacáridos más estables “no reductores” y no metabolizables, tales como sacarosa o trehalosa. Varios polioles, monosacáridos y disacáridos están disponibles comercialmente.

Un poliol o azúcar polianionizado es un poliol o un azúcar que tiene sus grupos hidroxilos completa o parcialmente modificados o sustituidos con grupos aniónicos (anionizados). Por lo tanto, un azúcar polianionizado o un poliol polianionizado está formado por una fracción de poliol o una fracción de azúcar junto con los grupos aniónicos asociados a la misma. Algunos ejemplos de grupos aniónicos incluyen, sin ninguna limitación, carboxilato, carbonato, tiocarbonato, ditiocarbonato, fosfato, fosfonato, sulfato, sulfonato, nitrato y borato. Es preferible que al menos un grupo aniónico de un azúcar polianionizado o poliol sea un grupo aniónico fuerte, es decir, que esté ionizado en más del 50% dentro del intervalo amplio de pH, *p. ej.* pH 3-12, preferiblemente, pH 2-12, cuando esté en un medio acuoso o, alternativamente, tenga un log de la constante de disociación ( $pK_a$ ) de 3 o menos, preferiblemente 2 o menos. La polianionización de un poliol o un azúcar puede conseguirse por diversos procesos químicos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la reacción de los polioles y/o azúcares con el trióxido de azufre o el ácido clorosulfónico en la piridina o 2 picolina hace que algunos o todos los grupos hidroxilos se esterifiquen con residuos de ácido sulfúrico (sulfatados), proporcionando un azúcar polisulfatado o poliol. Un ejemplo de azúcar sulfatado de la presente descripción es la sacarosa sulfatada, incluyendo, sin limitación, hexasulfato de sacarosa, heptasulfato de sacarosa y octasulfato de sacarosa (Consulte Ochi. K., y col., 1980, *Chem. Pharm. Bull.*, v. 28, pág. 638-641). El azúcar sulfatado de la presente invención es octasulfato de sacarosa. De forma similar, la reacción con oxicluro de fósforo o clorofosfato de dietilo en presencia de un catalizador básico da como resultado azúcares o polioles polifosforilados. Los polioles polifosforilados también se aíslan de las fuentes naturales. Por ejemplo, los polifosfatos de inositol, como hexafosfato de inositol (ácido fítico) se aíslan del maíz. Diversos polioles y azúcares sulfatados, sulfonados y fosforilados adecuados para practicar la presente descripción se enumeran, *p. ej.* en las patentes US-5.783.568 y US-5.281.237. Se descubrió inesperadamente que los compuestos polianionizados polihidroxilados solo con etapas de disociación ácida fuertes, *p. ej.* los grupos con un  $pK_a$  inferior a 3,0, preferiblemente inferior a 2,0 como, por ejemplo, los monoésteres de sulfato ( $pK_a$  de 1,0 o menos), proporcionan una encapsulación liposomal con una mejor retención del fármaco que los compuestos polianionizados polihidroxilados que tienen también etapas de disociación ácida débiles, como los monoésteres de fosfato (etapa 1,  $pK_a$  de aproximadamente 1,5.; etapa 2,  $pK_a$  de aproximadamente 6,7.; consulte Stahl and Wermuth, *Op. cit.*, 2002). El ejemplo 73 siguiente ilustra este descubrimiento. La complejación de polioles y/o azúcares con más de una molécula de ácido bórico genera un producto polioanionizado (poliborado). La reacción de polioles y/o azúcares con disulfuro de carbono en presencia de álcalis genera derivados polianionizados (poliditiocarbonatado, polixantogenato). Un derivado de azúcar o poliol polianionizado puede aislarse en la forma de un ácido libre y neutralizarse con una base adecuada, por ejemplo, con un hidróxido de metal alcalino, hidróxido de amonio o preferiblemente con una amina sustituida, *p. ej.* amina correspondiente a un amonio sustituido de la presente descripción, en estado puro o en estado de hidróxido de amonio sustituido proporcionando una sal polianiónica de un amonio sustituido de la presente descripción. Alternativamente, puede aislarse un sal de sodio, potasio, calcio, bario o magnesio de un azúcar/poliol polianionizado y convertirla en una forma adecuada, *p. ej.* una forma de sal de amonio sustituido, por cualquier método conocido, por ejemplo, por intercambio de iones.

5 El polianión de la presente descripción suele tener una densidad de carga de al menos dos, tres o cuatro grupos cargados negativamente por unidad, *p. ej.*, por átomo de carbono o anillo en una cadena de carbono o por unidad monosacárida en un azúcar. El poliol cíclico o azúcar polianionizado de la presente descripción tiene preferentemente el 75% como mínimo de grupos hidroxilo disponibles polianionizados, y más preferiblemente el 100% de grupos hidroxilo disponibles polianionizados. Además, la polianionización dentro de los liposomas suele estar en un nivel compatible con o que facilita la administración y liberación de la entidad capturada dentro de los liposomas en el lugar de su acción previsto, pero reduce la liberación de la entidad capturada de forma prematura, *es decir*, antes de que el liposoma llegue al lugar de la acción prevista.

10 El grado de polianionización dentro de los liposomas puede usarse para regular las características de liberación, *p. ej.* coeficiente y cinética de liberación de una entidad capturada dentro de los liposomas. En general el grado de polianionización puede evaluarse en función de la cantidad de poliol o azúcar polianionizado respecto de la cantidad total de aniones o si solo hay un polianión, el porcentaje de polianionización respecto de la capacidad total de polianionización del polianión, *p. ej.* poliol o azúcar polianionizado o una mezcla de los anteriores dentro de los liposomas. En una realización, el poliol o azúcar polianionizado se mezcla con uno o varios de los diferentes aniones y cuanto menor sea la cantidad de poliol o azúcar polianionizado sobre la cantidad de los diferentes aniones, más rápido se liberará la entidad de los liposomas.

20 Normalmente, si una entidad capturada se libera de los liposomas en el lugar de su acción prevista con demasiada lentitud, el coeficiente de liberación deseado de la entidad puede conseguirse usando una mezcla de poliol o azúcar polianionizado con uno o varios aniones monovalentes o polivalentes, *p. ej.* cloro, sulfato, fosfato, etc. Alternativamente, se pueden usar mezclas de polioles o azúcares polianionizados con varios grados de polianionización. En una realización, el grado de polianionización dentro de los liposomas se encuentra entre 0,1% a 99%, 10% a 90%, o 20% a 80% del(de los) anión(ones) totales dentro de los liposomas, *p. ej.* con una entidad capturada.

25 En general, la composición del liposoma puede contener uno o varios polianiones en cualquier forma adecuada, *p. ej.* en forma de ácido o sal formado por un polianión y un catión. La cantidad de polianiones, *p. ej.* poliol o azúcar polianionizado puede ser estequiométricamente equivalente o diferir de la cantidad del catión. En una realización, la composición del liposoma contiene una o varias sales de polianión de un catión, donde existe un gradiente de concentración de cationes o un gradiente de pH presente a través de la membrana del liposoma. En otra realización, la composición del liposoma contiene una o varias sales de polianión de amonio sustituido. En otra realización, la composición del liposoma contiene el polianión dentro de los liposomas, mientras que el polianión en el medio que contiene los liposomas es extraído parcial o sustancialmente por cualquier medio adecuado conocido y por un experto en la materia, *p. ej.* dilución, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de exclusión por tamaños, diálisis, ultrafiltración, absorción, precipitación, etc. En otra realización adicional, el liposoma con el polianión capturado, *p. ej.* azúcar polianionizado o poliol polianionizado, también tiene una gradiente transmembrana efectivo a la hora de conservar las sustancias dentro del liposoma. Algunos ejemplos de dichos gradientes transmembrana son el gradiente de pH, el gradiente del potencial electroquímico, el gradiente del ion amonio, el gradiente del ion amonio sustituido o el gradiente de solubilidad. Un gradiente de amonio sustituido suele incluir una forma sustituida de ion amonio formada por un enlace C-N como mínimo, como amonio primario, cuaternario, terciario o cuaternario. Los métodos para crear gradientes transmembrana son rutinarios en materia de liposomas.

45 Según otra característica de la presente descripción, la composición del liposoma de la presente descripción contiene uno o varios amonios sustituidos y/o polianiones de la presente descripción y una entidad química o biológica, *p. ej.* entidad terapéutica o detectable. Por ejemplo, la entidad contenida en la composición de liposoma de la presente descripción puede ser un agente terapéutico, tinta, colorante, compuesto magnético, fertilizante, señuelo, biocatalizador, sustancia que modifica el sabor o el olor, lejía o cualquier entidad que sea detectable por medio de métodos adecuados y conocidos en la materia, *p. ej.* técnicas de obtención de imagen por resonancia magnética (IRM), formación de imágenes ópticas, formación de imágenes fluorescente/luminiscente o formación de imágenes nuclear. De forma conveniente, una entidad contenida o cargada en la composición del liposoma de la presente descripción es una entidad básica débil y con membrana permeable (lipofílica). *p. ej.* entidad con contenido de amina o entidad con nitrógeno base.

55 En una realización, la entidad contenida en la composición del liposoma de la presente descripción es un agente terapéutico.

En otra realización, la entidad contenida en la composición del liposoma es una entidad anticancerígena. A continuación se muestra una lista de agentes antineoplásicos conocidos comúnmente, homologados comercialmente (o en fase de desarrollo) mediante clasificación.

60 Clases según la estructura: Fluoropirimidinas--5-FU, Fluorodesoxiuridina, Ftorafur, 5'-desoxifluorouridina, UFT, S-1 Capecitabina; nucleósidos de pirimidina --desoxicidina, arabinósido de citosina, 5-Azacitosina, Gemcitabina, 5-Azacitosina-Arabinosido; Purinas--6-Mercaptopurina, Tioguanina, Azatioprina, Alopurinol, Cladribina, Fludarabina, Pentostatina, 2-Cloro Adenosina; Análogos de platino-Cisplatino, Carboplatino, Oxaliplatino, Tetraplatino, Platino-DACH, Ormaplatino, CI-973, JM-216; Antraciclina/ antracenedionas--Doxorrubicina, Daunorrubicina, Epirubicina, Idarrubicina, Mitoxantrona; Epipodofilotoxinas--Etopósido, Tenipósido; Camptotecinas--Irinotecán, Topotecán, Lurtotecán, Silatecán, 9-Amino Camptotecina, 10,11-metilendioxi Camptotecina, 9-Nitro Camptotecina, TAS 103, 7-(4-metil-piperazino-metileno)-

10,11-etilendioxi-20(S)-camptotecina, 7-(2-N-isopropilamino)etil)-20(S)-camptotecina; Hormonas y análogos de hormonas--Dietilestilbestrol, Tamoxifeno, Toremifeno, Tolmudex, Thymitaq, Flutamida, Bicalutamida, Finasterida, Estradiol, Trioxifeno, Droloxifeno, Acetato de Medroxiprogesterona, Acetato de Megesterol, Aminoglutetimida, Testolactona y otros; Enzimas, Proteínas y Anticuerpos--Asparaginasa, Interleuquinas, Interferones, Leuprolide, Pegaspargasa y otros; Alcaloides de la vinca--Vincristina, Vinblastina, Vinorelbina, Vindesina; Taxanos--Paclitaxel, Docetaxel.

Clases según el Mecanismo: Antihormonales--Consulte la clasificación para hormonas y análogos hormonales, Anastrozol; Antifolatos--Metotrexato Aminopterina, Trimetrexato, Trimetoprima, Piritexima, Pirimetamina, Edatrexato, MDAM; Agentes antimicrotúbulos--Taxanos y alcaloides de la vinca; Agentes alquilantes (clásicos y no clásicos)--Mostazas nitrogenadas (Mecloretamina, Clorambucilo, Melfalán, Mostaza de uracilo), Oxazafosforinas (Ifosfamida, Ciclofosfamida, Perfosfamida, Trofosfamida), Alquil sulfonatos (Busulfan), Nitrosoureas (Carmustina, Lomustina, Estreptozocina), Tiotepa, Dacarbacina y otros; Antimetabolitos--Purinas, pirimidinas y nucleósidos, enumerados anteriormente; Antibióticos--Antraciclinas/Antracenedionas, Bleomicina, Actinomicina, Mitomicina, Plicamicina, Pentostatina, Estreptozocina; Inhibidores de la topoisomerasa--Camptotecinas (Topo I), Epipodofilotoxinas, m-AMSA, Elipticinas (Topo II); Antivirales--AZT, Zalcitabina, Didanosina y otros; Agentes citotóxicos varios--Hidroxiurea, Mitotano, Toxinas de fusión, PZA, Briostatina, Retinoides, Ácido butírico y derivados, Pentosan, Fumagilina y otros.

Además de lo anterior, una entidad anticancerígena incluye, sin ninguna limitación, cualquier inhibidor de topoisomerasa, alcaloide de la vinca, p. ej. vincristina, vinblastina, vinorelbina, vinflunina y vinctetina, agente desestabilizador o despolimerizador de microtúbulos, agente estabilizador de microtúbulos, p. ej. taxano, análogo de aminoalquilo o aminoácido de paclitaxel o docetaxel, p. ej. 2'-[3-(N,N-Dietilamino)propionil]paclitaxel, 7-(N,N-Dimetilglicil)paclitaxel y 7-L-alanilpaclitaxel, agente alquilante, agente de unión al receptor, inhibidor de la tirosina quinasa, inhibidor de fosfatasa, inhibidor de quinasas dependiente de ciclina, inhibidor enzimático, inhibidor de aurora quinasa, nucleótido, polinucleótido e inhibidor de farnesil transferasa.

En otra realización, la entidad contenida en la composición de liposomas de la presente descripción es un agente terapéutico de compuestos o derivados de antraciclinas, compuestos o derivados de camptotecina, compuestos o derivados de elipticina, alcaloides o derivados de la vinca, wortmanina, sus análogos y derivados, o compuestos de pirazolopirimidina con las propiedades inhibitorias de aurora quinasa.

En otra realización, la entidad contenida en la composición de liposomas de la presente descripción es un fármaco de antraciclina, doxorubicina, daunorrubicina, mitomicina C, epirubicina, pirarubicina, rubidomicina, carcinomicina, N-acetiladriamicina, rubidazona, 5-imidodaunomicina, N-acetildaunomicina, daunorilina, mitoxantrona; un compuesto de camptotecina, camptotecina, 9-aminocamptotecina, 7-etilcamptotecina, 10-hidroxicamptotecina, 9-nitrocampptotecina, 10,11-metilenedioxycamptotecina, 9-amino-10,11-metilenedioxycamptotecina, 9-cloro-10,11-metilenedioxycamptotecina, irinotecán, topotecán, lurtotecán, silatecán, (7-(4-metilpiperazinometileno)-10,11-etilenedioxi-20(S)-camptotecina, 7-(4-metilpiperazinometileno)-10,11-metilenedioxi -20(S)-camptotecina, 7-(2-N-isopropilamino)etil)-(20S)-camptotecina; un compuesto de elipticina, elipticina, 6-3-aminopropil-elipticina, 2-dietilaminoetil-ellipticinio y sales del mismo, detaliptio, reteliptina.

En otra realización, la entidad contenida en el liposoma de la presente descripción es una entidad farmacéutica que incluye, entre otros, cualquiera de los siguientes: derivados de etilendiamina antihistamínica (bromfenifamina, difenhidramina); Antiprotozoarios: quinolonas (yodoquinol); amidinas (pentamidina); antihelmínticos (pirantel); fármacos anti-esquistosoma (oxaminiquina); derivados del triazol antimicótico (fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol); cefalosporinas antimicrobianas (cefazolina, cefonicida, cefotaxima, ceftazimida, cefuoxima); derivados betalactámicos antimicrobianos (aztreopam, cefmetazol, cefoxitina); antimicrobianos del grupo de eritromicinas (eritromicina, azitromicina, claritromicina, oleandomicina); penicilinas (bencilpenicilina, fenoximetilpenicilina, cloxacilina, metilicina, nafcilina, oxacilina, carbenicilina); tetraciclinas; otros antibióticos antimicrobianos, novobiocina, espectinomicina, vancomicina; fármacos antimicrobacterianos: ácido aminosalicílico, capreomicina, etambutol, isoniacida, pirazinamida, rifabutina, rifampicina, clofazima; adamantanos antivirales: amantadina, rimantadina; derivados de la quinidina: cloroquina, hidroxicloroquina, promaquina, qionona; qionolonas antimicrobianas: ciprofloxacina, enoxacina, lomefloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ofloxacina; sulfonamidas; antimicrobianos para el tracto urinario: metenamina, nitrofurantoína, trimetoprim; nitroimidazoles: metronidazol; compuestos de amonio cuaternario colinérgicos (ambetinio, neoestigmina, fisostigmina); aminoacridinas para tratamiento del Alzheimer (tacrina); fármacos para tratamiento del Parkinson (bentropina, biperideno, procyclidina, trihexilhenidilo); agentes anti-muscarínicos (atropina, hiosciamina, escopolamina, propantelina); dopaminas adrenérgicas (albuterol, dobutamina, efedrina, epinefrina, norepinefrina, isoproterenol, metaproperenol, salmetrol, terbutalina); derivados de ergotamina; relajantes musculares o derivados de curare; relajantes musculares de acción central; baclofén, ciclobenzepina, dentroleno; nicotina; beta-adrenobloqueantes (acebutilo, amiodarona); benzodiazepinas (ditiagem); fármacos anti-arrítmicos (diisopiramide, encaidina, series de anestesia local--procaina, procainamida, lidocaina, flecaimida), quinidina; inhibidores de ACE: captoprilo, enalaprilat, fosinoprol, quinaprilo, ramiprilo; antilipídemicos: fluvastatina, gemfibrosilo, inhibidores de HMG-coA (pravastatina); fármacos hipotensivos: clonidina, guanabenz, prazocina, guanetidina, granadril, hidralazina; y vasodilatadores no coronarios: dipiridamol.

Según la presente descripción, la entidad contenida en la composición del liposoma de la presente descripción también puede ser una pre-entidad, p. ej. un pro-fármaco o un agente que es capaz de convertirse en una entidad deseada

después de uno o varias etapas de conversión bajo una condición como un cambio en el pH o una separación enzimática de la unión lábil. Dicha conversión puede producirse después de la liberación del pro-fármaco desde el interior del liposoma en el lugar previsto de la acción del fármaco/liposoma. Sin embargo, la pre-entidad puede convertirse en la entidad activa deseada dentro de los liposomas de la presente descripción antes de usar los liposomas como vehículo de entrega, *p. ej.* administración a un paciente. Por ejemplo, una entidad puede modificarse en una pre-entidad para que sea más fácil cargarla en los liposomas y después volver a convertirla en la entidad deseada una vez que esté dentro de los liposomas de la presente descripción. De esta forma, según la presente descripción, las entidades que en general no son susceptibles del proceso “activo”, “remoto” u otros métodos de carga basados en el gradiente, pueden cargarse de forma efectiva en los liposomas, *p. ej.* en el espacio interno del liposoma, en su forma nativa no modificada.

A nivel global, los compuestos catiónicos, es decir, los compuestos capaces de llevar una carga iónica positiva neta bajo las condiciones de carga del liposoma, especialmente los compuestos que contienen una amina titulable, se sabe que pueden cargarse de forma efectiva en los liposomas que exhiben gradientes de iones transmembrana. Si una entidad de interés es un compuesto orgánico y no un compuesto catiónico global con una amina titulable, puede prepararse un derivado del mismo con las propiedades iónicas necesarias usando una modificación apropiada, *p. ej.* siguiendo los métodos descritos en Woodle y col., en WO 96/25147. Por ejemplo, es posible introducir un grupo amina mediante la esterificación de un grupo hidroxilo de la entidad con un aminoácido. Alternativamente, puede introducirse un grupo hidrofóbico en un compuesto soluble en agua para facilitar su partición en la membrana del liposoma y atravesar posteriormente la membrana hasta el compartimento intraliposomal. *p. ej.* dentro de los liposomas. Otra modificación útil para crear una pre-entidad cargable en el liposoma es la formación de un aducto de grupo carbonilo, *p. ej.* una hidrazona, una oxima, un acetal o un cetal. Un grupo que contiene un amino modificado puede hidrolizarse o dividirse químicamente de otra forma del compuesto modificado después de la carga del compuesto modificado en los liposomas según la presente invención. Los procesos típicos para regenerar intraliposomalmente la entidad desde una pre-entidad son la hidrólisis, la fotólisis, la radiólisis, la tiólisis, la amonólisis, la reducción, la sustitución, la oxidación o la eliminación. Estos procesos pueden realizarse, sin limitación, mediante el cambio del pH o mediante una acción enzimática. Por ejemplo, paclitaxel o docetaxel, unas entidades no iónicas, se convierten en sus ésteres de 2'-(dietilaminopropionilo)- o 7'-(dietilaminopropionilo), que son bases débiles (pre-entidades). Después de cargarlos en los liposomas usando cualquier método conocido, incluidos, sin limitación, los métodos “activo”, “remoto”, “basado en gradiente transmembrana” o “basado en gradiente de solubilidad”, y/o los métodos de la presente descripción, el 2'-(dietilaminopropionilo)-paclitaxel intraliposomal se convierte en el paclitaxel original estimulando su hidrólisis a través del aumento del pH a un valor superior a pH 7,0. De esta forma, el liposoma que encapsula una molécula de taxano neutro en su espacio interno se obtiene con la relación fármaco/lípido de más de 0,05 moles del lípido del liposoma, sin la ayuda de las modificaciones covalentes hidrofílicas de la molécula de taxano (*p. ej.* mediante la fijación de PEG), complejos de taxano ciclodextrinado, o tensioactivos de formación de micelas y solubilizantes del taxano.

Los liposomas contenidos en la composición liposomal de la presente descripción pueden ser cualquier liposoma conocido o descubierto posteriormente en la materia. En general, los liposomas de la presente invención pueden tener cualquier estructura liposomal. *p. ej.* estructuras con un espacio interno aislado del medio exterior por una o varias bicapas lipídicas, o cualquier microcápsula que tenga una membrana semi-permeable con una parte central lipofílica donde la membrana aísla un interior. Una bicapa lipídica puede ser cualquier combinación de moléculas anfifílicas caracterizadas por una parte hidrofílica (fracción hidrofílica) y una parte hidrofóbica (fracción hidrofóbica). Normalmente, las moléculas anfifílicas en una bicapa se ordenan en láminas bidimensionales en las cuales las fracciones hidrofóbicas se orientan hacia dentro de la lámina, mientras que las fracciones hidrofílicas se orientan hacia fuera. Las moléculas anfifílicas que forman los liposomas pueden ser cualesquiera moléculas anfifílicas conocidas o descubiertas posteriormente, *p. ej.* lípidos de origen natural o sintético o lípidos biocompatibles. Los liposomas también pueden formarse por tensioactivos y polímeros anfifílicos, *p. ej.* polimerosomas y niosomas. Para los efectos de esta descripción, sin carácter restrictivo, estos materiales que forman liposomas también reciben el nombre de “lípidos”.

Según la presente invención, los liposomas contenidos en la composición liposomal de la presente invención también pueden ser liposomas diana, *p. ej.* liposomas que contienen una o varias fracciones diana o modificadores de biodistribución en la superficie de los liposomas. La fracción diana puede ser cualquier agente que sea capaz de unir o interactuar específicamente con un compuesto diana deseado. En una realización, una fracción diana es un ligando. El ligando, según la presente invención, se une preferiblemente y/o se internaliza en una célula en la que la entidad capturada en el liposoma ejerce un efecto deseado (una célula diana). Un ligando suele ser un miembro de una molécula asociada donde el segundo miembro está presente en las células diana o en un tejido que forma la célula diana. Algunos ejemplos de ligandos adecuados para la presente invención son: ácido fólico, proteínas, *p. ej.* transferrina, factor de crecimiento, enzima, péptido, receptor, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tales como Fab', Fv, Fv de cadena única, anticuerpo de dominio único o cualquier otro polipéptido que contenga secuencias de unión de antígenos (CDR) de una molécula de anticuerpo. Un liposoma diana de ligando donde una fracción diana es un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno objetivo recibe el nombre de inmunoliposoma. En una realización preferida, el liposoma que porta una fracción diana, *p. ej.* un ligando, es internalizado por una célula diana. En otra realización, una fracción diana es un ligando que interactúa específicamente con un receptor de tirosina quinasa como, por ejemplo, los receptores EGFR, HER2, HER3, HER4, PD-GFR, VEGFR, bFGFR o IGFR. En otra realización, la fracción diana interactúa específicamente con un receptor de factor de crecimiento, un receptor de factor angiogénico, un receptor de transferrina, una molécula de adhesión celular o un receptor de vitamina.

Según otra realización, los liposomas contenidos en la composición liposomal presentan un gradiente de concentración transmembrana de un amonio y/o polianión sustituido. Preferiblemente, la concentración es alta en el espacio interior (interno) de los liposomas. Además, la composición liposomal puede incluir uno o varios gradientes transmembrana además del gradiente creado por el amonio y/o polianión sustituido. Por ejemplo, los liposomas contenidos en la composición liposomal pueden incluir adicionalmente un gradiente de pH transmembrana, un gradiente iónico, un gradiente de potencial electroquímico y/o un agente de solubilidad.

Según otra realización de la presente invención, la composición liposomal de la presente invención puede proporcionarse en un kit formado por un contenedor con los liposomas, y opcionalmente, un contenedor con la entidad y una instrucción, *p. ej.* procedimientos o información relacionados con la utilización de la composición liposomal en una o varias aplicaciones. Dicha instrucción puede proporcionarse a través de cualquier medio, *p. ej.* copia en papel físico, medio electrónico, o acceso a una base de datos o página web que contiene la instrucción.

La composición de la membrana liposomal de la presente invención puede realizarse por medio de cualquier método conocido o descubierto posteriormente por parte de un experto en la materia. En general, pueden usarse varios componentes lípidos para preparar los liposomas. Los componentes lípidos suelen incluir, pero no de forma limitativa, (1) componentes lípidos sin carga, *p. ej.* colesterol, ceramida, diacilglicerol, acil(poliéteres) o alquilpoli(éteres); (2) fosfolípidos neutros, *p. ej.* diacilfosfatidilcolinas, esfingomielinas y diacilfosfatidiletanolaminas, (3) lípidos aniónicos, *p. ej.* diacilfosfatidilserina, diacilfosfatidilglicerol, diacilfosfatidato, cardiolipina, diacilfosfatidylinositol, diacilglicerolemisuccinato, diacilglicerolhemiglutarato, colesterilhemisuccinato, colesterilhemiglutarato y similares; (4) lípidos conjugados con polímero, *p. ej.* N-[metoxi-(poli(etilenglicol)diacilfosfatidiletanolamina, poli(etilenglicol)-diacilglicerol, poli(etilenglicol)-ceramida; y (5) lípidos catiónicos, *p. ej.* 1,2-diacil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), bromuro de dimetildiocetadecilamonio (DDAB) y 1,2-diacil-sn-glicero-3-etilfosfocolina. Pueden emplearse derivados de monoacilo sustituidos de estos lípidos, así como análogos de dialquilo y monoalquilo.

Pueden seleccionarse varios componentes de lípidos para realizar, modificar o transmitir una o varias funciones deseadas. Por ejemplo, el fosfolípido puede emplearse como lípido formador de la vesícula principal. La inclusión del colesterol es útil para mantener la rigidez de la membrana y reducir la fuga de fármaco. Los lípidos conjugados de polímero pueden usarse en la formulación liposomal para aumentar la vida útil de la circulación reduciendo la separación del liposoma mediante el hígado y el bazo, o para mejorar la estabilidad de los liposomas frente a la agregación durante su almacenamiento, en ausencia de un efecto de alargamiento de la circulación. Por otro lado, la inclusión de los lípidos-PEG en una cantidad de 1% en moles o superior del lípido liposomal se ha demostrado que tiene una prolongación de varias veces el tiempo de circulación en sangre del liposoma (consulte *p.ej.*, la patente US-5.013.556). Los inventores han descubierto de forma sorprendente que los liposomas de la presente invención tienen una circulación bastante larga, y la adición del lípido PEG a la composición liposomal solo amplía la duración de circulación en menos de dos veces, si es que lo hace. Además, los lípidos de modulación de carga (titulables) pueden usarse para ayudar a entregar entidades encapsuladas en los liposomas a dianas nucleares o citosólicas, facilitando la fuga de algunas clases de entidades fuera de los confines de la ruta endosómica.

En una realización, los liposomas de la presente descripción incluyen lecitina, colesterol y un polímero anfipático. La lecitina incluida en los liposomas puede ser una lecitina natural, una lecitina natural hidrogenada, una lecitina sintética, 1,2-diestearoil-lecitina, dipalmitoil lecitina, dimiristoil lecitina, dioleoil lecitina, 1-estearoil-2-oleoil lecitina o 1-palmitoil-2-oleoil lecitina, mientras que el polímero anfipático puede ser un derivado de polietileno glicol-lípido, *p. ej.* derivados de polietileno glicol fosfatidiletanolamina, polietileno glicol-diacilglicerol o polietilenglicol-ceramida, mientras que la porción de poli(etilenglicol) tiene un peso molecular de aproximadamente 250 a aproximadamente 20.000, más comúnmente de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000. En otra realización, la relación entre lecitina y colesterol en los liposomas de la presente descripción es de aproximadamente 3:2 por mol. En otra realización, el polímero anfipático es de al menos 0,1% en moles del lípido de formación de liposoma en los liposomas de la presente descripción. En otra realización, la cantidad de polímero anfipático está situada entre 0,1% en moles y 1% en moles del lípido de formación de liposoma en los liposomas de la presente descripción. Preferiblemente, el polímero anfipático es un polímero neutro, es decir, posee en las condiciones de carga del fármaco la carga iónica neta de cero, por ejemplo, PEG-diacilglicerol, PEG-dialquilglicerol o PEG-ceramida. Se ha descubierto inesperadamente que la inclusión de lípidos anfipáticos iónicamente neutros al contenido de lípido PEG de aproximadamente 5,7% en moles del lípido total consigue una carga liposomal de alta eficacia de *p. ej.* alcaloides de la vinca, tales como vinorelbina, mientras que en el caso de PEG-DSPE cargado aniónicamente, la eficacia de carga se redujo considerablemente en el contenido de lípido-PEG de 1,6% en moles. o más (Ejemplo 72).

En otra realización, los liposomas de la presente descripción contienen un profármaco de camptotecina como irinotecán y está formado por lecitina y colesterol, *p. ej.* en una relación de aproximadamente 3:2 por mol, y un polímero anfipático, *p. ej.* en una cantidad de al menos 0,1% en moles o menos del 1% del lípido formador de liposoma.

Los liposomas de la presente invención pueden prepararse usando cualquier método que sea conocido o que será conocido en esta materia. Consulte, por ejemplo, G. Gregoriadis (editor), *Liposome Technology*, vol. 1-3, 1ª edición, 1983; 2ª edición, 1993, CRC Press, Boca Raton, FL. Algunos ejemplos de métodos adecuados para preparar la composición liposomal de la presente invención serán la extrusión, evaporación de fase inversa,

sonicación, inyección de solvente (*p. ej.* sonicación), microfluidización, análisis de detergente, inyección de éter y deshidratación/rehidratación. El tamaño de los liposomas puede controlarse supervisando el tamaño de los poros de las membranas usadas para extrusiones a baja presión o la presión y el número de pasos usados en la microfluidización o cualquier otro método apropiado. En una realización, los lípidos deseados primero se hidratan por medio de la hidratación de capa fina o la inyección de etanol, y posteriormente se miden mediante extrusión a través de las membranas de un tamaño de poro definido; más comúnmente 0,05  $\mu\text{m}$ , 0,08  $\mu\text{m}$  o 0,1  $\mu\text{m}$ .

Las composiciones liposomales que contienen el polianión y/o amonio sustituido de la presente descripción dentro de los liposomas pueden elaborarse usando cualquier método adecuado, *p. ej.* formación de liposomas en presencia del polianión y/o amonio sustituido de la presente descripción, *p. ej.* en forma de sal. El polianión y/o amonio sustituido fuera de los liposomas pueden extraerse o diluirse después de la formación del liposoma o antes de cargar o capturar la entidad deseada. Alternativamente, la composición liposomal que contiene el polianión y/o amonio sustituido de la presente descripción puede prepararse usando el método de intercambio de iones directamente o a través de una etapa de un intermedio de ácido libre con un gradiente de amonio sustituido de la presente descripción, *p. ej.* sal de amonio sustituido de poli $\text{ol}$  y azúcar polianionizado. Dichos liposomas pueden neutralizarse usando la amina o sus sales con un ácido volátil, *por ejemplo*, carbonato. La solución liposomal resultante puede usarse directa o alternativamente y la sal contenida en el anterior puede eliminarse si se desea, *p. ej.* mediante evaporación y cristalización seguidas de disolución en un medio acuoso.

Preferiblemente, la composición liposomal de la presente descripción tiene un gradiente de concentración transmembrana del polianión y/o amonio sustituido, *p. ej.* la concentración de la sal del polianión y/o amonio sustituido dentro del liposoma es superior, normalmente y como mínimo 100 veces superior que la concentración del polianión y/o amonio sustituido en el medio fuera del liposoma.

En una realización, la concentración de la sal del polianión y/o amonio sustituido dentro del liposoma es como mínimo 100 veces superior que la concentración de la sal del polianión y/o amonio sustituido en el medio fuera del liposoma y tiene al menos una concentración mínima de 10 mM, 50 mM, 0,1 M, 0,2 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,7 M o 1,0 M, donde la molaridad se calcula en base al amonio sustituido. En una realización, la concentración de la sal del polianión y/o amonio sustituido dentro del liposoma es como mínimo 100 veces superior que la concentración de la sal del polianión y/o amonio sustituido en el medio fuera del liposoma y es tiene una concentración de 0,65 M o aproximadamente 1,0 M.

Además, la composición liposomal de la presente invención suele tener un pH externo que es compatible o útil para mantener la estabilidad de la entidad deseada durante el proceso de carga, junto con la alta eficacia de carga, *p. ej.* captura superior al 90%. Por ejemplo, se prefiere un pH que esté dentro del intervalo 4-7 o 4,5-6,5. En particular, según la presente invención, la carga del irinotecán se consigue mejor con un pH del medio externo dentro de un intervalo de 4,0 y 7,0, y más preferiblemente entre un pH de 5,0 y 6,5. La carga de un derivado de vinca como vincristina, vinorelbina o vinblastina se realiza mejor con un pH de unos 5,0-7,0, y más preferiblemente con un pH de unos 6,5.

Según la presente invención, puede cargarse o capturarse una entidad deseada en los liposomas incubando la entidad deseada con los liposomas de la presente descripción en un medio acuoso y a una temperatura adecuada, *p. ej.* una temperatura superior a la temperatura de transición de la fase de los lípidos del componente durante la carga mientras se reduce por debajo de la temperatura de la fase de transición después de cargar la entidad. El tiempo de incubación suele basarse en la naturaleza de los lípidos del componente, la entidad que debe cargarse en los liposomas y la temperatura de incubación. Normalmente, los tiempos de incubación de unos pocos minutos a varias horas suelen ser suficientes. Dado que se consiguen un alto nivel de eficacia de captura de más del 85% y normalmente más del 90%, no suele ser necesario extraer la entidad no capturada. Si existe esta necesidad, no obstante, la entidad no capturada puede extraerse de la composición usando varios métodos, como, por ejemplo, cromatografía de exclusión de tamaños, diálisis, ultra filtración, adsorción o precipitación. Se ha descubierto inesperadamente que mantener la fuerza iónica baja durante la incubación de una entidad, como, en especial, un derivado de camptotecina o un derivado de alcaloide de la vinca, con los liposomas de la presente descripción, seguido de un aumento en la fuerza iónica al final de la incubación, genera una eficacia de carga más alta, una mejor extracción del fármaco no capturado y una mejor estabilidad del liposoma frente a la agregación. Normalmente, la incubación se realiza, *p. ej.* en una solución acuosa, con una fuerza iónica menor a la equivalente a NaCl 50 mM, o más preferiblemente, menor a la equivalente a NaCl 30 mM. Después de la incubación, puede añadirse una sal concentrada, por *ej.*, como una solución de NaCl, para aumentar la fuerza iónica a un valor superior a la de NaCl 50 mM, o más preferiblemente, superior a NaCl 100 mM. Sin pretender estar vinculado por teoría alguna, nuestra hipótesis es que el aumento de la fuerza iónica facilita la disociación de la entidad de la membrana liposomal, dejando toda la entidad sustancialmente encapsulada dentro del espacio interno del liposoma.

En general, la relación entidad a lípido, *p. ej.* el coeficiente de carga del fármaco obtenido después de cargar una entidad depende de la cantidad de la entidad capturada dentro de los liposomas, la concentración del polianión y/o amonio sustituido capturado, *p. ej.* sal, las propiedades fisicoquímicas de la entidad capturada y el tipo de contraión (anión), *p. ej.*, polianión usado. Debido a la alta eficacia de carga conseguida en las composiciones y/o usando los métodos de la presente invención, la relación entidad-lípido para la entidad capturada en los liposomas es superior al 80%, superior al 90%, y normalmente superior al 95% de la relación entidad-lípido calculada en función de la cantidad de la entidad y el lípido del liposoma capturados en el proceso de carga (la relación de "entrada"). De hecho, suele conseguirse prácticamente el 100% de encapsulación (cuantitativo). La relación entidad-a lípido en los liposomas puede caracterizarse

en términos de relación en peso (cantidad en peso de la entidad por peso o unidad molar del lípido del liposoma) o relación molar (moles de la entidad por peso o unidad molar del lípido del liposoma). Una unidad de la relación entidad-a lípido puede convertirse a otras unidades usando un cálculo rutinario, como se explica a continuación. La relación en peso de una entidad en los liposomas de la presente invención suele ser 0,05, 0,1, 0,2, 0,35, 0,5 o al menos 0,65 mg de la entidad por mg de lípido. A nivel de relación molar, la relación entidad-a-lípido según la presente invención es de al menos aproximadamente 0,02 a aproximadamente 5, preferiblemente de al menos 0,1 a aproximadamente 2, y más preferiblemente de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 1,5 moles del fármaco por mol del lípido del liposoma. En una realización, la relación entidad-a-lípido, *p. ej.* el coeficiente de carga del fármaco de derivados de camptotecina es de al menos 0,1, *p. ej.* 0,1 mol de derivado de camptotecina por un mol de lípido de liposoma, y preferiblemente de al menos 0,2. En otra realización, la relación entidad-a-lípido, *p. ej.* la carga de fármaco es de al menos aproximadamente una entidad de 300 mg (*p. ej.* alcaloide de la vinca o un derivado del mismo) por mg de lípido que forma el liposoma. En otra realización, la relación entidad-a-lípido, *p. ej.* la carga de fármaco es de al menos una entidad de 500 mg (*p. ej.* derivado de camptotecina o profármaco de camptotecina) por mg de lípido formador de liposoma. Sorprendentemente, la invención se mantuvo estable y cercana a la encapsulación liposomal cuantitativa del irinotecán, en la relación fármaco-a-lípido de más de 0,8 mmol de la entidad por 1 g de lípido del liposoma, más de 1,3 mmol de entidad por 1 g de lípido del liposoma, e incluso tan alto como 1,7 mmol de entidad por 1 g de lípido de liposoma (consulte el Ejemplo 74).

Si el liposoma está formado por un fosfolípido, se recomienda expresar el contenido de la entidad en las unidades de cantidad en peso (masa) del fármaco por unidad molar del fosfolípido del liposoma, *p. ej.* mg fármaco/mmol de fosfolípido. Sin embargo, una persona experta en la materia apreciaría que el contenido del fármaco puede ser equivalente si se expresa de forma independiente de la presencia de los fosfolípidos en un liposoma, y además, puede expresarse de forma equivalente en términos de cantidad molar del fármaco por unidad (masa o molar) del contenido del lípido del liposoma. Por ejemplo, un liposoma que contiene 3 partes molares de distearoilfosfatidilcolina (DSPC, peso molecular 790), 2 partes molares de colesterol (peso molecular 387) y 0,015 partes molares de distearoilfosfatidiletanolamina derivatizada con poli(etilenglicol)- (PEG-DSPE, peso molecular 2750), y contiene una doxorubicina de fármaco (peso molecular 543,5) en la relación fármaco/lípido de 150 mg/mmol fosfolípido, el mismo contenido del fármaco puede ser equivalente si se expresa en términos de mg fármaco/mg total lípido de la siguiente forma:

(a) Calcular las cantidades molares de los componentes lípidos del liposoma normalizados a la unidad molar de los fosfolípidos del liposoma (DSPC y PEG-DSPE en este ejemplo) dividiendo la cantidad molar de un componente por el total de las cantidades molares de los fosfolípidos del liposoma:

$$\begin{aligned} \text{DSPC } 3/(3+0,015) &= 0,99502 \\ \text{Colesterol } 2/(3+0,015) &= 0,66335 \\ \text{PG-DSPE } 0,015/(3+0,015) &= 0,00498 \end{aligned}$$

(b) Calcular la cantidad de masa del lípido del liposoma correspondiente a la cantidad molar de la unidad del fosfolípido del liposoma y los pesos moleculares de los componentes:

$$\text{LípidoTotal, mg/mmol fosfolípido} = 0,99502 \times 790 + 0,66335 \times 387 + 0,00498 \times 2750 = 1056,48$$

(c) Calcular la cantidad de masa del fármaco por unidad de masa del lípido total dividiendo el contenido de fármaco expresado en unidades de masa por unidad molar del fosfolípido por el número obtenido en la etapa (b):

$$\text{Doxorrubicina, mg/mg total lípido} = 150/1056,48 = 0,14198.$$

(d) Calcular la cantidad molar del fármaco por masa unitaria del lípido total dividiendo el número obtenido en la etapa (c) por el peso molecular del fármaco (en este caso, 543,5):

$$\text{Doxorrubicina, mmol/g total lípido} = 0,14198/543,5 \times 1000 = 0,261.$$

(e) Calcular la parte molar de los fosfolípidos en la matriz lipídica del liposoma:

$$\text{Parte molar del fosfolípido} = (\text{moles totales de fosfolípidos}) / (\text{cantidad de moles totales de lípidos}) = (3+0,015)/(3+2+0,015) = 0,6012.$$

(f) Calcular la relación molar de la doxorubicina para el lípido total.

$$\text{Doxorrubicina, mol/mol de lípido total} = (\text{Parte molar de fosfolípido}) \times (\text{Doxorrubicina, g/mol fosfolípido}) / (\text{peso molecular de Doxorubicina}) = 0,6012 \times 150/543,5 = 0,166$$

Gracias a ello, la relación entre la relación fármaco-a-lípido y fármaco-a-fosfolípido expresada en diversas unidades puede establecerse fácilmente. Como hemos mencionado anteriormente, un "lípido" incluye, sin carácter restrictivo, cualquier componente que forme una membrana de la membrana del liposoma, como, por ejemplo, los polímeros y/o detergentes.

El amonio sustituido capturado en el liposoma y/o la solución salina del polianión de la presente descripción suele tener una fuerza osmótica (osmolalidad) que ayuda a mantener los liposomas estables contra los daños osmóticos (hinchazón o explosión) sin sacrificar la capacidad de carga de los liposomas. En una realización, la osmolalidad de la composición del liposoma de la presente descripción está en el intervalo de 0,1 a 1,5 mol/kg o, preferiblemente, 0,2 a 1,0 mol/kg. Sorprendentemente, los inventores han encontrado que los liposomas de la presente descripción son estables frente al efecto adverso de la alta fuerza osmótica intraliposomal en la carga del fármaco. Los osmolaridades intraliposomales tan altas como 0,727 mol/kg se toleraban bien, generando una carga prácticamente cuantitativa de un fármaco hasta un máximo teórico de intercambio estequiométrico de los iones de amonio sustituidos intraliposomales para moléculas del fármaco (en el caso del irinotecán, una molécula de fármaco por un ion de amonio sustituido), incluso aunque la osmolaridad del medio acuoso extraliposomal durante la incubación simultánea del fármaco y los liposomas era cercana al valor fisiológico de unos 0,3 mol/kg (Ejemplo 74).

En general, la composición del liposoma de la presente invención es bastante estable durante el almacenamiento, *p. ej.* medido por el porcentaje de entidad capturada que se libera al exterior de los liposomas o se mantiene dentro de los liposomas después de un periodo de tiempo específico desde la carga inicial de la entidad dentro de los liposomas de la presente invención. Por ejemplo, la composición liposomal de la presente invención es estable a 4 °C durante al menos 6 meses, *p. ej.* menos del 10% de la entidad capturada se libera 6 meses después de la carga inicial de la entidad. En una realización, la composición liposomal de la presente invención es estable a 4 °C durante al menos 2 años, *p. ej.* menos del 20% de la entidad capturada se libera 2 años después de la carga inicial de la entidad.

Para una entidad capturada en el liposoma resulta beneficioso permanecer encapsulada en el liposoma hasta que este alcance el lugar de su acción prevista, *p. ej.* en el caso de un fármaco antitumoral liposomal administrado al paciente, un tumor. Los liposomas de la presente invención han mostrado una estabilidad sorprendente frente a la liberación (fuga) de la entidad capturada en condiciones *in vivo*, *p. ej.* en la sangre de un mamífero. El tiempo de exposición necesario para una liberación del 50% de la entidad capturada, *p. ej.*, un fármaco, de los liposomas (tiempo de liberación media) en la sangre de una rata *in vivo* era superior a 24 horas. En particular, los liposomas cargados con fármacos de alcaloides de la vinca, *p. ej.* vinblastina, vincristina y vinorelbina, mostraron una estabilidad remarcable contra la fuga de fármaco *in vivo*, con un tiempo de liberación medio de al menos 24 horas, o la cantidad de entidad que queda encapsulada después de 24 horas en la sangre *in vivo* de al menos el 50% del valor pre-administrado. Normalmente, se observa un tiempo de liberación medio superior a 33 horas o una cantidad de entidad encapsulada que permanece encapsulada después de 24 horas en la sangre *in vivo* de al menos el 60%; e incluso se observa un tiempo de liberación medio superior a 46 horas o una cantidad de entidad encapsulada que permanece encapsulada después de 24 horas en la sangre *in vivo* de al menos el 70% del valor de preadministración de forma común. Algunas veces, el tiempo de liberación medio para un fármaco encapsulado en la sangre *in vivo* era de más de 93 horas, e incluso de más de 120 horas. El liposoma cargado con derivados de camptotecina, como el topotecán y el irinotecán, también mostraron una estabilidad excepcional *in vivo* en la sangre, permaneciendo encapsulado el 79-85% de la carga de fármaco original después de 24 horas. Cabe destacar que los liposomas de la presente invención, aunque tienen un coeficiente bajo de liberación del fármaco *in vivo* en la circulación sanguínea, mostraron una actividad antitumoral sustancial *in vivo* que superaba la del fármaco libre (*p. ej.* administrado como una solución).

Los liposomas de la presente invención proporcionaron una combinación inesperada de alta eficacia del agente terapéutico capturado y una baja toxicidad. En general, la actividad de una entidad terapéutica encapsulada liposomalmente según la presente invención, *p. ej.* la actividad antineoplásica del irinotecán en un mamífero, es como mínimo igual o dos veces superior, o como mínimo cuatro veces superior a la actividad de la entidad terapéutica si se administra en la misma cantidad que su formulación no liposomal rutinaria, *p. ej.* sin usar la composición liposomal de la presente invención, mientras que la toxicidad de la entidad encapsulada liposomalmente no se supere, es al menos dos veces, al menos tres veces, o al menos cuatro veces inferior a la de la misma entidad terapéutica administrada en la misma dosis y el mismo calendario pero de forma libre y no encapsulada. Por ejemplo, es de sobras conocido que la encapsulación liposomal de los derivados de la camptotecina anticancerígena por los métodos publicados de terceros acaba aumentando la toxicidad (dosis tolerada máxima más baja, dosis de letalidad un 50% más baja) en comparación con el fármaco no encapsulado. Consulte la patente US-6.355268; US-6.465.008; Colbern, y col. *Clinical Cancer Res.* 1998, v. 4, pág. 3077-3082; Tardi, y col. *Cancer Res.*, 2000, v. 60, pág. 3389-3393; Emerson, y col. *Clinical Cancer Res.* 2000, v. 6, pág. 2903-2912. Los pro-fármacos de camptotecina encapsulados liposomalmente, como el irinotecán (CPT-11), que es soluble en el agua, los derivados de profármaco de la camptotecina catiónica, tienen una actividad considerablemente superior, *p. ej.* al menos 4 veces, e incluso 10 veces superior a la actividad antitumoral evaluada en un modelo de tumor *in vivo* que el fármaco en ausencia de una formulación liposomal, *p. ej.* en una forma libre (solución). Esto es incluso más remarcable, ya que el irinotecán requiere una activación enzimática, *p. ej.* mediante la acción de carboxilesterásica endógena no específica, pero según la presente invención está encapsulado sustancialmente dentro del espacio interno del liposoma. Por otro lado, sorprendentemente, la toxicidad del profármaco de camptotecina como el CPT-11 en la forma liposomal (relación de masa de fármaco/lípido superior a 0,1, *p. ej.* 0,2-0,6 o más) según la presente invención era más de 2 veces, más de 3 veces e incluso más de 4 veces inferior a la del profármaco libre (no encapsulado) CPT-11. Además, se consiguió una liberación prolongada del fármaco de los liposomas CPT-11 *in vivo*, con más del 50% e incluso más del 70% (79-86%) del contenido del fármaco original que permanece en los liposomas 24 horas después de la administración en el torrente sanguíneo, y con tiempos de liberación medios superiores a 24 horas, normalmente superando las 48 horas. La permanencia prolongada del fármaco en el liposoma *in vivo* se ha asociado con su efecto antitumoral superior. Sorprendentemente, la liberación de CPT-11 *in vivo* más lenta y la actividad antitumoral más alta se

ha observado en los liposomas que contienen derivados de azúcar polianionizado de bajo peso molecular (octasulfato de sacarosa) en lugar de un anión polimérico (polifosfato) (Ejemplo 15).

Según otra realización de la presente invención, la composición liposomal de la presente invención puede proporcionarse como una composición farmacéutica que contenga la composición liposomal de la presente invención y un portador, *p. ej.* un portador aceptable a nivel farmacéutico. Algunos ejemplos de portadores aceptables a nivel farmacéutico son la solución salina normal, la dextrosa isotónica, la sacarosa isotónica, la solución de Ringer y la solución de Hanks. Puede añadirse una sustancia tampón para proporcionar un pH óptimo para conseguir su estabilidad durante el almacenamiento. Por ejemplo, un pH de entre 6,0 y 7,5, más preferiblemente un pH de aproximadamente 6,5, es óptimo para la estabilidad de los lípidos de la membrana liposomal, y proporciona una retención excelente de las entidades capturadas. La histidina, hidroxietilpiperazina-etilsulfonato (HEPES), morfolipo-etilsulfonato (MES), succinato, tartrato y citrato, normalmente a una concentración de 2-20 mM, son ejemplos de sustancias tampón. Otros portadores adecuados incluyen, *por ejemplo*, agua, solución acuosa amortiguadora, NaCl al 0,4%, glicina al 0,3% y similares. Pueden añadirse ajustadores de tonicidad y estabilizadores poliméricos, carbohidratos o proteínas, *p. ej.* gelatina, albúmina, dextrano o polivinilpirrolidona. La tonicidad de la composición puede ajustarse al nivel fisiológico de 0,25-0,35 mol/kg con glucosa o un compuesto más inerte como la lactosa, sacarosa, manitol o dextrina. Estas composiciones pueden esterilizarse usando técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, *por ejemplo*, la filtración. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse bajo condiciones asépticas específicas y liofilizarse, al tiempo que la preparación liofilizada se combina con un medio acuoso estéril antes de su administración.

Las composiciones liposomales farmacéuticas también pueden contener otras sustancias auxiliares aceptables a nivel farmacéutico según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, como ajustadores del pH y soluciones tampón, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, *por ejemplo*, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc. Además, la suspensión liposomal puede incluir agentes de protección de los lípidos que los protegen de los daños provocados por los radicales libres y la peroxidación lipídica durante su almacenamiento. Son adecuados los inactivadores lipofílicos de radicales libres, como el alfa-tocoferol y los quelantes solubles en agua específicos de hierro, tales como la ferrioxamina.

La concentración de los liposomas de la presente invención en las formulaciones farmacéuticas fluidas puede variar ampliamente, es decir, de menos de 0,05% normalmente o al menos sobre el 2-10% tanto como el 30-50% en peso y será seleccionado principalmente en función de los volúmenes de los fluidos, las viscosidades, etc. dependiendo del modo de administración específico que se haya seleccionado. Por ejemplo, la concentración puede aumentarse para reducir la carga de fluido asociada al tratamiento. Esto puede ser especialmente deseable en pacientes que tienen una insuficiencia cardíaca congestiva asociada a aterosclerosis o una hipertensión severa. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas liposomales formadas por lípidos irritantes pueden diluirse a bajas concentraciones para disminuir la inflamación en el lugar de administración.

La cantidad de composición farmacéutica liposomal administrada dependerá de la entidad terapéutica específica capturada dentro de los liposomas, el estado patológico que se está tratando, el tipo de liposomas usados y el criterio del médico. En general, la cantidad de composición farmacéutica liposomal administrada será suficiente para suministrar una dosis efectiva a nivel terapéutico de la entidad terapéutica específica.

La cantidad de composición farmacéutica liposomal necesaria para suministrar una dosis efectiva a nivel terapéutico puede determinarse con los métodos rutinarios *in vivo* e *in vitro*, habituales en materia de análisis farmacológico. Consulte, *por ejemplo*, D.B.Budman, A.H.Calvert, E.K.Rowinsky (editores). *Handbook of Anticancer Drug Development*, LWW, 2003. Las dosis efectivas a nivel terapéutico para las distintas entidades terapéuticas son bien conocidas por los técnicos de esta materia; y, según la presente invención, una entidad terapéutica suministrada a través de la composición liposomal de la presente invención proporciona al menos la misma actividad, o dos veces más, 4 veces más o 10 veces más de la actividad obtenida mediante la administración de la misma cantidad de entidad terapéutica en su formulación no liposomal rutinaria. Normalmente, las dosis para la composición farmacéutica liposomal de la presente invención van de 0,005 a aproximadamente 500 mg. de la entidad terapéutica por kilogramo de peso corporal, y más menudo, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 100 mg de entidad terapéutica/kg de peso corporal.

Normalmente, la composición farmacéutica liposomal de la presente invención se prepara como una solución tópica o inyectable, tanto en solución como en suspensión líquida. Sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La composición también puede formularse en un comprimido de revestimiento entérico o una cápsula de gel, dependiendo de los métodos conocidos en esta materia.

La composición liposomal de la presente invención puede administrarse de cualquier forma que sea médicamente aceptable, lo que dependerá de la afección o la lesión en tratamiento. Las rutas de administración posibles incluyen inyecciones, por rutas parenterales como la intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intraarticular, intraepidural, intratecal, u otras, así como por vía oral, nasal, oftálmica, rectal, vaginal, tópica o pulmonar, *p. ej.* por inhalación. Para el suministro de fármacos liposomales formulados según la invención, a tumores del sistema nervioso central, resulta especialmente ventajoso realizar una infusión intracraneal sostenida lenta de los liposomas

directamente en el tumor (una administración potenciada por convección, o CED). Consulte Saito, y *col.*, Cancer Research, vol.64, pág. 2572-2579, 2004; Mamot, y *col.*, J. Neuro-Oncology, vol. 68, pág. 1-9, 2004. Las composiciones también pueden aplicarse directamente a las superficies del tejido. La invención incluye la liberación sostenida, la liberación dependiente del pH u otra administración por liberación mediada por la condición ambiental o química específica, *p. ej.* mediante los mencionados medios como inyecciones de depósito o implantes erosionables.

### Ejemplos

Los ejemplos siguientes pretenden ilustrar, sin ánimo de limitar la invención de ninguna forma, modo o manera, ya sea implícita o explícitamente. Aunque son típicos para los usuarios, los expertos en la materia pueden usar otros procedimientos, otras metodologías y otras técnicas de forma alternativa.

#### Ejemplo 1. Preparación de las soluciones de sales de amonio sustituido.

Las soluciones de sulfato trialquilamonio y dialquilamonio útiles para cargar fármacos (*p. ej.* doxorubicina) en liposomas se prepararon diluyendo ácido sulfúrico con agua a una concentración de 0,25 M y después titulando la solución de ácido sulfúrico con una o varias aminas. Las aminas sustituidas que se han usado en este ejemplo han sido la trietilamina, trimetilamina, dimetilamina, dietilamina o dietanolamina. Después de la adición de las aminas, la solución resultante se ha diluido a una concentración final de 0,2 M de la sal de amonio sustituido. La osmolalidad se ha determinado usando un osmómetro de punto de rocío. Las propiedades de las soluciones salinas de sulfato de alquilamonio sustituido se muestran en la Tabla 1 de más abajo.

Tabla 1. Propiedades de diversas soluciones de sulfato dialquilamonio y trialquilamonio

Sal	Osmolalidad, mmol/kg	pH
Sulfato de dimetilamonio	472	5,65
Sulfato de dimetiletanolamonio	509	5,72
Sulfato de dietilamonio	519	5,85
Sulfato de trimetilamonio	497	5,81
Sulfato de trietilamonio	559	5,33

#### Ejemplo 2. Preparación de liposomas con sales de dialquilamonio y trialquilamonio capturadas, y carga de una sustancia en estos liposomas.

Se disolvieron simultáneamente distearoilfosfatilcolina (DSPC), colesterol (Chol) y N-(metoxi-poli(etilenglicol)-oxicarbonil)-distearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) (preparado a partir de poli(etilenglicol) con un peso mol. de 2000) en cloroformo en una relación molar de 3:2:0,015, y el cloroformo se extrajo a 55-60 °C mediante evaporación rotatoria. A continuación, la película lipídica secada se hidrató en una solución de uno de cada sulfato de dialquil- o trialquilamonio enumerados en el Ejemplo 1 a 60 °C durante 30 min. La suspensión lipídica se extruyó bajo presión a través de dos filtros de membrana grabados con pistas de policarbonato apilados con un tamaño de poro de 0,1 µm (Corning Nuclepore). El tamaño del liposoma determinado mediante el método de dispersión cuasi-elástica de luz era aproximadamente 110-120 nm. Las sales de trialquilamonio o dialquilamonio no encapsuladas se extrajeron del medio externo de los liposomas por medio de filtración de gel usando una columna de gel de dextrano reticulada (Sephadex G-75, Amersham Pharmacia Biotechnology) eluida con solución salina tamponada con HEPES, pH 7,2-7,4, y los liposomas se recogieron en una fracción de volumen vacío de la columna. Se añadió clorhidrato de doxorubicina USP (polvo liofilizado que contiene 5 partes de peso de lactosa por 1 parte de doxorubicina) a los liposomas a una concentración de 150 µg de fármaco/µmol del fosfolípido liposomal. La mezcla se incubó a 55 °C durante 45 min, se enfrió en hielo durante 10 min, y el fármaco no encapsulado se extrajo mediante cromatografía de filtración de gel usando una columna Sephadex G-75 eluida con solución salina tamponada con HEPES, pH 7,4. La presencia de doxorubicina libre (caracterizada por la aparición de una banda de color rojo en movimiento lento) no era detectable visualmente. Los liposomas cargados con doxorubicina purificados se analizaron para fosfolípidos y doxorubicina siguiendo los Ejemplos 70 y 71 (método espectrofotométrico), respectivamente. Las eficiencias de carga de fármacos resultantes se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Carga de doxorubicina en liposomas con soluciones capturadas de sales de dialquil- y trialquilamonio. Coeficiente de entrada de fármaco/fosfolípido 150 µg/µmol.

Sal capturada en el liposoma:	Coeficiente de fármaco/fosfolípido en liposomas (µg/µmol)	Eficacia de captura (%)
Sulfato de trimetilamonio	140,74 ± 10,35	93,8 ± 5,7
Sulfato de trietilamonio	163,81 ± 16,41	109,2 ± 11,6
Sulfato de dietilamonio	158,16 ± 18,34	105,4 ± 7,8
Sulfato de dimetiletanolamonio	155,08 ± 8,51	103,4 ± 11,6

**Ejemplo 3.** Preparación de liposomas que contienen varias sales de sulfato de amonio sustituido de dialquilo, trialquilo y heterocíclico y carga de doxorubicina en estos liposomas.

Las soluciones de sal de sulfato de amonio sustituido se prepararon como en el Ejemplo 1 usando aminas heterocíclicas y sales de alquilo sustituido, hidroxialquilo sustituido. Los liposomas se formaron como en el Ejemplo 1, excepto en que el lugar de la etapa de hidratación con película lipídica, los lípidos netos se disolvieron en etanol (aproximadamente 100 µl de etanol por cada 50 µmol de fosfolípido) y se mezclaron con la solución de sal de amonio sustituido a 60-65 °C, por lo que la dispersión del lípido resultante contenía cerca de 10% en vol. de etanol.

La carga de doxorubicina se realizó añadiendo una solución de doxorubicina (2 mg/ml en solución salina tamponada con HEPES pH 6,5) a los liposomas con una concentración de 155 µg fármaco/µmol liposoma fosfolípido (PL) y calentando a 58 °C durante 45 minutos en un baño de agua caliente. Los liposomas resultantes se separaron de cualquier doxorubicina no encapsulada residual y se analizaron para desvelar el contenido de fármaco y lípido como en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Carga de doxorubicina en liposomas con soluciones de sales de amonio sustituido con alquilo, dialquilo, trialquilo y heterocíclico con impedimento estérico.

Amina usada para preparar la sal de amonio sustituido	Osmolalidad, mmol/kg	carga de fármaco, mg/mmol de fosfolípido	Eficacia de carga, %
Trimetilamina	497	149,4 ± 7,9	96,4 ± 4,9
Trietilamina	559	149,6 ± 6,9	96,5 ± 4,3
Dimetiletanolamina	509	163,1 ± 6,6	105,3 ± 4,5
Dimetilamina	472	158,6 ± 7,4	102,3 ± 4,9
Dietilamina	519	156,7 ± 13,0	101,1 ± 8,5
Diisopropilamina	533	159,9 ± 6,2	103,2 ± 4,1
Tris(hidroximetil)-aminometano	423	179,9 ± 15,3	116,1 ± 11,5
1-Piperidinaetanol	506	153,5 ± 7,1	99,0 ± 4,5
4-Metilmorfolina	465	152,4 ± 9,8	98,3 ± 6,2
Piperidina	479	158,5 ± 12,5	102,3 ± 8,2
1-Metilpiperidina	492	153,6 ± 12,3	99,1 ± 7,8
Dimetilpiperazina	378	158,0 ± 6,5	101,9 ± 4,3

**Ejemplo 4.** Preparación de solución de polifosfato de trietilamonio (TEA-Pn).

Poli(fosfato) de sodio lineal con 13-18 unidades de fosfato por molécula (cristal de fosfato; CALGON®, obtenido de la empresa Sigma Chemical Company) se disolvió en agua a una concentración de aproximadamente fosfato 1,3 M. La solución se pasó por una columna con 120 ml de perlas de resina de intercambio de cationes de copolímero de poliestireno-divinilbenceno sulfonado (Dowex 50Wx8-200, Dow Chemical Co.) en forma de hidrógeno. La columna se preequilibró con una solución acuosa de HCl 3-3,6 M para convertir la resina en forma de hidrógeno y lavarla con agua desionizada a un pH neutro. Se aplicaron 15 ml de la solución de polifosfato de sodio a la columna y se eluyeron con H<sub>2</sub>O desionizada. El eluyente de columna se ha supervisado usando un detector de conductividad. El flujo saliente de la columna correspondiente al pico de conductividad se tituló con trietilamina pura con un pH de 5,5-6,0. La solución se analizó para detectar sodio residual mediante un potenciómetro usando un electrodo de cristal sensible al sodio. También se detectó el contenido de fosfato usando un análisis de fosfato inorgánico como en el Ejemplo 1. La solución que tenía un contenido de sodio residual inferior al 1% se diluyó a una concentración final de fosfato 0,55 M. La solución normalmente tiene una concentración TEA de 0,52-0,55 M, pH de 5,5-6,0, y una osmolalidad de 430-480 mmol/kg

**Ejemplo 5.** Extracción de sales de polifosfato no capturado de las preparaciones de liposomas.

Los liposomas (120 nm de tamaño) con un marcador fluorescente capturado de trisulfonato 8-hidroxipireno se prepararon siguiendo las indicaciones de Kirpotin, y col., *Biochemistry* 36:66-75, 1997, y se mezclaron con la solución de polifosfato de sodio. La mezcla se cargó en columnas de exclusión por tamaño que contenían perlas de dextrano reticuladas (Sephadex G-75), perlas de agarosa al 6% (Sephacrose 6B-CL) o perlas de agarosa al 4% (Sephacrose 4B-CL), de Amersham Pharmacia, y se eluyeron con la solución tampón MES-Dextrosa (pH 5,5). Se realizó el análisis de los efluentes para detectar el contenido de fosfato usando el análisis de fosfato de Bartlett (1959), y para detectar el contenido de liposomas usando la espectrofluorimetría. De los análisis por cromatografía de gel estudiados, Sepharose CL-6B proporcionó una separación completa del polifosfato y los liposomas con una relación volumétrica del lecho de columna/muestra de 13.

**Ejemplo 6.** Preparación de la solución de trietilamonio de octasulfato de sacarosa (TEA-SOS).

El octasulfato de sacarosa de sodio (peso equivalente 144,8) es la sal de sodio del derivado de la sacarosa donde todos los grupos de hidroxilo han formado ésteres de ácido sulfúrico. La sal de sodio de octasulfato de sacarosa (SOS) se adquirió de la empresa Toronto Research Chemicals, Toronto, Canadá, ref. S699020. Se disolvieron seis gramos de octasulfato de sacarosa de sodio en 16,57 ml de agua desionizada para conseguir una concentración final de unos 2,5 N de los grupos de sulfato. La solución se trató por intercambio de iones como en el Ejemplo 4. La solución de ácido de sacarosa octasulfúrico se obtuvo ya que el efluente de la columna de intercambio de iones se tituló con trietilamina pura con un pH de 5,7 (punto de neutralización), y se determinó el pH y la osmolalidad de la solución. La solución resultante tenía la concentración de trietilamonio calculada de 0,643 M, pH 5,7, y la osmolalidad de 530 mmol/kg. La presencia de sodio residual no pudo detectarse usando un potenciómetro (inferior al 0,1%).

Ejemplo 7. Liposomas cargados con irinotecán (CPT-11) usando sales de amonio sustituido; preparación y liberación del fármaco in vitro en presencia de plasma sanguíneo.

En este ejemplo, se han estudiado el sulfato, citrato, pirofosfato, trifosfato y polifosfato lineal (13-18 mer) como aniones en las soluciones de sal de amonio sustituido capturada en el liposoma. Se escogieron los polímeros de fosfato por su biodegradabilidad y porque los polifosfatos se encuentran naturalmente en las células, al contrario que otros aniones poliméricos sintéticos (poliacrilato, sulfato de dextrano y similares). Además, la viscosidad de las soluciones de polifosfatos de bajo peso molecular era inferior a la de otros polímeros, por lo que los polifosfatos resultaban más adecuados para el proceso.

Se utilizaron los siguientes materiales para preparar las soluciones salinas.

1. Polifosfato de sodio,  $\text{NaO}[\text{PO}_3\text{Na}]_n\text{-Na}$ ,  $n=13-18$ , adquirido de Sigma (ref. P-8510, "Vidrio fosfatado. Calidad laboratorio", también conocido como hexametáfosfato de sodio o por el nombre de marca CALGON);
2. Tripolifosfato de pentasodio,  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ , adquirido de Sigma (ref. T-5883);
3. Decahidrato de pirofosfato de tetrasodio,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , adquirido de Sigma (ref. P-9146).
4. Se utilizaron resinas de intercambio de iones Dowex 50Wx4 (resina de poliestireno sulfonado reticuladas al 4%, malla de 100-200) adquiridas de Sigma (ref. 50X4-200) o Dowex HCR-W2 (resinas de poliestireno sulfonado reticuladas al 8%, malla de 50-100) adquiridas de Sigma (ref. I-8880) de forma indistinta. Las resinas se han lavado mediante decantación en el siguiente orden: tres veces con agua desionizada, dos veces con HCl 1 N (3x en exceso sobre la resina por volumen), tres veces con agua, dos veces con NaOH 1 N, tres veces con agua, tres veces con HCl 1 N y tres veces con agua. Después de la decantación, las resinas tenían la forma  $\text{H}^+$ .
5. Trimetilamina (TMA), solución acuosa al 40%, de Aldrich Chemical Co. (ref. 43, 326-8). La concentración se estableció mediante titulación ácida a alrededor de 5,9 N.
6. Trietilamina (TEA), 99%, calidad HPLC, de Fisher (ref. 04884). La concentración por titulación ácida era de 6,9-7,1 N.

El agua se purificó a través de osmosis inversa, intercambio de iones y extracción orgánica para conseguir una calidad libre de componentes orgánicos de "16-18 MOhm".

Se prepararon soluciones acuosas de sales de pirofosfato, trifosfato y polifosfato empleando el método de intercambio de iones. Se cargaron soluciones de polifosfato de sodio (3 g en 25 ml de agua), pirofosfato (4 g en 27 ml de agua), o polifosfato (6,7 g en 30 ml de agua) en la columna que contenía 100 ml (volumen del lecho) de resina de intercambio de iones preparados como se ha descrito anteriormente. La columna se eluyó con agua y se recogieron fracciones. Las fracciones con un pH ácido ( $\text{pH} < 3$ ) se combinaron. Se diluyeron alícuotas de 0,5-ml de la fracción combinada que contenía el fosfato ácido por triplicado con 20 ml de agua y se titularon con NaOH 0,100 N hasta el punto final de pH 4,5-5,0 (solución analítica de Fisher) para determinar la normalidad. Las fracciones combinadas después del intercambio de iones se titularon con trimetilamina (para obtener sales de trimetilaminio) a un pH de 5,4-5,5. Después de la titulación, las soluciones se diluyeron, en caso necesario, para obtener una concentración final de trimetilamonio cercana a 0,5 N.

Los sulfatos de trimetilamonio y trietilamonio se prepararon diluyendo 1,39 ml de ácido sulfúrico concentrado (17,9 M) con 80 ml de agua, y titulando la solución diluida con trietilamina pura o trietilamina acuosa bajo el control de un medidor de pH hasta el punto de equivalencia (pH 5,1-5,5). El volumen se ajustó a 100 ml con agua.

La solución de citrato de trimetilamonio se preparó disolviendo 1,572 g de ácido cítrico monohidratado ACS de Sigma (ref. C-1909) en 20 ml de agua, y titulando la solución con una solución acuosa de trimetilamina hasta el punto de equivalencia. El volumen se ajustó a 25 ml con agua.

Las soluciones se filtraron usando un filtro de acetato de celulosa de 0,2- $\mu\text{m}$  aplicando una presión positiva. La osmolalidad y el pH de las soluciones se midieron usando un osmómetro de presión de vapor y un medidor de pH de electrodo de calomelanos de vidrio, respectivamente. La normalidad del anión en las soluciones de fosfato se determinó mediante un análisis espectrofotométrico de fosfomolibdato azul (consulte el Ejemplo 70) después de la hidrólisis ácida (5 min. 100 °C, 3 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). La normalidad del anión solo tuvo en cuenta los grupos funcionales

ácidos que se ionizan sustancialmente a un pH de 5,5. La normalidad del catión se determinó basándose en la base de trialquilamonio añadida. Las soluciones obtenidas tenían las propiedades siguientes (Tabla 4):

Tabla 4. Propiedades de soluciones de sales de amonio sustituido para cargar CPT-11 en liposomas.

Sal	normalidad de catión	normalidad de anión	pH	Osmolalidad (mmol/kg)
Citrato de TMA	0,58	0,60	5,1	791
Sulfato de TMA	0,50	0,50	5,4	625
Pirofosfato de TMA	0,44	0,54	5,4	651
Trifosfato de TMA	0,57	0,68	5,4	695
Polifosfato de TMA	0,49	0,58	5,5	336
Sulfato de TEA	0,54	0,50	5,35	719

El colesterol y el DSPC se adquirieron de Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EE. UU. PEG-DSPE (PEG peso mol. 2000) se adquirió de Shearwater Polymers, Huntsville, AL, EE. UU. El DSPC, colesterol y PEG-DSPE con la proporción de peso 3:1:0,1 (relación molar aproximada 3:2:0,03) se disolvieron en cloroformo (Fisher; Calidad óptima, estabilizado con amileno) a 60 mg/ml de DSPC. La solución se dispensó en tubos Pyrex a 30 mg de DSPC (0,5 ml) por tubo y se evaporó lentamente a presión reducida usando un evaporador rotatorio a 60 °C. Las películas lipídicas se secaron al vacío (mercurio de 100 micrómetros de mercurio, bomba de aceite) durante 30-60 minutos a temperatura ambiente.

Las películas lipídicas secas se hidrataron agitando suavemente las soluciones salinas acuosas anteriores a 60 °C durante 15-20 minutos. Los lípidos formaron una suspensión lechosa (vesículas multilamelares). Esta suspensión lechosa se sometió a cinco ciclos de congelación en la mezcla de hielo seco e isopropanol (-80 °C, 3 minutos) y se descongeló en un baño de agua a 60 °C durante 3 minutos. A continuación, la suspensión lipídica se extruyó 10 veces (doble efecto) a través de dos filtros de membrana de policarbonato apilados (Nucleopore, Whatman, tamaño de poro 0,1 µm) usando un extrusor alternativo de accionamiento manual (Avanti Polar Lipids) calentado a 60 °C.

Los liposomas extruidos se mantuvieron a 60 °C durante cinco minutos y se inactivaron en agua helada (0-4 °C) durante cinco minutos. A continuación, los liposomas se separaron de la solución salina formadora de gradiente en la solución de tampón de carga MES-Dextrosa (50 g/l de Dextrosa ACS, 0,975 g/l de ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES) y una cantidad suficiente de NaOH 5 M para que el pH alcanzase el valor de 6,4) mediante cromatografía en gel en Sephadex G-75. Aparecen liposomas en la fracción de volumen vacío (aproximadamente el 30% del volumen del lecho de la columna).

La preparación de CPT-11 (clorhidrato de irinotecán) que contiene 0,860 mg de la base de CPT-11 por 1 mg de sólido se disolvió en HCl 0,001 N para preparar una solución madre de 16,5 mg/ml de base de CPT-11 base. Esta solución se mezcló con los liposomas en la solución tampón MES-Dextrosa para conseguir la relación de 150 µg de CPT-11 por 1 µmol de fosfolípidos de liposoma. La mezcla se incubó a 55 °C en un baño de agua, con agitación suave ocasional (aproximadamente cada cinco minutos) durante 30 minutos, y después se enfrió rápidamente en agua helada (0-4 °C). Los liposomas se separaron del fármaco encapsulado usando cromatografía en gel en Sephadex G-75, utilizando MES-Dextrosa como eluyente. El fármaco encapsulado se determinó mediante un análisis espectrofotométrico (Ejemplo 71) y los fosfolípidos se determinaron usando un análisis de extracción (Ejemplo 70).

La liberación del fármaco *in vitro* de los liposomas cargados con CPT-11 obtenidos de esta manera en presencia de 50% de plasma humano se estudió de la forma siguiente. El plasma donante humano congelado se descongeló a 37 °C, centrifugó a 14.500 g durante 10 minutos y se filtró usando un filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0,45-µm. Las preparaciones liposomales con CPT-11 cargado se esterilizaron haciéndolas pasar por un filtro de jeringa estéril de acetato de celulosa (SFCA) exento de tensioactivos de 0,2-µm. 0,5-ml de los liposomas se mezclaron con 0,5 ml del plasma en tubos Eppendorf estériles de copolímero de 1,5-ml, sellados e incubados en una plataforma oscilante a 37 °C durante 24 horas. La muestra en blanco contenía 0,5 ml de MES-Dextrosa estéril en lugar de liposomas. Los liposomas se aislaron mediante cromatografía en gel en un gel de agarosa reticulado con perlas al 2% (Sephacrose CL-2B, Pharmacia; volumen del lecho 10 ml) usando NaCl 144 mM, HEPES-Na 5 mM, solución tampón a pH 7,4 (HBS-5). Los liposomas aparecieron en la fracción de volumen vacío, mientras que las proteínas de plasma y el fármaco liberado (si existe) fueron retardados por el gel. Las fracciones liposomales se sometieron a un análisis para detectar CPT-11 y fosfolípidos, y se determinó la relación fármaco/fosfolípidos (relación de salida). Las lecturas de las muestras en blanco (solo plasma) se restaron de las lecturas de las muestras que contenían liposomas. Se determinó el porcentaje de fármaco que quedaba en los liposomas después de la incubación dividiendo la relación de salida fármaco/lípido la relación de entrada fármaco/lípido (relación fármaco/lípido antes de la incubación con plasma). Los datos de carga y liberación se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Carga de CPT-11 en liposomas con sales de alquilamonio terciario y liberación *in vitro* del fármaco en presencia del plasma humano.

	Solución salina capturada	Antes de la incubación con plasma		Después de la incubación con plasma	
		relación fármaco/lípido	eficacia de encapsulación (%)	relación fármaco/lípido	fármaco que quedó encapsulado (%)
5	Sulfato de TMA	127,2 ± 5,6	84,8 ± 3,8	132,1 ± 6,9	103,8 ± 10,0
	Pirofosfato de TMA	136,2 ± 9,0	90,8 ± 6,0	132,3 ± 5,0	97,1 ± 10,1
	Trifosfato de TMA	132,9	88,6	129,2	97,3
	TMA-Pn	134,4 ± 9,3	89,6 ± 6,2	135,0 ± 7,4	100,4 ± 12,4
10	Sulfato de TEA	131,1 ± 6,5	87,4 ± 4,4	125,2 ± 5,0	95,5 ± 8,6

15 **Ejemplo 8.** Estabilidad *in vivo* de los liposomas cargados con CPT-11 usando sales de trialkilamonio sulfato, citrato, polifosfato, trifosfato y pirofosfato.

Mientras que los liposomas de camptotecina pueden mostrar una fuga de fármaco aceptable en el plasma sanguíneo *in vitro*, el fármaco puede perderse más rápidamente en la circulación sanguínea *in vivo*. Por lo tanto, se ha evaluado un panel de formulaciones liposomales de CPT-11 para conocer la estabilidad del fármaco en la circulación sanguínea *in vivo* usando un análisis de punto temporal único en ratones.

Los liposomas se prepararon y cargaron con CPT-11 como se ha descrito en el Ejemplo 6 con las siguientes modificaciones. En lugar de usar PEG-DSPE de Shearwater Polymers, los inventores utilizaron un PEG-DSPE similar de Avanti Polar Lipids. Para conseguir la cuantificación de la matriz lípida del liposoma en las muestras de sangre/tejido, se añadió una etiqueta radioactiva no intercambiable, [<sup>3</sup>H]-Colesteril hexadecil éter ([<sup>3</sup>H]-CHE; (Amersham, EE. UU.) a la solución de cloroformo de los lípidos en una cantidad de 0,25 mCi/mmol de fosfolípidos. Las soluciones lípidas se dispensaron en tubos Pyrex a 12 mg de DSPC/tubo, y se formaron películas lípidas mediante secado al vacío/evaporación rotatoria. Las películas lípidas se hidrataron con 0,7 ml de las soluciones de sal de amonio sustituido formadoras de gradiente. La concentración lípida en los liposomas con sales que contenían fosfato capturado se determinó por recuento por centelleo de radioactividad. Las preparaciones sin sales que contenían fosfato capturado también se sometieron a la evaluación de los fosfolípidos sin extracción como se describe en el Ejemplo 70 y se usaron como estándares de radioactividad lípida. Las porciones de mezclas de liposoma-fármaco preparadas para la carga se guardaron y se evaluaron para confirmar el coeficiente de pre-carga del CPT-11 añadido al lípido del liposoma antes de la carga ("relación de entrada"). La desviación estándar y media promediadas en volumen de la distribución del tamaño del liposoma se determinaron por medio de dispersión de luz cuasi-elástica (QELS) usando el modelo Gaussiano. Las propiedades de estos liposomas se resumen en la Tabla 6.

40 Tabla 6. Caracterización de la carga de CPT-11 en liposomas etiquetados con [<sup>3</sup>H]-CHE para un estudio de estabilidad *in vivo*

	Solución salina capturada	relación fármaco/lípido antes de la carga	relación fármaco/lípido después de la carga	eficacia de carga (%)	tamaño de liposoma, (promedio±SD) nm
45	Citrato de TMA	159,2 ± 3,5	156,7 ± 3,6	98,5 ± 4,4	122,1 ± 25,3
	Sulfato de TMA	156,1 ± 2,5	156,1 ± 3,1	100,0 ± 3,6	122,2 ± 28,4
	Pirofosfato de TMA	164,6 ± 5,8	156,6 ± 4,3	95,2 ± 6,0	121,1 ± 19,9
	Trifosfato de TMA	163,6 ± 5,7	156,0 ± 3,2	95,3 ± 5,3	122,4 ± 12,9
50	Polifosfato de TMA	170,5 ± 8,0	162,4 ± 4,0	95,3 ± 6,8	123,0 ± 12,7
	Sulfato de TEA	153, ± 3,3	154,9 ± 4,9	101,0 ± 5,3	121,1 ± 18,0

55 Ratones CD-1 hembras de seis semanas de edad (Charles River) recibieron inyecciones en la vena de la cola de estas formulaciones liposomales CPT-11 a una dosis de 10 mg/kg (0,2 mg de CPT-11/ratón) por duplicado. Ocho horas después, se anestesiaron los ratones y se desangraron a través de una punción a corazón abierto. La sangre se recogió en jeringas heparinizadas (10-20 µl de 1000 U/ml de heparina USP) y se transfirió a tubos pesados que contenían 0,4 ml de la solución salina fisiológica tamponada con fosfato (PBS) con EDTA al 0,04% (Gibco BRL), conservado en hielo. Los tubos se pesaron para determinar el peso de las muestras de sangre, las células sanguíneas se separaron mediante centrifugación a 9000 g durante 5 minutos, y los sobrenadantes que contenían plasma diluido en PBS se guardaron para realizar análisis de lípidos de liposomas y fármacos. CPT-11 se cuantificó mediante un análisis fluorométrico (Ejemplo 71). El lípido del liposoma se cuantificó mediante recuento de radioactividad por centelleo corregido según la inactivación. Los patrones de radioactividad de fosfolípidos y liposomas se contaron en paralelo a las muestras de plasma. Un porcentaje del fármaco que permaneció encapsulado se calculó dividiendo la relación fármaco/radioactividad en las muestras de plasma por la relación fármaco/radioactividad de los liposomas

inyectados. Debido a la rápida eliminación del CPT-11 puro de la sangre (consulte el Ejemplo 69) y la estabilidad conocida del [<sup>3</sup>H]-CHE contra los intercambios de lípidos, las lecturas del análisis se consideraron indicativas del contenido sanguíneo del CPT-11 liposomal y el lípido. Un porcentaje de la dosis lípida inyectada (% D.I.) remanente en la circulación se calculó asumiendo que el 100% del bolo inyectado había entrado en circulación; siendo el volumen sanguíneo del 6,3% del peso corporal del ratón y el hematocrito del 45%. Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Estabilidad *in vivo* de la duración de circulación y encapsulación de los liposomas cargados con CPT-11 en ratones en un punto único (8 horas) después de la inyección. % D.I., % de dosis inyectada.

Sal capturada en el liposoma	Relación fármaco/lípido, % de valor antes de la inyección	Lípido del liposoma, % D.I en sangre
Citrato de TMA	80,2 ± 7,8	18,8 ± 3,4
Sulfato de TMA	70,1 ± 4,8	23,6 ± 1,8
Pirofosfato de TMA	67,3 ± 9,2	23,2 ± 3,1
Trifosfato de TMA	70,6 ± 6,0	24,9 ± 8,2
Polifosfato de TMA	107,5 ± 8,9	24,3 ± 3,4
Sulfato de TEA	76,6 ± 13,1	23,6 ± 0,1

Todas las preparaciones mostraron un nivel de encapsulación del fármaco después de 8 horas en la sangre *in vivo* al 70-80% del nivel previo a la inyección, mientras que los liposomas que contenían polifosfato eran los más estables (la encapsulación del fármaco se mantiene a aproximadamente el 100%).

#### Ejemplo 9. Farmacocinética en sangre de liposomas CPT-11 preparados usando polifosfato de trietilamonio.

La formulación del CPT-11 liposomal usando sal de polifosfato de trietilamonio se preparó como se describe en el Ejemplo 3. Los lípidos – DSPC, colesterol y N-(metoxi-poli(etilenglicol) (P.m. 2000)-oxicarbonil)-DSPE (PEG-DSPE) (todo de Avanti Polar Lipids, Inc.) – se combinaron como polvo en seco en la relación molar de 3:2:0,015 y se disolvieron en etanol al 100% (calidad USP, aprox. 0,15 ml/100 mg de los lípidos) a 62–65 °C. Para estudios farmacocinéticos, se añadió <sup>3</sup>H-colesteril hexadecil éter (<sup>3</sup>H-CHE, adquirido de Amersham Pharmacia) a los lípidos en la cantidad de 0,5 mCi/mmol de fosfolípidos a modo de etiqueta de líquido radioactivo no intercambiable. La solución acuosa de TEA-Pn (0,5 M trietilamonio, pH 5,7-6,2) se preparó como se explica en el Ejemplo 4. La solución de TEA-Pn (10 veces el volumen del etanol añadido) se mezcló con una solución lípida a 60–65 °C y se agitó a esta temperatura hasta formar una suspensión lechosa y homogénea de vesículas multilamelares. Esta suspensión se extruyó 15 veces a través de 2 filtros grabados con pistas de policarbonato apilados (Corning Nuclepore) con un tamaño de poro de 100 nm usando un extrusor de presión de argón (Lipex Biomembranes) a 60–65 °C, y los liposomas unilamelares resultantes se enfriaron rápidamente en hielo y después se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente. La sal de polifosfato no incorporado y etanol se extrajo por medio de cromatografía de gel en la columna Sepharose CL-4B eluida con la solución tampón MES-Dextrosa (MES 5 mM, 50 g/l de dextrosa, pH ajustado a 6,5 con NaOH).

Se añadió una solución madre de CPT-11 (clorhidrato de irinotecán) que contenía 20 mg/ml de base de irinotecán en agua a los liposomas con una relación fármaco/lípido de 150-200 mg/mmol fosfolípidos, y la mezcla se incubó con agitación ocasional durante 45-60 minutos a 60–62 °C. La mezcla de incubación se enfrió rápidamente y se incubó durante 10 minutos a 0 °C, y después se dejó que alcanzara la temperatura ambiente. Se añadió 1/20 del volumen de NaCl 2,88 M para ajustar la fuerza iónica fisiológica y mejorar la extracción del CPT-11 unido a membrana (al contrario que el fármaco encapsulado dentro del interior del liposoma). El fármaco no encapsulado se extrajo mediante cromatografía en gel en una columna Sephadex G-25 o G-75 (Amersham Pharmacia) eluido con solución tampón HBS-6,5 (5 mM de ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-piperazino)-etilsulfónico (HEPES), NaCl 144 mM, pH 6,5). Las fracciones del liposoma eluidas en el volumen vacío se combinaron, esterilizaron mediante filtración de 0,2 micrómetros y se almacenaron a 4-6 °C antes del uso. Los liposomas se caracterizaron por la concentración del lípido, la concentración del fármaco y el tamaño de partículas como en el Ejemplo 7. Los liposomas tenían un tamaño promedio de 108 nm y un contenido de CPT-11 de 139 ± 18 mg de base de CPT-11 por mmol de fosfolípidos.

La duración del lípido del liposoma y el fármaco del liposoma en la sangre, así como las características de la liberación del fármaco de los liposomas *in vivo*, se estudiaron en ratas hembra Sprague-Dawley (190-210 g) con catéteres venosos centrales permanentes. Se inyectó a las ratas con un bolo de 0,2-0,3 ml de liposomas de irinotecán etiquetados con <sup>3</sup>H-CHE (0,05 mmol de fosfolípidos o 7-8 mg de CPT-11 por kg de peso corporal). Se extrajeron muestras de sangre (0,2-0,3 ml) varias veces después de la inyección usando una jeringa tratada con heparina. El volumen de sangre extraída se repuso usando solución salina fisiológica tamponada con fosfato. Las muestras de sangre se diluyeron con 0,3 ml de PBS frío en hielo que contenía EDTA al 0,04%, pesado, y las células sanguíneas se separaron por medio de centrifugación. Los fluidos sobrenadantes se recogieron y evaluaron para CPT-11 usando el procedimiento fluorométrico del Ejemplo 71, y para la etiqueta de lípido liposomal mediante recuento de radioactividad por centelleo usando métodos convencionales. Las preparaciones de liposomas con concentraciones conocidas de fármaco y lípido <sup>3</sup>H-CHE se utilizaron como patrones. Los patrones de radioactividad contienen una cantidad equivalente de plasma de rata diluido para contabilizar la

inactivación. La cantidad de CPT-11 y lípido liposomal en la sangre se calculó suponiendo un volumen sanguíneo en ml del 6,5% del peso corporal en gramos, y un hematocrito del 40%. La cantidad total del lípido y el fármaco en la sangre se expresó como % de la dosis inyectada (% de D.I., %D.I.) y se representó gráficamente frente al tiempo posterior a la inyección. El porcentaje de fármaco remanente en los liposomas se ha calculado dividiendo la relación fármaco/lípido en las muestras de sangre por la relación fármaco/lípido de los liposomas inyectados (tomado como 100%). Dado que los gráficos demostraban en general una buena coincidencia con la cinética monoexponencial (linealidad en escala semi-logarítmica), la semivida del fármaco, el lípido y la liberación del fármaco desde los liposomas, se calculó a partir del mejor ajuste de los datos a la ecuación de desintegración monoexponencial usando la opción TREND del programa informático Microsoft EXCEL (Microsoft Corp., EE.UU.). Los resultados se muestran en la Figura 1. A partir de los parámetros de mejor ajuste, la semivida en sangre para el lípido y el fármaco era de 16,4 horas y 6,61 horas, respectivamente. En estas condiciones, el CPT-11 puro se elimina de la circulación muy rápidamente (consulte el Ejemplo 69).

La relación fármaco/lípido en sangre relevó un carácter bifásico de la liberación de CPT-11 desde los liposomas (Figura 2). En las primeras 24 horas, la liberación del fármaco fue lineal con el paso del tiempo ( $R=0,992$ ) proporcionando evidencias de cinética de liberación de orden cero. Solo después, aproximadamente un 75% del fármaco se liberó en un plazo de 24 horas, y posteriormente la liberación dejó de ser lineal. Durante 24 horas, los liposomas liberaron el fármaco a una tasa constante de aproximadamente el 3,6% carga inicial/hora. De esta forma, el 50% del fármaco se liberó en un periodo de tiempo de unas 14 horas. La liberación de orden cero del fármaco es un elemento de calidad atractivo en las formulaciones de liberación sostenida, ya que la liberación del fármaco permanece constante en el tiempo.

Ejemplo 10. Eficacia antitumoral de los liposomas CPT-11 preparados usando polifosfato de trietilamonio contra xenoinjertos de cáncer de mama en ratones.

La eficacia antitumoral de los liposomas CPT-11 se estudió en el modelo de carcinoma de mama humano BT-474, un adenocarcinoma ductal dependiente de estrógenos que produce en exceso el receptor C-ErbB2 (HER2). Las células BT-474 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). Se estableció una sub-línea BT-474 con una velocidad de crecimiento tumoral superior a partir del nódulo tumoral del xenoinjerto de crecimiento rápido obtenido como se describe a continuación. Las células se propagaron in vitro en medio RPMI-1460 con suero fetal bovino al 10%, 0,1 mg/ml de sulfato de estreptomina y 100 U/ml de penicilina G en frascos T-150, y se dividieron en una proporción 1:3 cada semana. Se implantaron subcutáneamente a ratones hembra NCR *nu/nu* (4-6 semanas de edad; Taconic Farms) (en la base de la cola) 0,72-mg de gránulos de  $17\beta$ -estradiol de liberación sostenida durante 60 días de (Innovative Research of America, Inc.), y en dos días se inocularon subcutáneamente en la zona posterior superior 0,1 l de una suspensión que contenía  $2 \times 10^7$  células BT-474 en el medio de crecimiento celular. La progresión del tumor se supervisó mediante palpación y mediciones de mediante calibre de los tumores a lo largo del eje más grande (longitud) y más pequeño (anchura) dos veces a la semana. Los tamaños del tumor se determinaron dos veces a la semana a partir de las mediciones de las pinzas usando la fórmula (Geran, R.I., y col., 1972 *Cancer Chemother. Rep.* 3:1-88):

$$\text{Volumen tumoral} = [(\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2] / 2$$

En el día 13 después de la inoculación, el tumor alcanzó un tamaño medio de 200 mm<sup>3</sup> y los animales se asignaron aleatoriamente a tres grupos de 13-15 animales.

Se preparó CPT-11 liposomal como se ha descrito en el Ejemplo 8 (relación fármaco/fosfolípido 192 mg/mmol; tamaño promedio del liposoma 86,8 nm). El CPT-11 puro y liposomal se diluyeron con el vehículo MES-dextrosa a 5 mg/ml de base de CPT-11. Se inyectó a los animales en la vena de la cola con CPT-11 puro, CPT-11 liposomal o el vehículo solo en los días 14, 18, 21 y 25 después de la inoculación del tumor. Las formulaciones que contenían el fármaco se administraron a una dosis de 50 mg de CPT-11/kg por inyección, que es el valor promedio de las dosis registradas en la bibliografía para los estudios de CPT-11 en modelos de tumores en roedores.

Para evaluar la toxicidad relacionada con el tratamiento, los animales también se pesaron dos veces a la semana. Las observaciones se realizaron hasta el día 60 después de la inoculación, momento en que se agotó el gránulo de suplemento de estrógenos. Los volúmenes tumorales promedio en los grupos se representaron conjuntamente y se compararon en el tiempo. Como se muestra en la Figura 3, mientras que el CPT-11 puro reducía la velocidad de crecimiento tumoral, en el grupo que recibió el tratamiento liposomal, los tumores sufrieron una regresión drástica. Mientras que en el día 36 en el grupo de control los tumores alcanzaron el tamaño promedio máximo permisible de 3500 mm<sup>3</sup>, y en el día 46 en el grupo tratado con el fármaco puro, los tumores eran aproximadamente de 1000 mm<sup>3</sup> en promedio, en el mismo momento ningún animal en el grupo tratado con liposomas tenía tumores palpables.

La toxicidad relacionada con el tratamiento se evaluó a partir de la dinámica en el peso corporal de los animales (Figura 4). Ningún grupo reveló una toxicidad significativa. El peso de los animales en el grupo de control aumentó de forma consistente. Hubo una ligera disminución en el peso corporal promedio de los animales que recibían CPT-11 liposomal de aproximadamente un 3,3%, en el día del último tratamiento. Sin embargo, esta pérdida de peso se invirtió, y los animales alcanzaron su peso esperado. Esta reducción en el peso corporal promedio no era significativa a nivel estadístico según el test de la t de Student, en comparación con el peso previo al tratamiento ( $p=0,274$ ). Por ello, podemos afirmar que todos los tratamientos se toleraron sin una toxicidad relevante.

Por tanto, la formulación liposomal de CPT-11 obtenida mediante la carga del fármaco a través de la sal de amonio sustituido capturada previamente con impedimento estérico (trietilamonio) de un polímero polianiónico biodegradable (polifosfato) mostró un aumento extendido de la vida en sangre, características de liberación sostenida y un aumento de la actividad antitumoral en el modelo de tumor estudiado sin un aumento apreciable en la toxicidad.

5 Ejemplo 11. Evaluación comparativa de liposomas cargados con CPT-11 preparados usando sales de trietilamonio -capturadas previamente: efecto del tamaño del liposoma, relación fármaco/lípido y naturaleza del anión -capturado previamente.

10 Se prepararon dos formulaciones prototipo de liposomas cargados con CPT-11, una usando los liposomas con TEA-Pn -capturado previamente y la otra con TEA-SOS -capturado previamente. La preparación de estos liposomas incluyó las siguientes etapas de fabricación.

15 1) *Combinación de lípidos mediante disolución simultánea en etanol.* La composición de la matriz de lípidos estaba formada por 1,2-Distearoil-SN-fosfatidilcolina (DSPC) (Pm 790) 3 partes molares (59,8% en moles); Colesterol (Chol) (peso mol. 387) 2 partes molares (39,9% en moles); y N-(omega-metoxi-poli(etilenglicol)-oxicarbonil)-1,2-distearoilfosfatidil etanolamina (Peso mol. 2787) (PEG-DSPE) 0,015 partes molares (aprox. 0,3% en moles). DSPC y PEG-DSPE se adquirieron de Avanti Polar Lipids, Birmingham, Alabama. El colesterol (grado de pureza más alto) se adquirió de Calbiochem. Los lípidos secos se pesaron con una precisión de  $\pm 0,1$  mg en un contenedor de vidrio de borosilicato y se combinaron con etanol absoluto en la proporción adecuada para la siguiente etapa de dispersión del lípido. Debido a la temperatura de transición elevada de DSPC (55 °C), la disolución se realizó típicamente a 55-60 °C hasta obtener una solución transparente.

25 2) *Preparación de las soluciones de TEA-Pn y TEA-SOS.* El polifosfato de sodio (n=13-18) se compró a Sigma Chemical Co., ref. P 8510. El octasulfato de sacarosa de sodio se compró a Toronto Research Chemicals, Toronto, Canadá, ref. S699020. Las sales se pesaron y disolvieron en agua para obtener soluciones 1,2-2,5 N. Se usaron intercambiadores aniónicos Dowex 50Wx8-200 o Dowex HCR-W2 en forma H<sup>+</sup> (disponible de Sigma) para convertir las sales de sodio en ácidos libres. Antes del primer uso, las resinas se lavaron mediante agitación con 3 volúmenes de las soluciones siguientes, seguido de una decantación: (1) Solución acuosa de HCl 1,0-1,2 M 2 veces; (2) Agua 2 veces; (3) Solución acuosa de NaOH 1,0-1,2 M 2 veces; (4) Agua 2 veces; (5) Solución acuosa de HCl 1,0-1,2 M 2 veces. La suspensión de la resina lavada en agua se envasó bajo flujo por gravedad en una columna cromatográfica de un tamaño adecuado que tiene al menos 8 ml de la resina envasada para cada ml de las soluciones de sal de sodio. La resina se equilibró adicionalmente pasando 2 volúmenes de columna de una solución acuosa de HCl 3,0-3,6 M, seguido de 5 volúmenes de columna de agua o hasta que la conductividad del eluato disminuye por debajo de 1 micro-S. Después del uso, las columnas se regeneraron mediante el paso secuencial de: HCl 1-1,2 M - 3 volúmenes de columna; HCl 3,0-3,6 M - 2 volúmenes de columna; agua - al menos 5 volúmenes de columna, o hasta que la conductividad del eluato sea inferior a 1  $\mu$ S, y se almacenó en agua filtrada con un filtro de 0,2- $\mu$ m a temperatura ambiente. Las soluciones de sal de sodio Pn y SOS se aplicaron a la superficie drenada de la columna (aproximadamente 1 ml por cada 4 ml del volumen de resina envasada) y permitió el flujo bajo gravedad a la velocidad de aproximadamente 1-2 ml/min para el tamaño del lecho de la resina de 75-150 ml. La columna se eluyó con agua. El eluato se sometió a una prueba de conductividad. Se recogieron las fracciones con una conductividad de 10 mS o superior se recogieron. Si se necesitan más soluciones concentradas de poliácidos, la recogida puede empezar a 20 50 mS, pero a costa de una pérdida relativamente alta de la sal de formación de gradiente. En el caso del ácido polifosfórico, la solución recogida se mantiene refrigerada (0-4 °C) hasta la etapa de titulación de la amina, debido a la inestabilidad hidrolítica del enlace fosfodiéster a un pH bajo. Los eluatos recogidos tendrían un pH inferior a 0,7 (normalmente aproximadamente 0,4) y una conductividad de aproximadamente 120-200 mS. Opcionalmente, la etapa de titulación de la amina puede realizarse sin retardo debido a la estabilidad del polifosfato a un valor de pH bajo. Se utilizó trietilamina de calidad HPLC (99,5+% de pureza) procedente de Fisher, ref. 04884 para titular las soluciones ácidas obtenidas del intercambio de iones. La normalidad del TEA puro se determinó mediante titulación potenciométrica. Se recogieron alícuotas de 0,100-ml de TEA (0,100 ml) en 20 ml de agua por triplicado. Las alícuotas se titularon con HCl 0,1 N en solución patrón al punto final de pH (electrodo de vidrio) de 5,5-6,0. La normalidad calculada (7,07 N) era cercana al valor teórico de 7,17 N. Se tituló un volumen medido del ácido polifosfórico (Pn) o la solución del ácido sacarosa octasulfúrico (SOS) con TEA puro bajo el control del electrodo de pH (vidrio). Se necesitó un proceso de agitado intenso para dispersar la amina. El punto final de titulación fue un pH de 5,6-6,2. El volumen del TEA añadido se registró de forma precisa. El volumen de solución titulada se midió y se calculó la concentración de TEA sobre la base del volumen de TEA añadido y la normalidad. Se añadió el agua necesaria para ajustar la concentración de TEA a los valores de 0,55 $\pm$ 0,05 N o 0,65 $\pm$ 0,03 N requeridos, como se indica a continuación. La cantidad de sodio residual en las soluciones de TEA-Pn o TEA-SOS obtenidas se determinó mediante un potenciómetro usando un electrodo de vidrio selectivo al sodio (Corning). Un ml de la solución se diluyó en 19 ml de agua, y la concentración de sodio se determinó usando el método incremental de conformidad con el manual del fabricante del electrodo. La cantidad de sodio residual era inferior a 1 mM y normalmente inferior a 0,5 mM. Las soluciones de TEA-Pn o TEA-SOS obtenidas se pasaron por un filtro estéril de acetato de celulosa de 0,2  $\mu$ m usando una alimentación de presión positiva. El valor de la osmolalidad y el pH final de las soluciones se midió y registró. Los inventores utilizan un electrodo de pH totalmente de vidrio fabricado a partir de una microcombinación de calomelanos para las mediciones del pH y un osmómetro de punto de rocío/presión de vapor para las mediciones de osmolalidad. Las soluciones se almacenaron refrigeradas hasta el momento de su uso.

65

3). Preparación de dispersión lípida en una solución tampón formadora de gradiente mezclando la solución etanólica de los lípidos con la solución tampón formadora de gradiente. Los lípidos se dispersaron en la solución de sal formadora de gradiente usando el método de mezcla con etanol. Todos los pasos se realizaron a 60-65 °C. Los lípidos se disolvieron en Etanol al 100% USP a una concentración de aproximadamente 0,5-0,6 M de DSPC en un tubo o frasco piriforme de vidrio resistente a los productos químicos. La solución de sal formadora de gradiente (TEA-Pn o TEA-SOS) se precalentó a 60-65 °C y se añadió a la solución lípida etanólica de una vez, y los componentes se mezclaron vigorosamente realizando espirales y/o remolinos. La cantidad final de etanol fue de aproximadamente 10% en vol. Para preparaciones a una escala superior a 0,1 mmol de fosfolípido la suspensión resultante se colocó en un evaporador rotatorio a 60-65 °C y se evaporó al vacío con rotación hasta que la evolución del etanol se detuvo, y se manifestó por la ausencia de formación de espuma. Para una escala de 0,1 mmol de fosfolípido o menos, el etanol no se eliminó de la dispersión lípida en esta etapa. Las suspensiones lípidas resultantes se mantuvieron a 60-65 °C y se usaron puntualmente para la etapa de extrusión.

4). *Extrusión secuencial de la dispersión de lípidos a través de membranas de poro definido.* Para volúmenes de suspensión de lípidos de hasta 1 ml, los inventores utilizaron un extrusor de movimiento alternativo accionado manualmente adquirido de Avanti Polar Lipids. El extrusor está cargado con membranas de filtro grabadas con pistas de 19 mm y se ha termostatizado por medio de un bloque calefactor metálico. Para volúmenes de 1 a 10 ml, los inventores utilizaron un extrusor de flujo unidireccional termostatizado con accionamiento mediante presión de gas adquirido de Lipex Biomembranes. El extrusor está cargado con membranas de filtro de 25 mm. Las suspensiones de lípidos se extrudieron repetidamente a 60-65 °C usando alimentación manual o presión de gas argón, según proceda, a través de una serie de 2 filtros de membrana de policarbonato apilados (los filtros de Corning-Nuclepore y Osmonics Corp. eran adecuados de igual forma) que tenían tamaños de poro nominales de 100 nm, 80 nm o 50 nm. Cuando el efecto del tamaño del liposoma era de interés, la extrusión se detuvo en el paso de 100 nm, 80 nm o 50 nm. El tipo exacto de filtros usados y el número de extrusiones se indican a continuación para cada experimento. Los liposomas extrudidos se mantuvieron a 60-65 °C durante aproximadamente 15 min. y se enfriaron rápidamente a 2-4 °C en un baño de hielo. Después de aproximadamente 15 min. en el baño de hielo, se dejó que los liposomas alcanzaran la temperatura ambiente.

5). *Extracción de la solución tampón formadora del gradiente extraliposomal y transferencia de los liposomas a una solución tampón de carga del fármaco.* Se extrajo la sal formadora del gradiente no encapsulado, y los liposomas se transfirieron a la solución tampón de carga del fármaco usando la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La filtración de flujo tangencial, la diálisis de fibras huecas y otros pasos escalables pueden usarse en la fabricación del escalado. Resulta ventajoso garantizar la completa extracción del polianión extraliposomal mediante el tratamiento de los liposomas con una resina de intercambio de aniones (< perlas de poliestireno reticulado con amonio cuaternario Dowex-1 o Dowex-2). La solución tampón de carga del fármaco contenía 50 g/l de dextrosa anhidra USP y HEPES certificado para cultivo de tejidos 5 mM en agua, ajustado a un pH de 6,5 con NaOH. La solución tampón se filtró al vacío usando un filtro de nylon de 0,2 micrómetros (Whatman). Los liposomas extrudidos se sometieron a cromatografía en una columna con Sepharose CL-4B (Pharmacia) y se eluyeron con la solución tampón de carga del fármaco. Los liposomas aparecieron en la fracción de volumen vacío y se recogieron en función de la turbidez del eluato, en el doble de volumen aproximadamente del aplicado. Los liposomas eluidos se evaluaron para determinar la concentración de fosfolípidos siguiendo el Ejemplo 70 de tamaño de partículas según QELS, y se almacenaron a 4-6 °C.

6) *Incubación de liposomas con el fármaco.* La solución madre de CPT-11 (Clorhidrato de irinotecán) se preparó inmediatamente antes de mezclarla con los liposomas disolviendo el clorhidrato de irinotecán en agua para conseguir una concentración base del fármaco de 20 mg/ml. El pH de la solución estaba entre 4,0 y 5,0. La solución del fármaco se filtró usando un filtro estéril de polietersulfona (PES) de 0,2 micrómetros aplicando presión positiva. Las alícuotas de los liposomas en la solución tampón de carga del fármaco producidas en la etapa 5 anterior se mezclaron a temperatura ambiente con la solución madre de irinotecán para conseguir una relación de entrada fármaco/lípido en el intervalo de 0,15-0,55 g de fármaco por mmol de fosfolípido de liposoma. Más abajo se indican las relaciones de fármaco/lípido de entrada, cuando corresponde. El pH de las mezclas se ajustó a 6,5 con NaOH 1 M, las mezclas en los viales de vidrio se incubaron en el baño de agua con hielo (0-2 °C), y se dejó reposar a esta temperatura por durante 15 min. A continuación, los liposomas se dejaron calentar a temperatura ambiente para la etapa siguiente (extracción del fármaco no encapsulado y transferencia a la solución tampón de almacenamiento). Esta etapa generó una eficacia de encapsulación superior al 95%, normalmente 98-100%, en el intervalo completo de de las relaciones fármaco/lípido estudiadas.

7). *Extracción de CPT-11 no encapsulado, transferencia de los liposomas a la solución tampón de almacenamiento, filtración final y almacenamiento.* El fármaco no encapsulado se extrajo y los liposomas se transfirieron a la solución tampón de almacenamiento usando la cromatografía de exclusión por tamaño. La solución tampón de almacenamiento contenía HEPES 20 mM, NaCl 135 mM, pH 6,5 (ajustado con NaOH) en agua, y se filtró al vacío con un filtro de 0,2 micrómetros antes del uso. La cromatografía en gel en Sephadex G-75 (Amersham Pharmacia Biotech) se realizó básicamente como se describe en la Etapa 2 anterior. Los liposomas CPT-11 eluidos de la columna (fracción de volumen vacío) se evaluaron para el fosfolípido del liposoma y CPT-11 (mediante espectrometría, consulte los Ejemplos 70 y 71), y el tamaño de partículas promedio ponderado en volumen mediante QELS. La concentración del fármaco se ajustó, en caso necesario, para que se encontrase en el intervalo de 2,0-4,0 mg/ml. Los liposomas se filtraron usando filtros estériles de polietersulfona de 0,2 micrómetros y se dispensaron asepticamente en viales de polipropileno estériles (Corning Cryo-

Vials) o viales de vidrio de 4 ml de borosilicato con tapón roscado con revestimiento de PTFE aproximadamente 70-80% del volumen del vial. Los viales se cerraron asépticamente (en aire), se etiquetaron y se almacenaron a 4-6 °C.

**Ejemplo 12. Efecto de la relación fármaco/lípido en la eficacia de carga del fármaco y en la retención del fármaco in vivo de los liposomas que contienen TEA-Pn**

Se prepararon liposomas con solución acuosa de TEA-Pn capturada 0,65 N, pH 6,1, osmolalidad 531 mmol/kg, siguiendo el procedimiento del Ejemplo 11. La dispersión lípida se extrudió diez veces usando filtros de policarbonato de tamaño de poro de 100 nm apilados. La matriz lípida de liposoma también incluía el fosfolípido [<sup>3</sup>H]-CHE a 0,5 mCi/mmol. El tamaño del liposoma antes de la carga del fármaco era de 98,5 ± 34,3 nm. Los liposomas se cargaron a proporciones iniciales de fármaco-fosfolípido de 200, 300, 400 y 500 mg CPT-11/ mmol fosfolípido. Las cantidades de fármaco y fosfolípido en los liposomas se determinaron mediante espectrometría siguiendo el Ejemplo 71 y mediante el análisis de fosfomolibdato para extracción de fosfolípido-digestión-azul del Ejemplo 72, respectivamente.

Para evaluar el coeficiente de liberación del fármaco *in vivo* se siguió el método del Ejemplo 8. Los liposomas se inyectaron en la vena de la cola de ratones Swiss Webster de seis semanas de edad (peso corporal 18-22 g) con una dosis de 5 mg CPT-11/kg. En las horas 8 y 24 después de la inyección, se anestesiaron a los ratones del grupo 3 y se desangraron a través de una punción a corazón abierto. La sangre se mezcló con 0,4 ml de 0,04% EDTA enfriado en hielo en PBS, las células en sangres se separaron mediante centrifugación, y la concentración de plasma de CPT-11 se midió mediante espectrofluorimetría como se describe en el Ejemplo 71. El lípido se determinó midiendo el contenido de [<sup>3</sup>H]-CHE usando el recuento de centelleo lípido corregido por inactivación, y la cantidad de fármaco retenido en los liposomas se calculó dividiendo la proporción de fármaco/lípido determinada por la proporción de fármaco/lípido en los liposomas inyectados. Debido a la rápida separación en sangre del CPT-11 libre, que genera un nivel sanguíneo bajo, hemos asumido que todo el fármaco sometido a análisis tenía la forma liposomal.

Los resultados se presentan en la Tabla 8. Las diferencias entre la retención del fármaco entre los grupos no era significativa a nivel estadístico. Como resultado de estos estudios, hemos concluido que el aumento de la carga del fármaco a 500 mg/mmol no afectará negativamente a la carga del fármaco ni a la estabilidad *in vivo*. Esta proporción se ha adoptado para estudios posteriores.

Tabla 8. Efecto de la proporción fármaco/lípido en la carga de fármaco y en la retención del fármaco in vivo en liposomas TEA-Pn de irinotecán (promedio ± desviación estándar).

Proporción fármaco/lípido, mg/mmol fosfolípido			Fármaco remanente en los liposomas, % de valor pre-inyección	
Entrada	Salida	% cargado	Después de 8 horas	Después de 24 horas
200	208,4	104,2	54,6±9,9	9,72±2,23
300	286,3	95,4	85,2±14,3	14,52±2,51
400	348,8	87,2	81,5±18,3	17,31±6,14
500	518,9	103,8	66,8±19,6	13,47±1,44

**Ejemplo 13. Eficacia de carga de fármaco para la carga de CPT-11 en liposomas que contienen TEA-SOS: efecto del tamaño de los liposomas y retención del fármaco in vivo en los ratones.**

Liposomas con soluciones capturadas preparadas como en el Ejemplo 11 usando una solución de formación de gradiente con 0,643 N TEA-SOS, pH 5,7, osmolalidad 530 mmol/kg. La dispersión lípida se extrudió diez veces a través de dos filtros de policarbonato apilados con un tamaño de poro de 50 nm, 80 nm o 100 nm. La matriz lípida de liposoma también incluía [<sup>3</sup>H]-CHE a 1,5 mCi/mmol de fosfolípido de liposoma. El tamaño del liposoma se determinó por medio de dispersión de luz dinámica. Los liposomas se cargaron con CPT-11 en las relaciones iniciales de fármaco-fosfolípido de aproximadamente 550 mg de irinotecán/mmol de fosfolípido. Los liposomas cargados de fármaco se dimensionaron mediante QELS y se evaluaron como se describe en los Ejemplos 70 y 71.

Se inyectó a ratones hembra Swiss Webster (8-10 semanas, 27-30 g de promedio) en la vena de la cola con estas formulaciones de liposomas CPT-11 aplicando una dosis de fármaco de 10 mg/kg. Se sacrificaron los ratones 24 horas después y se recogió y evaluó su sangre para realizar un análisis de CPT-11 y lípidos del liposoma como en el Ejemplo 11. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Carga de irinotecán y retención del fármaco in vivo en liposomas de TEA-SOS.

Tamaño de poro de la membrana de extrusión, nm	Tamaño de liposoma, SD promedio en nm	Carga de fármaco, fosfolípido de irinotecán/mmol	Fármaco remanente en los liposomas después de 24 horas en ratones. % de valor pre-inyección
50	87,6±28,1	579,31±24,2	79,2±3,8
80	98,5±15,1	571,1±69,7	82,6±2,1
100	110,8±25,2	567,7±37,7	86,2±2,7

Sorprendentemente, los liposomas con sal de trietilamonio de octasulfato de sacarosa, un compuesto orgánico hidroxilado polianionizado no polimérico (azúcar), proporcionó una retención del fármaco *in vivo* muy superior (4 o 5 veces) en los liposomas, en comparación con liposomas similares con un polímero polianiónico (polifosfato).

Ejemplo 14. Farmacocinética sanguínea de liposomas de SOS-TEA cargados con CPT-11 en ratas.

Los liposomas (tamaño de poro de membrana de extrusión de 100 nm) se prepararon como se describe en el Ejemplo 12. El liposoma se administró intravenosamente a una dosis de 10 mg de CPT11/kg a dos ratas hembra Sprague (Harlan) de nueve semanas de edad (peso corporal de aproximadamente 200 g) con un catéter venoso central permanente y una dosis de 10 mg de CPT-11/kg (17,6  $\mu$ mol de fosfolípidos/kg). Se recogieron muestras de sangre en los puntos temporales indicados y se analizaron para determinar el contenido de lípido en el liposoma como en el ejemplo 9. Los datos se expresaron en % de dosis de lípido inyectado/ml de plasma y el % del fármaco retenido dentro del liposoma en cada punto temporal, representado gráficamente frente al tiempo posterior a la inyección, y la semivida para el lípido del liposoma, así como la semivida de liberación del fármaco desde los liposomas, calculados para adaptarse mejor al modelo cinético monoexponencial (Fig. 5). La semivida de liberación del fármaco de los liposomas TEA-SOS cargados con CPT-11 fue de 56,8 horas, mucho más que la semivida de liposomas TEA-Pn similares.

Ejemplo 15. Actividad antitumoral de CPT-11 libre y CPT-11 encapsulado en ratones atímicos lampiños con xenoinjertos subcutáneos de carcinoma de colon humano (HT-29).

Los liposomas se prepararon como en el Ejemplo 11 usando la solución TEA-Pn con TEA 0,65 M, pH 6,1, y una osmolalidad de 531 mmol/kg, o solución TEA-SOS con TEA 0,643 M, pH 5,7, y osmolalidad de 530 mmol/kg. La extrusión incluía 10 pasos por dos membranas de policarbonato apilados con un tamaño de poro de 100 nm. Los liposomas TEA-Pn y TEA-SOS resultantes tenían un tamaño de 112,3±15,5 nm y 120,5±42,5 nm, respectivamente (media± SD de la distribución de tamaños). Los liposomas se cargaron con CPT-11 en la proporción de entrada de fármaco/fosfolípido de 500 mg/mmol. Los liposomas resultantes tenían un contenido de fármaco de 465,6 ± 26,5 (93% de eficacia de carga) y 499,9±22,5 mg (100% de eficacia de carga) del fosfolípido CPT-11/mmol para las formulaciones de TEA-Pn y TEA-SOS, respectivamente.

Las células HT-29 se obtuvieron de la American Type Culture Collection, Rockville, MD, y se propagaron en el medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 50 U/ml de penicilina G y 50  $\mu$ g/ml de sulfato de estreptomina a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% siguiendo las recomendaciones del proveedor. Los ratones macho atímicos lampiños NCR *nu/nu* homocigóticos (6 semanas de edad, peso de 16 g como mínimo) se adquirieron de Charles River. Se inoculó a los ratones por vía subcutánea en el costado derecho con 0,1 ml de suspensión que contenía 5 x 10<sup>6</sup> células suspendidas en el medio de crecimiento sin antibióticos. Once días después, los animales con tumores con tamaños entre 150 mm<sup>3</sup> y 350 mm<sup>3</sup> se asignaron a los grupos de tratamiento siguiendo el método siguiente. Los animales se clasificaron en función del tamaño del tumor y se dividieron en 6 categorías de tamaño de tumor decreciente. Se formaron seis grupos de tratamiento de 11 animales/grupo seleccionando de forma aleatoria un animal de cada categoría de tamaño, para que en cada grupo de tratamiento todos los tamaños de tumores estuviesen representados de forma igualitaria. Empezando en el día 13, los animales recibieron cuatro inyecciones en la vena de la cola, a intervalos de 4 días, de las preparaciones siguientes: 1) Control (solución salina tamponada con HEPES pH 6,5); 2) CPT-11 libre a 50 mg/kg, administrado como 5 mg/ml de solución preparada recientemente en solución salina fisiológica sin tampón; 3) CPT-11 de TEA-Pn liposomal a 25 mg/kg por inyección; 4) CPT-11 de TEA-Pn liposomal a 50 mg/kg por inyección; 5) CPT-11 de TEA-SOS liposomal a 25 mg/kg por inyección; 6) CPT-11 de TEA-SOS liposomal a 50 mg/kg por inyección. El peso del animal y el tamaño del tumor se supervisaron dos veces a la semana como se describe en el Ejemplo 10. El peso del tumor se restó de los resultados de pesada de los animales para obtener el peso corporal del animal. Los animales se observaron en los 60 días posteriores a la inoculación del tumor. Cuando los tumores en el grupo alcanzaron el 20% del peso corporal de los ratones, los animales del grupo se sometieron a eutanasia. Se produjeron regresiones completas de los tumores en algunos grupos sin signos de recrecimiento tumoral al final del estudio. Los tejidos en el lugar de inoculación del tumor de estos animales se recogieron y preservaron para realizar análisis patológicos de células tumorales residuales.

Los resultados de este estudio se muestran en las Figuras 6 y 7. El CPT-11 libre solo tuvo un efecto menor en el crecimiento del tumor. Todos los liposomas tenían un efecto pronunciado resultante en la regresión del tumor seguida de un recrecimiento en la mayoría de animales. La dosis de 50 mg/kg fue más efectiva que la dosis de 25 mg/kg en los liposomas TEA-Pn y TEA-SOS CPT-11. Los tiempos medios de duplicación del tumor calculados a partir de los datos

sobre el tamaño de los tumores (Fig- 7) fueron: control - 4,2 días; fármaco libre, 50 mg/kg - 4,8 días; Fármaco liposomal TEA-Pn, 25 mg/mg - 43,6 días; Fármaco liposomal TEA-Pn, 50 mg/kg - 47,5 días; Fármaco TEA-SOS liposomal a 25 mg/kg - 48,2 días y fármaco liposomal TEA-SOS a 50 mg/kg - más de 56 días (no se duplicó el tiempo). De esta forma, el CPT-11 liposomal preparado como se indica en la presente invención era al menos 10 veces más activo que el fármaco libre, administrado en la misma dosis y en el mismo calendario. Inesperadamente, los liposomas TEA-SOS CPT-11 fueron más efectivos a la hora de reducir el crecimiento tumoral que los liposomas TEA-Pn CPT-11 administrados con la misma dosis. Mientras que en los grupos tratados con el fármaco libre y el fármaco TES-Pn liposomal a 50 mg/kg por inyección no había animales sin recrecimiento tumoral, en los grupos que recibían 25 mg/kg de cada formulación liposomal, un animal (9,1%) no tenía tumor al final del estudio, y en el grupo que recibía 50 mg/kg de formulación CPT-11 de TEA-SOS liposomal, al final del estudio 4 animales (36,4%) no tenían tumor ni signos de recrecimiento.

El fármaco manifestó cierta toxicidad. Los animales que recibieron CPT-11 libre, y no CPT-11 liposomal, experimentaron una morbilidad temporal (pérdida del estado de alerta, postura encorvada, pelaje erizado, movilidad reducida) durante una hora después de la inyección del fármaco. Los animales que recibieron CPT-11 libre sufrieron una pérdida permanente del 6% de peso durante el tratamiento, y no se recuperaron. Los animales que recibieron las dos fórmulas liposomales de CPT-11 experimentaron una pérdida de peso transitoria entre las inyecciones segunda y tercera con una media del 5% (a 25 mg/kg) o cerca del 9% (a 50 mg/kg) del valor previo al tratamiento, y eventualmente alcanzaron el peso normal. Por lo tanto, la toxicidad del fármaco liposomal no era superior a la del fármaco libre (no liposomal), mientras que la eficacia del fármaco liposomal era sustancialmente superior. La pérdida de peso se invirtió al finalizar el tratamiento con el fármaco y todos los animales recuperaron su peso sin morbilidad terminal ni fallecimiento tóxico. Posteriormente, los animales ganaron peso simultáneamente con regresiones tumorales. En el grupo de control con solución salina, los animales que desarrollaron tumores grandes experimentaron pérdida de peso debido de forma evidente a la morbilidad asociada al tumor. En general, la formulación del fármaco liposomal donde el fármaco se había cargado en los liposomas con azúcar polianionizado -capturado previamente (octasulfato de sacarosa) demostró ser la más eficaz y menos tóxica que el fármaco no liposomal.

#### Ejemplo 16. Toxicidad de CPT-11 libre y liposomal en ratones.

Las toxicidades agudas de CPT-11 encapsulado en liposomas y CPT-11 libre preparados según de la presente invención se compararon mediante la determinación de la dosis máxima tolerada (MTD) después de la inyección única intravenosa en ratones ordinarios (inmunocompetentes).

Se emplearon los siguientes materiales:

1) Preparación de CPT-11 (clorhidrato de irinotecán) con clorhidrato de irinotecán al 98,9% mediante HPLC, y 7,6% de humedad. En este estudio se prepararon formulaciones de fármacos "tal cual", sin corrección del contenido de humedad ni del contenido de base de irinotecán.

2) El CPT-11 (Ls-CPT-11) liposomal se preparó como en el Ejemplo 11, usando una matriz lipídica de 200 partes en moles de DSPC, 133 partes en moles de colesterol y 1 parte en moles de PEG-DSPE; solución capturada de TEA-SOS con TEA 0,65 M, pH 6,4; fármaco cargado en los liposomas en solución tampón HEPES 5 mM, dextrosa al 5%, pH 6,5, a 60 °C durante 30 min en la relación de entrada fármaco/lípido de 500 mg fármaco/mmol de fosfolípido. La eficacia de carga era >99%. Tamaño del liposoma (promedio de volumen medio  $\pm$  desviación estándar según QELS):  $101 \pm 37$  nm. Los liposomas se formularon en el vehículo, HEPES-Na 20 mM, NaCl 135 mM; pH 6,5. Las concentraciones de fármacos en las formulaciones inyectadas fueron las que se especifican en las Tablas siguientes.

3) Solución CPT-11 libre. La solución madre de fármaco libre se preparó disolviendo clorhidrato de irinotecán en una solución acuosa de dextrosa al 5% a 22 mg/ml, esterilizado mediante filtración con un filtro de 0,2- $\mu$ m. Esta solución madre se diluyó con dextrosa estéril al 5% antes de la inyección.

4) Animales. Ratones hembra Swiss Webster, 6-8 semanas de edad, adquiridos de Harlan, EE. UU.

La determinación de MTD iba seguida generalmente del protocolo adoptado por el United States National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program (Programa terapéutico del desarrollo del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos). El protocolo incluía los siguientes tres etapas:

Etapa 1): Etapa de determinación del intervalo con el factor de escalado de dosis de 1,8. Se inyectó a los grupos de dos animales en la vena de la cola con dosis crecientes del irinotecán libre o irinotecán liposomal, empezando con una dosis de 60 mg/kg, y siguiendo con un factor de escalado de la dosis de 1,8, hasta observar una mortalidad aguda o morbilidad terminal (en >1 día después de la inyección) en cualquiera de los animales. Se registró la dosis en una etapa por debajo de la dosis de morbilidad /mortalidad terminal.

Etapa 2): Etapa de determinación del intervalo con el factor de escalado de dosis de 1,15. Se inyectó a los grupos de dos animales en la vena de la cola con dosis crecientes del irinotecán libre o el irinotecán liposomal, empezando con la dosis registrada en la Etapa 1, y siguiendo con un factor de escalado de la dosis de 1,15, hasta observar una

mortalidad aguda o morbilidad terminal (en >1 día después de la inyección) en cualquiera de los animales. Se registró la dosis en una etapa por debajo de la dosis de morbilidad /mortalidad terminal en el MTD tentativo.

5 Etapa 3): Etapa de validación. Se inyectó al grupo 5 de animales por vía intravenosa. (vena de la cola) con irinotecán libre o liposomal en el MTD tentativo determinado en la Etapa 2. Se hizo un seguimiento de los animales durante 7 días, se registró el peso corporal de los animales dos veces a la semana y se comparó con el peso previo a la inyección. Se observó el estado de salud general de los animales (estado de alerta, aseo, alimentación, excreciones, piel, pelaje y membrana mucosa, deambulación, respiración, postura). Si durante el periodo de observación no hay mortalidad, morbilidad progresiva o pérdida de peso superior al 15% del peso corporal previo a la inyección, la dosis se considera validada como inyección de MTD única aguda. Si se produce uno de estos efectos, el experimento se repite en la siguiente dosis inferior en un factor de 1,15.

15 Para obtener estadísticas adicionales para la etapa de validación, la dinámica de peso corporal de los animales supervivientes se supervisa hasta en los 11 días posteriores a la inyección. La dosis superior a 324 mg/kg del irinotecán liposomal no se pudo administrar debido a las limitaciones de volumen de inyección y concentración. Los resultados se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Estudio de determinación de MTD de formulaciones CPT-11 en ratones.

20 Resultados

Etapa 1. Aumentar la dosis en un factor de 1,8

fármaco	iny. Dosis (mg/kg)	conc. fármaco (mg/ml)	Volumen iny. (µl)	N.º ratón	Peso corporal del animal, en día posterior a la inyección							
					0 (g)	1 (g)	2 (g)	4 (g)	5 (g)	6 (g)	7 (g)	11 (g)
Ls-CPT11	60	8	150	1	19,2	18,0	nd	20,3	20,6	20,6	20,0	19,7
				2	19,7	19,3	nd	20,6	20,4	19,6	19,7	20,7
	100	12	165	1	19,5	18,6	nd	19,6	20,0	20,1	19,4	19,9
				2	20,1	18,9	nd	20,2	21,5	22,2	21,8	22,5
	180	22	165	1	19,4	18,4	nd	18,9	19,7	20,5	19,5	20,5
				2	20,0	19,3	nd	19,6	20,6	21,4	21,6	21,7
	324	30,6	210	1	21,8	21,2	21,2	nd	20,2	nd	20,2	nd
				2	21,6	20,4	21,3	nd	20,8	nd	21,4	nd
CPT11 libre	60	8	150	1	20,6	20,4	nd	22,1	22,1	22,2	22,0	22,5
				2	19,5	19,1	nd	20,1	20,3	20,4	20,5	21,1
	100	12	165	1	19,3	murió 1-2 min después de la inyección						
				2	20,1	murió 1-2 min después de la inyección						
				3	19,9	murió 1-2 min después de la inyección						

Después de la inyección, todos los ratones tratados con CPT11 estaban enfermos, sin aliento durante 1 hora y después se recuperaron

Después de la inyección, todos los ratones tratados con Ls-CPT11 se encontraban en condiciones normales.

Etapa 2. Aumentar la dosis en un factor de 1,15

fármaco	iny. Dosis (mg/kg)	conc. fármaco (mg/ml)	Volumen iny. (µl)	N.º ratón	Peso corporal del animal, en día posterior a la inyección				
					0 (g)	1 (g)	2 (g)	5 (g)	7 (g)
CPT11 libre	60	8	150	3	19,9	20,0	20,9	19,9	21,3
				4	19,5	18,7	19,4	18,8	18,9
	70	8	175	5	20,9	20,0	20,6	19,3	20,4
				6	22,3	21,8	22,4	22,4	22,8
				7	20,6	19,9	20,1	19,9	20,9
	80	8	200	8	20,6	20,8	21,1	20,7	21,4
				9	murió 1-2 min después de la inyección				
				10	murió 1-2 min después de la inyección				
				11	murió 1-2 min después de la inyección				
	90	12	150	11	murió 1-2 min después de la inyección				
				8	225	murió 1-2 min después de la inyección			

Etapa 3. Validación

	fármaco	iny. Dosis (mg/kg)	conc. fármaco (mg/ml)	Volumen iny. (µl)	N.º ratón	Peso corporal del animal, en día posterior a la inyección			
						0 (g)	3 (g)	5 (g)	7 (g)
5	CPT11 libre	80	8	200	1	20,2	19,3	20,0	21,7
					2	20,5	20,6	20,5	21,2
					3	20,7	20,6	20,8	21,9
10					4	20,8	21,4	22,1	23,0
					5	21,9	21,9	21,6	21,5
15	Ls-CPT11	324	365	180	6	21,0	20,0	20,1	20,2
					7	20,4	20,4	20,2	19,2
					8	20,4	19,8	20,3	20,7
					9	20,9	19,9	20,5	21,5
					10	20,7	19,5	19,8	20,2

20 Por ello, mientras el MTD de CPT-11 libre era de 80 mg/kg, el MTD de CPT-11 liposomal, sorprendentemente, no se alcanzó incluso en la dosis administrada más alta de 324 mg/kg. Por consiguiente, la encapsulación de liposomas de CPT-11 según la presente invención redujo la toxicidad del fármaco en al menos 4 veces.

25 Ejemplo 17. Estabilidad en almacenamiento de liposomas TEA-SOS cargados con CPT-11 frente a fugas de fármaco.

Se prepararon cinco lotes de CPT-11 liposomal usando el método TEA-SOS (Ejemplo 11), con una relación de entrada fármaco/lípido de 500-550 mg/mmol de fosfolípido. Los liposomas se prepararon mediante extrusión de membrana usando membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 80 nm o 100 nm, como se indica en la tabla siguiente. Los liposomas se esterilizaron con un filtro de 0,2-µm y se almacenaron a 3,4-14,5 mg/ml de CPT-11 en NaCl 135 mM, HEPES-Na 20 mM, pH 6,5 (solución tampón de almacenamiento), a 4-8 °C. Después del tiempo de almacenamiento indicado, la fuga de fármaco se eliminó mediante cromatografía en gel en Sephadex G-75 usando la solución tampón de almacenamiento como eluyente. Las concentraciones de fármaco y fosfolípido en los liposomas antes y después de la cromatografía en gel se sometieron a análisis usando el método de espectrofotometría y el método de digestión ácida del fosfomolibdato azul, respectivamente, como se describe en los Ejemplos 70 y 71. Los liposomas CPT-11 preparados según la presente invención eran muy estables. La fuga de CPT-11 de estos liposomas durante el almacenamiento fue inferior al 5% en un periodo de 6 meses (Tabla 10).

40 Tabla 11. Estabilidad a la encapsulación de liposomas CPT-11 durante el almacenamiento (los datos son promedios±SE).

	N.º lote liposoma	Tamaño de poro de extrusión, nm	Concentración de CPT-11, mg/ml	Tiempo de almacenamiento, meses	% fármaco que queda encapsulado
45	1	80	3,44±0,06	6	99,02±3,77
	2	80	7,88±0,19	6	102,38±4,78
	3	100	4,57±0,06	6	96,38±4,69
	4	100	4,62±0,11	6	95,72±4,36
50	5	80	14,52±0,42	3	103,4±5,92

55 Ejemplo 18. Liposomas cargados con topotecán.

Los liposomas con solución TEA-Pn capturada y solución TEA-SOS se prepararon como en el Ejemplo 11. La solución madre de clorhidrato de topotecán (GlaxoSmithKline, PA, EE. UU.) se preparó inmediatamente antes de mezclarla con los liposomas disolviendo el clorhidrato de topotecán en agua a 15-20 mg/ml, contando el contenido de HCl en el topotecán real. El pH se ajustó a 3,0 con HCl 1 N. La solución del fármaco se filtró usando un filtro estéril de polietersulfona (PES) de 0,2 micrómetros aplicando presión positiva. Las alícuotas de los liposomas que contienen TEA-Pn o TEA-SOS en la solución tampón de carga del fármaco se mezclaron a temperatura ambiente con la solución madre de HCl de topotecán para conseguir una relación de entrada de fármaco/lípido en el intervalo de 0,15-0,45 g/mmol de fosfolípido liposomal. La proporción recomendada era 0,35 g de HCl de topotecán por mmol de fosfolípido liposomal. Las mezclas en los contenedores de vidrio se incubaron en un baño de agua termostatzado a 55-62 °C con agitación lenta durante 30-60 min, se enfriaron rápidamente en baños de agua helada (0-2 °C) y se dejaron reposar a esta temperatura durante 5-15 min. Esta etapa generó una eficacia de encapsulación del 89-90% (gradiente TEA-Pn) o del 97-100% (gradiente TEA-SOS). El topotecán no encapsulado se extrajo y los liposomas se transfirieron a

la solución tampón de almacenamiento usando la cromatografía en columna por exclusión de tamaño. Antes de la aplicación en la columna, la fuerza iónica de la preparación del liposoma se aumentó mezclando con 1/20 vol. de una solución acuosa de cloruro de sodio 2,88 M y la mezcla se incubó durante aproximadamente 15 minutos. Los inventores descubrieron de forma inesperada que ajustar la fuerza iónica del medio del liposoma desde el valor bajo durante la carga (normalmente equivalente a menos de NaCl 20 mM) al valor más alto del anterior NaCl 20 mM, y preferiblemente a NaCl 50 mM y superior, mejoraba la extracción de fármaco no encapsulado y aumentaba la estabilidad de los liposomas cargados con topotecán frente a la agregación, posiblemente facilitando la extracción del topotecán unido a la membrana, de forma contraria al fármaco encapsulado en el interior del liposoma. El resto del procedimiento siguió el Ejemplo 11, etapa 7. Para los resultados, consulte la siguiente Tabla 12.

**Ejemplo 19. Preparación de formulaciones inmunoliposomales de topotecán dirigidas contra HER2.**

Los inmunoliposomas de topotecán especialmente internalizables por células cancerígenas con una sobreexpresión de oncoproteína de tirosina quinasa del receptor superficial de HER2 (C-ErbB-2) se prepararon conjugando liposomas de topotecán en un fragmento de anticuerpo Fv humano monocatenario dirigido contra HER2, F5, seleccionado de la biblioteca de expresión de fagos para su internalización alta en células con una sobreexpresión de HER2 (Poul, y col., 2000, J. Molecular Biology, v. 301, pág.1149-1161). F5 es una proteína de 27-KDa que se une al dominio extracelular del receptor HER2 con una afinidad de aproximadamente 150 nM, provocando una rápida internalización (Neve, y col., 2001, Biophys. Biochim. Res. Commun. v. 280, pág. 274-279). Para la conjugación de liposomas, se siguió el método de la patente US-6.210.707 y el de Nielsen, y col. (2002), Biochim. Biophys. Acta, v. 1591, pág.109-118, con carácter general. Primero se preparó un conjugado del lipopolímero hidrófilo de F5. El extremo C de la cadena de aminoácidos F5 tenía un grupo cisteína terminal añadido (F5Cys). La construcción de F5Cys se expresó en E. coli y se aisló del lisado bacteriano por medio de cromatografía en columna de la proteína A. Las fracciones eluidas de proteína A se adsorbieron en la resina de intercambio aniónico para eliminar los pirógenos y el ADN hospedador, y se trataron con un agente reductor del tiol para liberar el grupo tiol de la cisteína terminal. El F5Cys reducido se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio de iones usando SP Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia). La proteína purificada se conjugó con un enlazador de lípido-poli(etilenglicol) reactivo al tiol, N-(3-(N-maleimido)propionilamido)-poli(oxietileno)-oxicarbonil)-1,2-distearoilfosfatidil etanolamina (Mal-PEG-DSPE), un derivado de PEG con un peso mol. de 2000 (Figura 4.1), producido comercialmente por Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, EE. UU. La proteína y el enlazador se incubaron en una solución tampón acuosa con una relación molar 1:4, y el enlazador no reaccionado se inactivó con cisteína 1 mM. Durante la reacción, la cisteína terminal de F5Cys se unió covalentemente al grupo maleimido del enlazador. El conjugado F5-PEG-DSPE resultante era soluble en agua en forma de micelas con un peso molecular aparente alto (500-850 KDa), y se separó de la proteína sin reaccionar (aproximadamente 25%) mediante cromatografía de exclusión por tamaño. La cantidad de proteínas en el conjugado purificado se determinó mediante espectrofotometría UV a 280 nm, y la cantidad de enlazador se evaluó usando un método espectrofotométrico idéntico al utilizado para la cuantificación de fosfolípidos (consulte el Ejemplo 70). El conjugado F5-PEG-DSPE purificado era estable en agua, completamente inmunorreactivo, y era estable frente a la desnaturalización y la pérdida de reactividad durante al menos 1 hora a 65 °C y al menos durante 3 meses a 37 °C.

Para preparar topotecán inmunoliposomal dirigidos contra HER2, los liposomas cargados con topotecán del Ejemplo 18 de mezclaron con F5-PEG-DSPE en solución salina tamponada acuosa con una proporción de 15 microgramos de proteína por 1 micromol de fosfolípido (aproximadamente 45 copias de F5 por liposoma). La mezcla se incubó durante 40 min. a 60 °C, se enfrió en hielo, y se realizó una cromatografía en una columna con Sepharose CL-4B (perlas de agarosa reticuladas al 4%, Amersham Pharmacia) para eliminar el conjugado micelar residual, la proteína no conjugada y cualquier traza de fármaco extraliposomal que pueda haberse liberado durante la incubación. Los liposomas con F5-PEG-DSPE incorporado en la membrana se eluyeron con solución tampón HEPES 5 mM - NaCl 144 mM pH 7,4, y se recogieron en el volumen vacío de la columna, se filtraron de forma estéril y se dispensaron para su almacenamiento (4-6 °C). La cantidad de F5 incorporado en el liposoma era normalmente >80% del conjugado añadido. Se determinó mediante SDS-PAGE de los liposomas con cuantificación de la banda F5 con tinte Coomassie mediante densitometría. Las concentraciones de fármaco y lípido en las preparaciones inmunoliposomales se determinaron de forma similar a los liposomas no dirigidos. Las propiedades de los liposomas de topotecán y los inmunoliposomas F5 (Ejemplos 18-19) se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Características de liposomas de topotecán e inmunoliposomas.

	Sal capturada en el liposoma	Unión F5 scFv:	Relación fármaco/lípido, g/mmol de fosfolípido		% de encapsulación	Tamaño del liposoma, promedio±SD, nm
			Entrada	Salida		
	TEA-Pn	No	173,6	155,2±5,9	89,4±3,4%	96,4±38,7
	TEA-Pn	Sí	173,6	156,2±5,2	90,0±3,0%	96,2±33,8
	TEA-SOS	No	347,2	340,8±14,7	98,2±4,2%	99,1±32,6

Ejemplo 20. Efecto del pH de la solución tampón de carga y la relación fármaco/lípido para cargar el topotecán en los liposomas.

5 Se prepararon liposomas (DSPC/Chol/PEG-DSPE, relación molar 3:2:0,015) con TEA-Pn 0,5 N capturado, pH 6,2, osmolalidad 413 mmol/kg, usando el método de inyección de etanol (Ejemplo 18), extrudido a través de dos filtros de policarbonato apilados con un tamaño de poro de 100 nm 5 veces y con un tamaño de poro de 50 nm 10 veces. La solución tampón de carga era MES 5 mM, 50 g/l de Dextrosa, ajustada a varios pH en el intervalo 5,0-6,5. El tamaño del liposoma era de  $73,1 \pm 21,3$  nm según QELS. Los liposomas se cargaron mezclando una solución madre de topotecán (20 mg/ml) con los liposomas en la solución tampón de carga en la relación de entrada fármaco-fosfolípido de 100 mg/mmol, incubando la mezcla a 60 °C durante 45 min, inactivándola en hielo durante 15 minutos y extrayendo el fármaco no encapsulado usando una columna Sephadex G-75 eluida con HEPES 20 mM, NaCl 135 mM, pH 6,5. El topotecán y el fosfolípido se cuantificaron mediante espectrofotometría (Ejemplos 70 y 71). Los resultados (Tabla 13) indicaron que la carga de topotecán era casi cuantitativa en el intervalo de pH 5,5-6,5.

Tabla 13. Efecto del pH de la solución tampón de carga sobre el % de encapsulación de topotecán en los liposomas con TEA-Pn capturado.

pH de la solución tampón de carga	% de encapsulación
5,0	50,1±2,1
5,5	97,2±8,1
6,0	115,5±15,0
6,5	102,1±8,1

Se estudió también el efecto de la relación fármaco-lípido (0,15-0,45 mg/mmol de fosfolípido) sobre la eficacia de carga. Los liposomas con TEA-Pn (0,5 M TEA, pH 5,8, osmolalidad 480 mmol/kg) capturado se prepararon como se ha descrito anteriormente, excepto la etapa de extrusión final que era de 10 veces a través de dos filtros de policarbonato de 0,08 µm apilados. La carga se realizó a un pH de 6,5. El tamaño del liposoma era de  $93,1 \pm 15,1$  nm según QELS. Los resultados (Tabla 14) indicaron que la eficacia de carga del fármaco era superior al 85% sobre el intervalo completo de relaciones fármaco/lípido estudiadas.

Tabla 14. Efecto de la relación fármaco/lípido sobre la eficacia de encapsulación de topotecán en los liposomas que contienen TEA-Pn.

Relación de entrada	Relación de topotecán/fosfolípido, mg/mmol		% de encapsulación (promedio±S)
	Relación de entrada	Relación de salida (después de la carga)	
168,2		166,9±11,1	99,2±6,6
224,4		232,5±47,6	103,7±21,2
280,3		253,5±19,8	90,4 ± 7,0
336,4		298,3±18,0	88,7±5,3
392,5		361,2±36,8	92,0±9,4
448,5		394,9±29,5	88,0±6,6

Ejemplo 21. Estabilidad del liposoma de topotecán in vitro en presencia de plasma.

50 Se prepararon liposomas (DSPC/Chol/PEG-DSPE, relación molar 3:2:0,015) con TEA-Pn 0,5 capturado, pH 6,2, osmolalidad 413 mmol/kg, como se describe en el Ejemplo 18. Los liposomas con un tamaño de  $96,4 \pm 29,3$  nm se produjeron mediante 10 extrusiones a través de dos filtros de policarbonato de tamaño de poro 100 nm. Para la cuantificación del lípido del liposoma en plasma, se incluyó [<sup>3</sup>H]-CHE en la solución lípida a 0,5 µCi/µmol de DSPC. El topotecán se cargó a un pH de 6,0, 58 °C durante 45 min en una proporción de fármaco/fosfolípido de 150 mg/mmol. La eficacia de la carga era de  $148,48 \pm 10,26$  µg topotecán/µmol fosfolípido ( $99,0 \pm 6,8\%$ ).

Los liposomas se incubaron con plasma humano al 50% en un dispositivo de microdiálisis de varios pocillos (Spectra-Por MicroDialyzer 10 pocillos, Spectrum, EE. UU.). El plasma de donante humano se diluyó con el mismo volumen de solución salina tamponada con HEPES (HEPES 20 mM, NaCl 135 mM), pH 6,5, que contenía azida de sodio al 0,02% y se cargó en el depósito inferior del dializador (32 ml). Los pocillos (0,4 ml) se separaron del depósito usando una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 30 nm, para permitir el paso libre de las proteínas de plasma y las moléculas pequeñas pero no de los liposomas. Los liposomas se mezclaron con cantidades calculadas de plasma y solución salina tamponada con HEPES para conseguir una concentración de fosfolípido 2,5 mM y 50% en vol. de plasma. El dispositivo se incubó a 37 °C y los contenidos del depósito se agitaron lentamente. Después de 8 horas de incubación, los contenidos del depósito inferior se cambiaron por

plasma fresco al 50%. En puntos temporales específicos (consulte más abajo), se extrajeron alícuotas de 50- $\mu$ l de los pocillos, y se realizó una cromatografía en las columnas con 2,2-2,4 ml de Sepharose CL-2B, solución salina tamponada con HEPES de eluyente para separar los liposomas de las proteínas de plasma y el fármaco libre. Los liposomas se recogieron en las fracciones de volumen vacío. El topotecán se cuantificó mediante fluorometría usando excitación a 384 nm y emisión a 524 nm después de la solubilización de las muestras de plasma en una solución acuosa de isopropanol al 90% - HCl 0,1 N, y el lípido se cuantificó mediante recuento por centelleo de [<sup>3</sup>H]-CHE (corregido para la inactivación). La relación fármaco-lípido determinada se comparó con la relación inicial antes de la incubación para obtener el % de topotecán que quedaba encapsulado en cada punto temporal. Después de 8 horas de incubación, la cantidad de fármaco remanente en el liposoma era aproximadamente del 55% de su valor inicial (Tabla 15).

Tabla 15. Liberación *in vitro* de topotecán desde los liposomas cargados en un gradiente de TEA-Pn en plasma humano al 50% a 37 °C.

Tiempo de incubación, horas	% fármaco que queda encapsulado
1	95,5 $\pm$ 5,4
4	76,8 $\pm$ 7,3
8	55,9 $\pm$ 4,1
24	55,4 $\pm$ 16,8

Ejemplo 22. Liposomas de topotecán en un gradiente de TEA-Pn capturado en varias relaciones de fármaco/lípido: retención del fármaco *in vivo* y duración de circulación en ratones.

Los liposomas (DSPC/Chol/PEG-DSPE en la relación molar 3:2:0,015, que contienen [<sup>3</sup>H]-CHE a 0,5 mCi/mmol DSPC) con solución salina formadora de gradiente encapsulado (TEA-Pn 0,5 N, pH 6,2, osmolalidad 413 mmol/kg) se prepararon como en el Ejemplo 18 usando extrusión 12 veces a través de dos filtros de policarbonato de tamaño de poro 100 nm apilados. El tamaño del liposoma era de 107,7  $\pm$  19,1 nm según QELS. Los liposomas en HEPES 5 mM, 50 g/l de Dextrosa, pH 6,5 se mezclaron con la solución madre acuosa de topotecán (20 mg/ml) en las relaciones de fármaco/fosfolípido en el intervalo de 130-360  $\mu$ g / $\mu$ mol, seguido de la incubación de la muestra a 58 °C durante 45 min, colocándola en hielo durante 15 minutos y retirando el fármaco no encapsulado mediante cromatografía con Sephadex G-75. Se inyectó a los ratones hembra FvB de doce semanas de edad con liposomas en la vena de la cola con una dosis de 5 mg de topotecán por kg de peso corporal (aprox. 0,2 mg topotecán/animal) por triplicado. En los tiempos indicados, normalmente 8 o 24 horas después de la inyección, se anestesió a los ratones, se desangraron y las muestras de sangre se analizaron para detectar el contenido de fármaco y lípido de liposoma como en el Ejemplo 8. Los resultados se muestran en la Tabla 16. Después de 24 horas, cerca del 6-32% de la carga de fármaco inicial seguía estando encapsulada. Las cargas superiores del fármaco (>200 mg/mmol fosfolípido) dieron como resultado una retención prolongada del fármaco.

Tabla 16. Retención del fármaco *in vivo* y duración en circulación de los liposomas de topotecán prototipo cargados usando el método de gradiente TEA-Pn en distintas relaciones de fármaco/lípido.

Relación de fármaco/fosfolípido encapsulado, mg/mmol	Lípido remanente en circulación, % dosis inyectada		Topotecán que queda encapsulado, % de carga inicial	
	Después de 8 horas	Después de 24 horas	Después de 8 horas	Después de 24 horas
127,2 $\pm$ 10,9	36,1 $\pm$ 2,0	18,7 $\pm$ 8,1	51,7 $\pm$ 7,1	6,72 $\pm$ 2,5
207,2 $\pm$ 21,6	32,1 $\pm$ 5,2	9,84 $\pm$ 1,88	75,6 $\pm$ 13,0	13,8 $\pm$ 3,5
301,3 $\pm$ 24,5	34,4 $\pm$ 3,2	8,04 $\pm$ 4,25	79,2 $\pm$ 4,2	25,6 $\pm$ 4,4
360,3 $\pm$ 35,6	33,6 $\pm$ 2,4	8,68 $\pm$ 4,96	73,5 $\pm$ 7,0	32,3 $\pm$ 9,8

Ejemplo 23. Retención del fármaco *in vivo* y duración en circulación de liposomas de topotecán cargados usando distintas sales de trietilamonio y amonio capturadas.

Se prepararon liposomas compuestos por DSPE, colesterol y PEG-DSPE (3:1:0,1 por peso), que también contienen [<sup>3</sup>H]-CHE a 0,22 mCi/mmol de DSPE, como en el Ejemplo 18, excepto en que la etapa de extrusión incluía 10 pases a través de 2 filtros de 200-nm de poro apilados, 10 pases a través de 2 filtros de 100-nm de poro apilados y 20 pases a través de 2 filtros de 50-nm de poro apilados. Los liposomas contenían las siguientes soluciones salinas:

Se preparó una solución de sulfato de dextrano de amonio 0,5 N (A-DS) a partir de sulfato de dextrano de sodio (P.m. 5000), adquirido de Sigma, y se convirtió en sal de amonio aplicando un procedimiento de intercambio de

iones similar al del Ejemplo 4. La solución de ácido dextrano sulfúrico se tituló inmediatamente con una solución acuosa de amoníaco 12,4 M. La solución de A-DS tiene un pH de 5,66 y una osmolalidad de 208 mmol/kg.

5 Se preparó octasulfato de sacarosa de amonio 0,48 N (A-SOS) de forma similar al Ejemplo 6, pero se utilizó hidróxido de amonio para la titulación. La solución tenía un pH de 6,27 y una osmolalidad de 258 mmol/kg.

Se preparó de octasulfato de sacarosa de trietilamonio 0,47 M (TEA-SOS) como en el Ejemplo 6. La solución tiene un de pH 6,6 y una osmolalidad de 297 mmol/kg.

10 El topotecán se cargó en los liposomas en la solución acuosa de MES-Na 10 mM, 50 g/l de dextrosa, pH 6,5, incubando los liposomas con el fármaco a 61-62 °C y una relación de entrada de fármaco/fosfolípido de 346±1 mg/mmol, durante 40 min, seguida de una incubación en hielo durante 10 min. Los liposomas se purificaron partiendo del fármaco no encapsulado mediante cromatografía en Sephadex G-25, eluyente - solución acuosa de histidina 2 mM, NaCl 144 mM, pH 6,6 (HCl).

15 Se inyectaron ratones hembra Swiss Webster de siete a nueve semanas de edad en la vena de la cola con estas formulaciones de topotecán liposomal en una dosis de 5 mg de topotecán por kg de peso corporal (aprox. 0,2 mg de topotecán/animal) por triplicado. 8 horas o 24 horas después de la inyección, se recogieron muestras de sangre y se analizaron para detectar el topotecán y el lípido del liposoma como en el Ejemplo 22.

20 Los resultados se incluyen en la Tabla 17 siguiente. Mientras las tres formulaciones de liposomas demostraron una duración en circulación del liposoma muy cercana, con aproximadamente un 23-28% de la dosis inyectada remanente en la sangre 24 horas después de la inyección, inesperadamente la retención del fármaco en liposomas TEA-SOS y en liposomas A-SOS era mejor que en los liposomas A-DS tanto a nivel de magnitud (casi una mejora del doble de retención del fármaco) con un nivel de significancia estadística (significancia estadística del 95% de nivel de confianza derivada de una prueba de la T de Student bilateral no emparejada  $p=0,0257$  y  $p=0,00995$ , respectivamente; y según el test de la U de Mann la diferencia era significativa con  $\alpha=0,01$ ). La retención del fármaco en TEA-SOS que contenían liposomas de topotecán era mejor que en los liposomas A-SOS que contenían topotecán.

30 Tabla 17. Retención del fármaco *in vivo* y la persistencia en circulación de liposomas de topotecán preparados usando TEA-SOS, amonio-SOS (A-SOS) y sulfato de dextrano de amonio (A-DS).

Gradiente	Relación fármaco/ fosfolípido, mg/mmol	Eficacia de carga, %	Tamaño de liposoma, nm	Lípido remanente en circulación, % dosis inyectada		Topotecán que queda encapsulado, % de carga inicial	
				Después de 8 horas	Después de 24 horas	Después de 8 horas	Después de 24 horas
A-DS	288,1±20,6	83,3±6,0	76,9±22,7	43,7±1,2	27,7±1,5	43,6±6,8	18,7±1,5
A-SOS	346,2±14,3	100,0±4,1	99,7±28,9	42,3±2,2	23,4±2,0	53,3±0,8	31,3±3,2
TEA-SOS	340,8±14,7	98,5±4,2	99,1±32,6	42,1±2,3	23,0±2,9	57,0±5,6	38,1±6,1

45 Ejemplo 24. Farmacocinética del fármaco y lípidos en plasma del topotecán liposomal en ratas

La duración en circulación y los parámetros de liberación del topotecán se evaluaron en ratas. Se prepararon liposomas (relación molar DSPC/colesterol/PEG-DSPE 3:2:0,015) mediante el método de extrusión/mezclado de etanol y se cargaron con topotecán usando el gradiente TEA-Pn o el gradiente de TEA -octasulfato de sacarosa (TEA-SOS) como se describe en el Ejemplo 18 y se cargaron en distintas relaciones de fármaco/lípidos (fosfolípido 15-450 mg/mmol). Para la cuantificación de la matriz de lípidos, el lípido del liposoma contenía [3H]-CHE a 0,5-1,5 mCi/mmol de DSPC. Se inyectaron por vía intravenoso ratas hembra Sprague Dawley (6-8 semanas de edad; peso corporal aproximado 200 g) con catéteres venosos centrales permanentes. (a través del catéter) con liposomas de topotecán en una dosis de 4 - 5 mg/kg de peso corporal. El catéter se aclaró con solución salina. En tiempos seleccionados (de hasta 48 horas después de la inyección), se recogieron muestras de sangre (0,2-0,3 ml) a través del catéter en jeringas heparinizadas, mezcladas con 0,4 ml de solución salina tamponada con fosfato fría con EDTA al 0,04%. Las células sanguíneas se separaron mediante centrifugación y los sobrenadantes (plasma diluido en PBS) se sometieron a un análisis para evaluar los lípidos mediante recuento de radioactividad <sup>3</sup>H-CHE (corregida para la inactivación) y para analizar el topotecán mediante fluorometría (Ejemplo 71). Los resultados del análisis se corrigieron para dilución en plasma, calculada a partir del peso de la muestra de sangre obtenida y suponiendo un hematocrito del 40%. La dosis total de sangre del fármaco y el lípido se estimó a partir del volumen sanguíneo calculado como el 6,5% del peso corporal. El porcentaje de topotecán retenido en los liposomas se calculó comparando la relación fármaco/lípido en un punto temporal determinado con la relación fármaco/lípido de los liposomas inyectados. La Tabla 18 siguiente resume las semividas en sangre del lípido, el fármaco y las semividas para la liberación del fármaco, así como otras propiedades de los liposomas. Las curvas de farmacocinética (PK) se muestran en las Figuras 8A (lípido) y 8B (relación fármaco/lípido). En resumen, las curvas de PK en sangre para el fármaco y el lípido se corresponden bien con el modelo de exponente único ( $R^2$  0,984-0,999). A pesar de su tamaño de 90-100 nm y de la muy pequeña cantidad de

lípidos PEGilados (0,3%) en moles., los liposomas mostraron inesperadamente una buena duración en circulación (las semividas en plasma del componente del lípido estaban en el intervalo de 11-16 horas). La liberación más lenta de topotecán (tiempo medio 22,9 horas) se observó con los liposomas cargados usando el método TEA-SOS.

5 Tabla 18. Semivida en circulación ( $t_{1/2}$ ) de lípido, fármaco y semivida para la liberación del fármaco desde los liposomas de topotecán prototipo en ratas.

10	Sal capturada y concentración	Carga de topotecán, mg / mmol fosfolípido	Tamaño de liposoma, nm (promedio±SD)	Dosis inyectada, mg/kg	$t_{1/2}$ lípido, horas	$t_{1/2}$ fármaco, horas	$t_{1/2}$ de liberación del fármaco, horas	N.º de animales por grupo
15	TEA-Pn 0,5 N	124,3±9,7	92,3±23,3	4	15,8	4,13	5,34	3
	TEA-Pn 0,5 N	360,3±35,6	107,7±19,1	5	12,8	6,06	9,97	2
15	TEA-SOS 0,643 N	439,2±15,9	108,8±13,4	5	10,8	7,36	22,87	2

Ejemplo 25. Estabilidad del fármaco frente a fugas durante el almacenamiento de liposomas de topotecán.

20 Las muestras de varias formulaciones prototipo preparadas para los estudios descritos anteriormente se almacenaron a 4-6 °C varias veces para evaluar la estabilidad en almacenamiento del topotecán encapsulado frente a la fuga de fármaco desde los liposomas. Se pasaron las muestras de liposomas por columnas Sephadex G-75, eluidas con HEPES 20 mM, NaCl 135 mM, pH 6,5, para extraer el fármaco extraliposomal, y se analizó el contenido de fármaco mediante espectrofotometría y el contenido de lípido mediante recuento de radioactividad [3H]-CHE. Los resultados (Tabla 19) indican una buena retención del topotecán en los liposomas durante su almacenamiento.

Tabla 19. Retención del fármaco en liposomas de topotecán prototipo durante su almacenamiento.

30	Sal formadora de gradiente del liposoma	Tamaño del liposoma, promedio±SD, nm	Carga inicial del fármaco, mg de fármaco/mmol de fosfolípido	Tiempo de almacenamiento, meses	Carga del fármaco después de almacenamiento como % inicial
35	TEA-Pn 0,500 N pH 6,2	96,4±29,3	148,5±10,3	8	101,6±5,5
	TEA-Pn 0,500 N pH 6,	107,7±19,1	127,2±10,9	6	94,6±6,2
	TEA-Pn 0,500 N pH 6,2	107,7 ±19,1	207,2±21,6	6	113,9±9,4
	TEA-Pn 0,500 N pH 6,2	107,7±19,1	301,3±24,5	6	112,9±9,3
40	TEA-SOS 0,643 N pH 5,6	108,8±13,4	439,2±15,9	2	97,8±9,4

Ejemplo 26. Captación in vitro de topotecán inmunoliposomal y liposomal por células cancerígenas con una sobreexpresión de HER2.

45 Este estudio se centraba en la capacidad de los inmunoliposomas dirigidos contra HER2 cargados con topotecán preparados según la descripción para suministrar topotecán específicamente en células con una sobreexpresión de HER2 en un cultivo celular. Los (inmuno)liposomas se prepararon y cargaron con topotecán usando el método TEA-Pn descrito en el Ejemplo 19. Las células de carcinoma de mama humano con una sobreexpresión de HER2 (SKBr-3, ATCC) se hicieron crecer en un medio de McCoy 5A modificado (sin tricina) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 µg/ml de sulfato de estreptomina y 50 U/ml de penicilina G (medio de crecimiento completo) en frascos T-75 a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% hasta confluencia. Las células se recogieron mediante tripsinización, se inocularon en placas de cultivo celular de 24 pocillos a 150.000 células/pocillo en 0,5 ml del medio de crecimiento completo, y se dejaron aclimatar durante la noche. El medio se sustituyó con 0,5 ml de medio de crecimiento completo que contenía formulaciones de topotecán en la concentración seleccionada en el intervalo de 0,01-0,1 mM de fosfolípido. Para cada condición se usaron pocillos por triplicado. Los pocillos de control se incubaron en ausencia de fármaco y/o liposomas (para obtener lecturas de fondo para el análisis del fármaco). Las placas se incubaron con agitación lenta a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% durante 4-8 horas. El medio se aspiró, y las células se enjuagaron 4 veces con porciones de 1 ml de solución salina equilibrada de Hanks fría que contenía sales de Ca y Mg. Las células se solubilizaron añadiendo 0,1 ml de Triton X-100 al 1% en agua, y la cantidad del fármaco en los lisados celulares se determinó mediante fluorometría (Ejemplo 71). La curva estándar se obtuvo en el intervalo de 10-2500 ng de topotecán/pocillo, y se ajustó al polinomio de segundo orden (para compensar la autoinactivación en concentraciones superiores del fármaco) después de sustraer el fondo de autofluorescencia de la célula. Si se ha usado un fluorómetro de microplaca, la selección del filtro era 400/30 nm para la excitación, 530/25 nm para la emisión. Los fluorómetros de cubeta y de microplaca dieron los mismos resultados.

65 Los resultados de los dos experimentos se resumen en la Tabla 20 siguiente. Hubo una captación celular prominente del fármaco liposomal dirigido contra HER2 (50-300 veces más alto que el topotecán liposomal no dirigido). Curiosamente, la

captación de topotecán libre también era considerablemente inferior a la de topotecán inmunoliposomal dirigido contra HER2. Esto puede explicarse por la rápida hidrólisis del anillo de lactona de la camptotecina de la molécula de topotecán en el medio de crecimiento celular en presencia de suero, generando la forma carboxilada del fármaco que puede tener menor permeabilidad celular y menor citotoxicidad. En resumen, se confirmó la capacidad de los inmunoliposomas conjugados a ligandos, internalizables, dirigidos a células para suministrar topotecán intracelularmente.

Tabla 20. Captación celular *in vitro* de liposomas de topotecán e inmunoliposomas dirigidos contra HER2 que contienen TEA-Pn (nd, no determinado). Para las características del liposoma, consulte la Tabla 12.

Concentración del liposoma, fosfolípido mM	Concentración de topotecán µg/ml	Tiempo de exposición, horas	Admisión de topotecán por las células SK-Br-3, ng/100.000 células		
			Liposomas no dirigidos	F5-Inmunoliposomas	Fármaco libre
0,1	15,5	4	1,45±0,09	163±5,7	nd
0,01	1,55	4	0,185±0,03	60,2±2,0	nd
0,033	5,0	8	3,62±2,03	169,6±13,7	5,56±0,91

Ejemplo 27. Citotoxicidad de topotecán liposomal e inmunoliposomal frente a células cancerígenas con una sobreexpresión de HER2 *in Vitro*.

Después de determinar la capacidad de los inmunoliposomas de topotecán dirigidos contra HER2 para suministrar fármacos intracelularmente en células cancerígenas con una sobreexpresión de HER2 (Ejemplo 26), era importante asegurar que los liposomas internalizados pudiesen liberar el fármaco en su forma activa. Para ello, se estudió la citotoxicidad *in vitro* del topotecán libre (p. ej. topotecán formulado como una solución), topotecán liposomal y topotecán inmunoliposomal dirigido contra HER2. Se prepararon formulaciones de topotecán liposomal y se hicieron crecer y cultivaron células SKBr-3 como se describe en el Ejemplo 26. Se inocularon células en placas de cultivo celular de 96 pocillos a 5000 células/pocillo en 0,1 ml de medio de crecimiento completo, por triplicado, y se dejaron aclimatar durante la noche. Las columnas y las filas situadas en los bordes de la placa se dejaron vacías. Las preparaciones estériles de liposomas de topotecán, inmunoliposomas o el fármaco libre (preparado de forma reciente diluyendo 20 mg/ml de la solución madre de topotecán, pH 3, en solución salina sin tampón a 2 mg/ml) se diluyeron con un medio fármaco completo para conseguir concentraciones de partida de 90, 30 o 10 µg/ml y se diluyeron en serie en el medio por el factor de 3. Los medios en los pocillos se sustituyeron por 0,2 ml de diluciones de fármaco/liposoma, y se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5%, durante el tiempo especificado (4-6 horas). Un pocillo en cada hilera se incubó con medio exento de fármaco para servir como control no tratado. Los medios que contenían el fármaco se aspiraron de los pocillos, las células se enjuagaron con 0,2 ml de medio exento de fármaco y se añadieron 0,2 ml de medio exento de fármaco fresco a todos los pocillos. Las placas se incubaron durante 4 días a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5%. Sin cambio de medio, se añadieron 0,03 ml de la solución de 2 mg/ml de un colorante de tetrazolio (Thiazolyl Blue, MTT) (Sigma Chemical Co.) en un medio exento de suero a cada pocillo. Las placas se incubaron durante unas 2-3 horas adicionales a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% Se aspiraron los medios y los pocillos se llenaron con 0,2 ml de una solución acuosa de isopropanol al 70% de vol., HCl 0,075 N y se agitó suavemente hasta la disolución del colorante de formazán (15-30 min). La densidad óptica de las soluciones de formazán se determinó usando un fotómetro de microplacas a 540 nm. La viabilidad celular como % de control no tratado se calculó como la relación de la densidad óptica en los pocillos experimentales a la densidad óptica en los pocillos que contenían células no tratadas, corregido para el fondo. Los datos se representaron gráficamente con la concentración del fármaco y la dosis de CI50 se estimó gráficamente a partir de la intersección de la curva de concentración de viabilidad con la línea de viabilidad del 50%.

Los resultados se presentan en la Figura 9. La dosis de fármaco resultante en un de inhibición del crecimiento del 50% (CI<sub>50</sub>) para el topotecán libre o el topotecán liposomal no dirigido era superior a 30 µg/ml; para F5-topotecán inmunoliposomal, 0,15 µg/ml. Estos resultados son consistentes con los datos de captación del fármaco dirigido.

Ejemplo 28. Estabilidad comparativa y farmacocinética en plasma de topotecán inmunoliposomal-F5 y liposomal en ratones.

Los liposomas de topotecán con etiqueta de lípido radioactivo [<sup>3</sup>H]-CHE a 1,5 mCi/mmol de fosfolípido se prepararon siguiendo los Ejemplos 11 y 19 usando un procedimiento de mezcla-extrusión de solución lípida de etanol bajo las siguientes condiciones: solución salina formadora de gradiente: de octasulfato de sacarosa de trietilamonio 0,643 N; extrusión por membrana de policarbonato: 15 pases por 2 filtros de PCTE apilados, 80 nm de tamaño de poro; Carga de topotecán: relación de entrada fármaco/fosfolípido 350 mg/mmol (calculado para la base de topotecán libre); La conjugación de F5 scFv se realizó como se describe en el Ejemplo 19. Los liposomas tenían las características siguientes:

Tamaño según QELS: promedio en peso 101,2 nm; desviación estándar, 20,1 nm.

Encapsulación del fármaco: Liposomas de topotecán (Topo-Ls) 359,3±27,4 mg/mmol fosfolípido; Inmunoliposomas de topotecánF5scFv (Topo-F5-ILs) 326,3±15,9 mg/mmol fosfolípido.

El estudio se realizó a nivel general como en el Ejemplo 22. Se inyectó a grupos de nueve ratones macho Swiss Webster (8-10 semanas de edad, 24-27 g) en la vena de la cola Topo-Ls, Topo-F5ILs o 1 mg/ml de una nueva preparación de topotecán en solución sin tampón, a una dosis de 5 mg de topotecán base por kg de peso corporal (equivalente a la dosis de lípido de 14-16  $\mu\text{mol}$  de fosfolípido/kg de peso corporal). En los puntos temporales de 1 hora, 8 horas o 24 horas posteriores a la inyección, se desangraron 3 animales por punto temporal a través de una punción a corazón abierto con anestesia de ketamina/xilazina, la sangre se recogió en tubos que contenían PBS-EDTA, y se analizó el contenido de topotecán (fluorometría) y lípido de liposoma (mediante recuento por centello de la radioactividad). Se calcularon las cantidades de dosis de fármaco y lípido en sangre en los puntos temporales especificados a partir de la dosis administrada tomada suponiendo el 100% del volumen de sangre por animal como el 6,3% del peso corporal, y una fracción de célula sanguínea sedimentada del 45%. La cantidad de fármaco que quedaba encapsulado en los liposomas en cada punto temporal se calculó para cada animal individualmente comparando la relación de radioactividad fármaco/lípido de las muestras de plasma con las de los liposomas inyectados. La cantidad de topotecán libre en las muestras de plasma recogidas en la primera hora después de la inyección era inferior al 1% de la dosis inyectada (de hecho, era inferior al límite de detección del método de análisis de los inventores); por lo tanto, los puntos temporales adicionales del grupo de topotecán libre no se estudiaron. Debido a la rápida depuración en sangre y los niveles sanguíneos bajos del topotecán libre, los inventores supusieron que esencialmente todo el topotecán encontrado en la sangre en todos los puntos temporales representa el topotecán encapsulado liposomalmente.

Los resultados se resumen en la Tabla 21 siguiente. Cabe destacar que los liposomas preparados siguiendo la presente descripción conservaron el 79-85% de la carga del fármaco original incluso 24 horas después de la inyección en el torrente sanguíneo de los animales. Las diferencias entre los valores promedios en plasma del lípido o el fármaco entre los grupos de liposomas e inmunoliposomas estaban en el intervalo de 1,8-13,6% y estaban cerca o comprendidos en el intervalo de errores del análisis. Las probabilidades de la hipótesis nula entre el grupo de liposomas e inmunoliposomas a nivel de valores de fármaco o lípido en cada punto temporal, calculadas usando la prueba de la T de Student, estaban en el intervalo de 0,543-0,938. Los inventores concluyeron que las diferencias en los niveles en sangre residuales del fármaco o el lípido entre las dos preparaciones eran insignificantes y no distinguibles a nivel estadístico.

Tabla 21. Cantidades de lípido liposomal, topotecán y topotecán que queda encapsulado en los liposomas en el plasma de los ratones en distintos puntos temporales después de la inyección intravenosa.

Tiempo posterior a la inyección	Lípido, % de dosis inyectada	Fármaco, % de dosis inyectada	Fármaco/lípido, % de valor antes de la inyección
Topotecán liposomal conjugado con F5 (Topo-F5ILs):			
1 hora	57,58 $\pm$ 4,95	55,45 $\pm$ 7,23	96,14 $\pm$ 7,32
8 horas	35,37 $\pm$ 3,84	34,18 $\pm$ 5,87	96,31 $\pm$ 11,92
24 horas	15,51 $\pm$ 11,84	12,30 $\pm$ 9,02	79,36 $\pm$ 8,03
Topotecán liposomal (no conjugado) (Topo-Ls):			
1 hora	58,88 $\pm$ 9,51	57,63 $\pm$ 9,45	97,90 $\pm$ 5,29
8 horas	39,61 $\pm$ 1,99	38,82 $\pm$ 1,49	98,06 $\pm$ 4,44
24 horas	15,84 $\pm$ 3,85	13,45 $\pm$ 2,64	85,25 $\pm$ 7,03

#### Ejemplo 29. Eficacia antitumoral de topotecán liposomal y topotecán inmunoliposomal dirigido contra HER2 en el modelo de xenoinjerto BT-474.

En este estudio los inventores utilizaron los inmunoliposomas de topotecán del primer prototipo que emplean el gradiente de polifosfato de trietilamonio para la captura del fármaco. Los liposomas se prepararon generalmente siguiendo los métodos de los Ejemplos 11 y 19. Los componentes de la matriz lipídica - DSPC (Avanti Polar Lipids; 3 mol.), colesterol (Calbiochem, 98,3%; 2 mol.) y metoxi-PEG(2000)-DSPE (Avanti Polar Lipids, 0,015 mol.) se combinaron con etanol USB al 100% para proporcionar una solución que contenía fosfolípido 0,5 mM a 60 °C. La solución lipídica de etanol se diluyó a 60 °C con la solución acuosa de polisfosfato de trietilamonio (trietilamina 0,608 M, fosfato 0,65 N, pH 6,1, osmolaridad 531 mmol/kg), se mezclaron exhaustivamente, y se extrudieron 10 veces a través de 2 membranas de policarbonato apiladas con un tamaño de poro de 100 nm (Nuclepore, Corning) usando un extrusor de presión de gas termostatzado (Lipex Biomembranes) a 60 °C. Los liposomas extrudidos se enfriaron en hielo y se extrajo el polifosfato de trietilamonio no encapsulado mediante cromatografía de gel en Sepharose CL-4B usando la solución tampón de dextrosa al 5%- HEPES 5 mM-Na, pH 6,5 como eluyente. El tamaño del liposoma era de 103,8  $\pm$  35,1 nm según QELS. Los liposomas en esta solución tampón se incubaron con clorhidrato de topotecán a 60 °C durante 30 minutos en una relación de 0,35 mg de topotecán base por  $\mu\text{mol}$  de fosfolípido. Al final de la incubación, los liposomas se enfriaron en hielo y se realizó una cromatografía en Sephadex G-75, eluyente HEPES-Na 20 mM, NaCl 135 mM, pH 6,5, para retirar el fármaco no encapsulado. El contenido de fármaco se determinó mediante fluorometría y el contenido de lípido por medio de un análisis de fosfatos como se ha explicado anteriormente. El topotecán liposomal obtenido de esta forma tiene una base de topotecán de 365,4 $\pm$ 23,1 mg por mmol de fosfolípido. Para preparar inmunoliposomas de topotecán dirigidos contra HER2, se

incubó una parte de esta preparación de topotecán liposomal con el conjugado purificado de scFv F5 dirigido contra HER2 y el enlazador de maleimido-PEG-DSPE como se describe en el Ejemplo 19. En resumen, el conjugado F5-PEG-DSPE en una solución acuosa de sacarosa al 10%- citrato de Na 10 mM, pH 6,5, se combinó con liposomas de topotecán en una relación de 15 mg de proteína por mmol de fosfolípido de liposoma, y se incubó a 60 °C durante 30 min. La mezcla de incubación se enfrió en hielo y se realizó una cromatografía en Sefarosa CL-4B, eluyente HEPES 20 mM-Na, NaCl 135 mM, pH 6,5, para retirar todo el conjugado scFv no incorporado. La relación fármaco-lípido se redujo en un 14% después de esta incubación adicional.

Las formulaciones de inmunoliposomas y liposomas de topotecán con 1-2 mg/ml de topotecán se pasaron por un filtro de jeringa estéril de 0,2 micrómetros, se dispensaron asépticamente en viales de polipropileno y se almacenaron a 4-6 °C durante hasta 1 mes antes del uso.

El topotecán libre se preparó de nuevo disolviendo polvo de clorhidrato de topotecán a 2 mg/ml en dextrosa al 5% y se esterilizó pasando la solución por un filtro de jeringa de 0,2 micrómetros.

Se estableció un modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de mama humano BT-474 con sobreexpresión de HER2 como se describe en el Ejemplo 10. En el día 13 después de la inoculación del tumor, los animales que tenían tumores en el intervalo de 120-350 mm cúbicos se seleccionaron y aleatorizaron en 3 grupos de tratamiento y 1 grupo de control de 12 animales cada uno. En los días 14, 18 y 21 después de la inoculación del tumor los ratones se trataron con inyecciones intravenosas (vena de la cola) de formulaciones de topotecán en la dosis por inyección de 5 mg/kg de peso corporal, o con un volumen equivalente de solución salina fisiológica. El estado de salud general de los animales se controló todos los días. Los tamaños de los tumores y los pesos corporales se controlaron dos veces a la semana hasta el día 53 después de la inoculación del tumor. Los animales cuyos tumores alcanzaron el 20% del peso corporal, o aquellos con una pérdida de peso progresiva igual o superior al 20% fueron sometidos a eutanasia.

Las Figuras 11 y 12 muestran el crecimiento tumoral y los datos sobre peso corporal en animales, respectivamente. Las formulaciones de topotecán liposomal fueron más activas en la supresión de crecimiento tumoral que el fármaco libre, y la formulación liposomal de dirigida a F5 fue más activa que la no dirigida. Los tamaños tumorales al final del periodo de observación eran significativamente diferentes entre los grupos de tratamiento (valores  $p$  de la prueba de la T de Student bilateral sin correspondencia fueron  $1,2 \times 10^{-6}$  para fármaco libre vs. fármaco inmunoliposomal, 0,000114 para fármaco libre vs. fármaco liposomal y 0,00718 para fármaco liposomal vs. fármaco inmunoliposomal). Por tanto, el topotecán encapsulado liposomalmente era más activo que el fármaco libre, y el topotecán inmunoliposomal dirigido contra HER2 era más activo que el fármaco liposomal no dirigido. En el grupo liposomal e inmunoliposomal, después de la regresión inicial, se produjo un recrecimiento del tumor en los 10 días posteriores al último tratamiento. No se produjo regresión tumoral en el grupo de fármaco libre. Se observó que las formulaciones liposomales de topotecán a una dosis específica eran más tóxicas que el fármaco libre. Se produjo toxicidad gastrointestinal. Los animales que recibieron topotecán liposomal desarrollaron diarrea y sufrieron una pérdida de peso corporal media aproximadamente del 14% en su máximo. Mientras que en el grupo liposomal no dirigido, los animales se recuperaron, excepto uno (12,5%) que sufrió pérdida de peso corporal persistente del 15% al final del estudio, en el grupo dirigido a F5 cinco animales (41,6%) desarrollaron morbilidad terminal y murieron; y dos más (16,7%) sufrieron pérdida de peso persistente de aproximadamente 15%. En el grupo de control y en el grupo de fármaco libre, no se produjo pérdida de peso ni morbilidad relacionada con el tratamiento.

#### Ejemplo 30. Dosis máxima tolerada (MTD) de topotecán libre y liposomal en ratones a los que se administró 3 inyecciones intravenosas a la semana.

En este estudio se empleó una formulación de topotecán liposomal preparada como en el Ejemplo 29, excepto la solución de polisulfato de trietilamonio que se sustituyó por una solución de octasulfato de sacarosa de trietilamonio con trietilamonio 0,65 M, pH 6,2; y para la extrusión se emplearon filtros de membrana de policarbonato de 80 nm en lugar de 100-nm. El tamaño del liposoma ponderado en volumen determinado por el método de dispersión de luz cuasi-elástica en la aproximación gaussiana (QELS) era de  $95,1 \pm 19,6$  nm (promedio  $\pm$  SD); la relación fármaco/lípido era de  $369,1 \pm 18,3$  mg/mmol de fosfolípido. Ratones hembra Swiss-Webster de cinco-seis semanas de edad (18-20 g) en grupos de dos y recibieron tres inyecciones intravenosas (vena de la cola) de topotecán libre o liposomal en un calendario de una vez a la semana, empezando con una dosis de 2 mg/kg de topotecán base por inyección y aumentando hasta cada grupo posterior en un factor de 1,8 hasta la dosis de 37,8 mg/kg. El topotecán inmunoliposomal no se incluyó en este estudio. El peso corporal de los animales y su estado de salud general se supervisaron todos los días. Una pérdida de peso progresiva de más del 20% o la muerte natural en cualquier momento en cualquiera de los dos grupos durante los diez días posteriores al inicio del tratamiento se consideraron indicativos de una dosis tóxica. Según los datos sobre peso y mortalidad animal, se determinó que MTD estaba comprendido en el intervalo de 11,7-21 mg/kg para topotecán libre y de 2,0-3,6 mg/kg para topotecán liposomal (Prototipo 2). En el segundo estudio, los ratones recibieron inyecciones de topotecán libre, liposomal o F5-inmunoliposomal (preparado a partir del topotecán liposomal de este Ejemplo como se describe en el Ejemplo 29) con dosis que van de 2,0 mg/kg (topotecán liposomal/inmunoliposomal) o 12 mg/kg (topotecán libre), y se aumentó a cada grupo posterior en el factor de 1,15 hasta alcanzar la siguiente dosis en el intervalo superior del intervalo de MTD establecido. La dosis más alta que no provocó la muerte o la morbilidad terminal en ningún animal se consideró como una MTD y se determinó

en 18,4 mg/kg para topotecán libre, 3,0 mg/kg para topotecán liposomal y 3,0 mg/kg para topotecán inmunoliposomal. Por lo tanto, el topotecán liposomal mostró una mayor toxicidad que el fármaco libre.

Ejemplo 31. Eficacia antitumoral de topotecán liposomal en el modelo de xenoinjerto BT-474 en el intervalo de 0,125-1,0xMTD

En este estudio se han usado liposomas de topotecán e inmunoliposomas F5 del Ejemplo 30. Se obtuvieron xenoinjertos subcutáneos BT 474 en ratones lampiños como se explica en el Ejemplo 29. En el día 18 después de la inoculación de células tumorales, los animales con tumores (105-345 mm cúbicos, promedio de aproximadamente 200 mm cúbicos) se aleatorizaron en grupos de tratamiento de 6 animales/grupo, y un grupo de control de 8 animales/grupo. Los animales recibieron topotecán libre o liposomal a 1xMTD, 0,5xMTD, 0,25xMTD o 0,125xMTD en tres inyecciones intravenosas (vena de la cola) en los días 19, 23 y 27 después de la inoculación del tumor. El grupo de control recibió inyecciones de solución salina fisiológica. Los tamaños tumorales y los pesos corporales de los animales se controlaron como en el Ejemplo 29. Para obtener mediciones del peso corporal de los animales, el peso del tumor (calculado a partir del tamaño del tumor y suponiendo una densidad tumoral de 1,0) se sustrajo de las mediciones del peso total de los animales. Todas las formulaciones de fármacos en MTD mostraron actividad antitumoral (Figuras 13A-13D). No hubo una diferencia significativa en la eficacia entre el fármaco libre y liposomal proporcionada en su MTD respectivo o en fracciones idénticas (1/2, 1/4 o 1/8) del mismo. Por ello, la encapsulación liposomal del fármaco usando el gradiente TEA-SOS generó un aumento de aproximadamente 6 veces del gradiente TEA-SOS en la actividad antitumoral, pero también un aumento similar en la toxicidad del fármaco. La dinámica de pesos corporales en los animales desveló que todos los tratamientos eran no tóxicos, excepto el tratamiento con topotecán libre en MTD que mostró una reducción transitoria en el peso corporal (aproximadamente del 15% del valor previo al tratamiento) que se resolvió posteriormente (Figura 14).

Ejemplo 32. Preparación y citotoxicidad in vitro dirigida de los liposomas de topotecán preparados usando el método de captura del octasulfato de sacarosa de trietilamonio.

El topotecán liposomal se preparó generalmente siguiendo el procedimiento del Ejemplo 18, usando la solución capturada de TEA-SOS con TEA 643 mM, pH 5,7, osmolalidad de 530 mmol/kg y una relación fármaco/fosfolípido de 170 mg/mmol. Los liposomas tenían un 155 mg fármaco/mmol de fosfolípido; 90% de eficacia de carga y tamaño de partícula de 105 nm. Estos liposomas se incubaron con la solución micelar del conjugado F5-PEG-DSPE a unos 30 scFv por liposoma (15 mg anticuerpo/mmol fosfolípido) a 60 °C durante 1 hora generalmente como se describe en el Ejemplo 19. Los liposomas conjugados a anticuerpos se separaron mediante SEC usando Sefarosa CL-4B y se formularon en solución salina tamponada HBS-6,5 HEPES. No hubo ningún cambio detectable en la relación fármaco/lípido durante la unión del scFv (F5) dirigida contra HER2.

La captación de las formulaciones de topotecán por parte de las células cancerosa se determinó de la forma siguiente. Las células de adenocarcinoma de mama humano con una sobreexpresión de HER2 (SK-Br-3, ATCC HTB-30) se sembraron en placas de cultivo celular de 24 pocillos a 150.000 células/pocillo y se dejaron aclimatar durante la noche. Las células se incubaron (por triplicado) con topotecán liposomal dirigido a F5 y no dirigido a F5 en medio de cultivo completo en las concentraciones liposomales de 0,1 mM y 0,01 mM durante 4 horas a 37 °C. Las células se aclararon 4 veces con solución salina equilibrada de Hank, se solubilizaron en Triton X-100 al 0,1% - mezcla de isopropanol acidificado al 70% 1:10, y se determinó la cantidad de topotecán asociada a célula por pocillo mediante fluorometría. Los resultados (error medio ± error estándar) se resumen en la Tabla 22. Los liposomas dirigidos suministraron de 100 a 300 veces más fármaco en las células diana que en los liposomas no dirigidos.

Tabla 22. Captación de topotecán liposomal por las células de carcinoma de mama SK-Br-3.

Formulación	Captación de topotecán en fosfolípido 0,1 mM, ng/pocillo	Captación de topotecán en fosfolípido 0,01 mM, ng/pocillo
Liposoma no dirigido	4,76 ± 0,24	0,607 ± 0,088
Liposoma dirigido contra HER2	533,8 ± 13,7	197,0 ± 4,6
Relación: Dirigido/No dirigido	112,1 ± 8,6	324 ± 55

La citotoxicidad de estas formulaciones de topotecán contra las células de cáncer de mama SKBr-3 se determinó como se describe en el Ejemplo 27. Las células SKBr-3 se inocularon en placas de 96 pocillos a 5000 células/pocillo, se dejaron aclimatar durante la noche, y se incubaron con concentraciones crecientes (0,004-30 µg/ml) de topotecán libre, liposomal o inmunoliposomal F5 en un medio de cultivo celular durante 4 horas a 37 °C. Se eliminaron los medios que contenían el fármaco y se dejó que las células creciesen en el medio exento de fármaco durante 72 horas. La cantidad de células viables por pocillo se determinó usando un análisis de tetrazolio Thiazolyl Blue (MTT) y se expresó como % de células de control (no tratadas). Los resultados se enumeran en la Figura 10. Los inmunoliposomas de topotecán eran más citotóxicos (CI<sub>50</sub> 0,15-0,5 µg/ml) que los liposomas de topotecán no dirigidos (CI<sub>50</sub> ≥ 3,1. µg/ml) y el topotecán libre (CI<sub>50</sub> ≥ 2,3 µg/ml)

Ejemplo 33. Estabilidad in vivo de liposomas de topotecán de distintos tamaños.

Los liposomas que contenían TEA-Pn se prepararon como se indica en el Ejemplo 22 usando extrusión 12 veces a través de membranas de policarbonato de tamaño de poro 100 nm o adicionalmente 12 veces a través de membranas de policarbonato de tamaño de poro 50 nm. Se añadió topotecán (TPT) en una relación de 150 µg /µmol fosfolípido. La carga se completó a 58 °C durante 45 min en un baño de agua caliente, seguido de un proceso de inactivación en hielo. La eficacia de carga para el liposoma extrudido de 50-nm- y 100-nm era de 126,80 ± 19,24 µg TPT/µmol PL (84,5 ± 12,8%) y de 148,48 ± 10,26 µg TPT/µmol PL (99,0 ± 6,8%), respectivamente. Los ratones hembra Swiss Webster en los grupos de tres se inyectaron intravenosamente con una de las dos formulaciones de Ls-TPT a una dosis de 5 mg de TPT/kg. Los ratones se sacrificaron después de 6 horas y se recogió su sangre. Se analizó el plasma para detectar el TPT y el lípido liposomal como se describe en el Ejemplo 22. Los resultados se presentan en la Tabla 23.

Tabla 23. Estabilidad *in vivo* de Ls-TPT de distintos tamaños cargados usando el método de captura de TEA-Pn.

Tamaño de liposoma, nm	Fármaco en plasma, % de dosis inyectada	Lípido liposomal en plasma, % de dosis inyectada	Relación fármaco/lípido, % de valor antes de la inyección
74,2 ± 21,6	32,93 ± 1,97	45,7 ± 2,2	72,06 ± 5,51
96,4 ± 29,3	33,26 ± 3,56	37,6 ± 5,3	88,41 ± 15,68

#### Ejemplo 34. Síntesis y encapsulación de liposomas de 6-(3-aminopropil) elipticina (6-APE).

Se preparó 6-(3-aminopropil)elipticina se preparó a partir de elipticina en un método de dos etapas basado en el procedimiento de Werbel y col., *J. Med. Chem.* 1986, v. 29, pág. 1321-1322. Se agitaron 501,4 mg de elipticina base (NSC 71795) (Aldrich Chemical Co.) con aproximadamente 100 mg de hidruro de sodio (Sigma; se lavaron con éter de petróleo anhidro) en 5 ml de dimetilformamida seca (DMF) a temperatura ambiente durante 30 min. A esta mezcla, se añadió gota a gota una solución de 678 mg de N-bromopropilftalimida (Aldrich) en 2 ml de DMF seco. La mezcla de reacción de color morado se agitó durante la noche bajo argón, se tituló con 1 ml de agua y se vertió en 60 ml de agua. Esta mezcla se extrajo dos veces con 25 ml de cloruro de metileno, el extracto se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se pasó a través de una capa de alúmina neutra. La capa de alúmina se aclaró dos veces con 10 ml de cloruro de metileno y el filtrado combinado y los aclarados se secaron al vacío. El producto se agitó durante la noche con 20 ml de etanol absoluto y 2 ml de hidrazina anhidra a temperatura ambiente. La suspensión obtenida se filtró al vacío, se diluyó el filtrado de color amarillo con 50 ml de NaOH 0,2 N y se extrajo con dos porciones (75 ml y 50 ml) de cloroformo. El extracto de cloroformo se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se llevó a sequedad al vacío. Se realizó una cromatografía del producto bruto (rendimiento 408 mg) en una columna de sílice 60 eluida isocráticamente con una mezcla de cloroformo-metanol (7:3 en volumen), saturada con trimetilamina seca. Las fracciones se eluyeron en una segunda banda de color amarillo, después que la elipticina no reaccionara, parecían contener el compuesto deseado con aproximadamente un rendimiento del 30%. La estructura se confirmó mediante RMN <sup>1</sup>H-. TLC: R<sub>f</sub> 0,29-0,31 (sílice 60; CHCl<sub>3</sub>-MeOH 7:3 en volumen, saturado con trimetilamina). Elíptica, R<sub>f</sub> 0,81-0,83. El compuesto obtenido se convirtió en sal de diclorhidrato disolviendo en etanol anhidro y titulando con la solución de HCl 6 N en isopropanol seco. Los cristales de color naranja de diclorhidrato de 6-APE (NSC 176328) se filtraron, se aclararon con éter, y se secaron al vacío. Rendimiento del diclorhidrato 86%.

Los liposomas se prepararon mediante la hidratación de la película lípida bruta de DSPC, colesterol y PEG(P.m. 2000)-DSPE (3:2:0,015 de relación molar) en una solución de polifosfato de trimetilamonio (TMA-Pn) a TMA 0,5 M, pH 5,6, a 60 °C, seguido de seis ciclos de congelación rápida (-78 °C) y descongelación (60 °C), y extrusión diez veces a través de filtros de policarbonato de tamaño de poro 50 nm apilados. El TMA-Pn no encapsulado se eliminó usando una columna de Separosa CL-4B eluida con HEPES-Dextrosa (HEPES 5 mM, 5% Dextrosa, pH 5,5). El tamaño del liposoma era de 85,7 ± 32,1 nm.

Se añadió solución 6-APE concentrada (10 mg/ml) a los liposomas que contenían TMA-Pn con una relación fármaco-fosfolípido de 100 µg de APE/µmol fosfolípido, la mezcla se incubó a 58 °C durante 45 min y se enfrió rápidamente en hielo durante 15 min. El fármaco no encapsulado se extrajo mediante cromatografía en gel en una columna Sephadex G-75 eluida con la solución tampón HEPES-Dextrosa (HEPES-Na 5 mM, dextrosa al 5%, pH 6,5). A continuación, se cuantificó el APE capturado en el liposoma mediante espectrofotometría como en el Ejemplo 71 y el fosfolípido liposomal se determinó usando el análisis de extracción del Ejemplo 70. La encapsulación del fármaco fue prácticamente cuantitativa.

#### Ejemplo 35. Preparación de 6-APE inmunoliposomal dirigido contra HER2 y citotoxicidad *in vitro* de las formulaciones 6-APE frente a células de cáncer de mama BT-474 con una sobreexpresión de HER2.

Se prepararon liposomas con 6-APE encapsulado (Ls-APE) como en el Ejemplo 34 anterior. Se prepararon inmunoliposomas dirigidos contra HER2 con 6-APE encapsulado (F5-ILs-APE) a partir de Ls-APE usando el método del Ejemplo 19. Se utilizó un análisis de viabilidad celular basado en MTT del Ejemplo 27 para determinar la citotoxicidad de 6-APE administrado como una solución, Ls-APE o como F5-ILs-APE dirigido contra HER2 frente a células de cáncer de mama humano con una sobreexpresión de HER2 (BT-474). Las células se expusieron al medio que contenía el fármaco durante 6 horas y posteriormente se incubaron en un medio exento de fármaco durante 3 días. Los resultados se muestran en la Figura 15. La CI<sub>50</sub> para APE libre es de 0,26 µg de APE/ml, para F5-ILs-APE era de 0,756 µg de

APE/ml, y para Ls-APE no dirigido era 51,0 µg de APE/ml. Hubo una diferencia de 67,5 veces en la actividad entre el 6-APE liposomal dirigido y no dirigido, lo que indicaba un efecto de suministro dirigido considerable.

Ejemplo 36. Formulaciones inmunoliposomales dirigidas a EGFR de 6-APE y citotoxicidad frente a células de cáncer in vitro.

Se prepararon liposomas cargados con 6-APE como se explica en el Ejemplo 34. Se prepararon inmunoliposomas dirigidos contra EGFR uniendo fragmentos de anticuerpos Fab' específicos de EGFR de la forma siguiente. Se digirió un IgG MAb C225 (cetuximab, ERBITUX™, Imclone Systems) específico de EGFR con pepsina para producir fragmentos (Fab')<sub>2</sub>. Se redujeron los fragmentos purificados (Fab')<sub>2</sub> mediante el tratamiento con 2-mercaptoetilamina 10-20 mM durante 15 min a 37 °C, y los fragmentos Fab' se purificaron mediante filtración en gel usando Sephadex G-25. La presencia de grupos tioles reactivos era normalmente de aproximadamente 0,9 grupos tioles por molécula de proteína (cuantificados usando el reactivo de Ellmann). C225Fab' se conjugó covalentemente a un enlazador anfifílico Mal-PEG-DSPE (Avanti Polar Lipids, AL) en solución acuosa a un valor de pH 6,2-6,5 y una relación molar proteína-enlazador de 1:4 durante 2-4 horas a temperatura ambiente, o durante la noche a 4-6 °C, para producir el conjugado C225Fab'-PEG-DSPE con un rendimiento del 30-50% de la proteína. Este conjugado formador de micelas se separó de la proteína no reaccionada realizando cromatografía en columna de exclusión por tamaños en gel con perlas de agarosa al 3% - poliacrilamida al 4% (Ultrogel AcA34, obtenidas de Sigma Chemical Co.), eluidas con solución tampón HBS-6,5. El conjugado se recuperó en fracciones de volumen vacío. Se formó 6-APE inmunoliposomal incubando estos liposomas con C225 Fab'-PEG-DSPE con liposomas cargados con fármaco en la relación de 30 mg C225 proteína/mmol de fosfolípido de liposoma durante 30 min a 60 °C, inactivando en hielo durante 15 min, y purificando los inmunoliposomas por medio de cromatografía en gel en una columna Sepharose CL-4B también eluida con solución tampón HBS-6,5 (los liposomas aparecen en o cerca del volumen vacío de la columna).

Se cultivaron células de cáncer de mama humano MDA-MB-468 con una sobreexpresión de EGFR y células de cáncer de mama humano MCF-7 con una baja expresión de EGFR (ATCC, Rockville, MD) en sus medios de cultivo recomendados por el proveedor, y se estudió la citotoxicidad de 6-APE libre, liposomal e inmunoliposomal dirigido contra EGFR frente a estas células siguiendo el método del Ejemplo 27. Las células se incubaron con medios que contenían el fármaco durante 6 horas, seguido de 3 días de incubación posterior en el medio exento de fármaco. Los resultados se muestran en la Figura 16. En células MDA-MB-468 la CI<sub>50</sub> para 6-APE libre era de aproximadamente 0,1 µg/ml y para C225-ILs-APE de aproximadamente 0,9 µg/ml. En células MCF-7 la CI<sub>50</sub> era aproximadamente de 0,1 para 6-APE libre era aproximadamente de 0,5 µg/ml y para C225-ILs-APE era aproximadamente de 14 µg/ml. La CI<sub>50</sub> de Ls-APE en ambas líneas celulares era >30 µg/ml. Por ello, los inmunoliposomas cargados con 6-APE dirigidos contra EGFR demostraron una actividad citotóxica específica de antígenos en células de cáncer de mama MDA-MB-468 con una sobreexpresión de EGFR, pero no en células de cáncer de mama MCF-7 que no tienen una sobreexpresión de EGFR. En células MCF-7, los liposomas 6-APE dirigidos y no dirigidos eran igualmente activos.

Ejemplo 37. Farmacocinética de 6-APE liposomal en ratas.

Los liposomas con solución TEA-Pn capturada (grupos fosfato 557 mM, TEA 500 mM, pH 5,8, osmolalidad 480 mmol/kg) y composición lípida de DSPC, colesterol y PEG-DSPE (relación molar 3:2:0,015) se prepararon como en el Ejemplo 11 anterior. La solución etanólica de los lípidos se combinó a 60 °C con 10 volúmenes de la solución acuosa de TEA-Pn y se extrudió diez veces a través de dos membranas de policarbonato de tamaño de poro 80 nm apiladas. El TEA-Pn no encapsulado se extrajo usando una columna de Sefarosa CL-4B eluida con MES-Dextrosa (MES-Na 5 mM, Dextrosa al 5%, pH 5,5). El tamaño del liposoma era de 92,3 ± 23,3 nm según QELS. Se incluyó una etiqueta lípida radioactiva no intercambiable [<sup>3</sup>H]-CHE en la matriz lípida a 0,5 mCi/mmol de fosfolípido. Los liposomas se cargaron con 6-APE como se describe en el Ejemplo 34.

El estudio de farmacocinética siguió el protocolo del Ejemplo 9. Se inyectó a ratas hembra Sim Albino (9 semanas, 200 g) intravenosamente con una dosis de 10 mg de 6-APE/kg. La sangre se recogió en los puntos temporales prescritos y el plasma se analizó para detectar el nivel de 6-APE mediante fluorometría. Las alícuotas de plasma (0,05-0,2 ml) se mezclaron con 1-2 ml de isopropanol acuoso al 90%- HCl al 0,1 N, y el 6-APE se cuantificó mediante fluorescencia como en el Ejemplo 71. El lípido se cuantificó a través del recuento de radioactividad [<sup>3</sup>H]-CHE por centelleo.

Los resultados se muestran en la Figura 17. La semivida en sangre (t<sub>1/2</sub>) del fármaco era de 13,7 horas y la del lípido liposomal era de 16,6 horas (panel A). La semivida de la liberación del fármaco de los liposomas era de 77,9 horas, demostrando una estabilidad de encapsulación remarcable (panel B).

Ejemplo 38. Síntesis y encapsulación liposomal de 2-(2-(N,N-dietilamino)etil)elipticina (2-DAE).

Cloruro de 2-(2-(N,N-dietilamino)etil)elipticina (NSC 359449) es un derivado anti-cancerígeno de la elipticina que se prepara mediante alquilación de elipticina con 2-(N,N-dietilamino)etilcloruro en metano en presencia del trietilamina (consulte Werbel, L.M., Angelo, M., Fry, D.M., and Worth, D.F. *J. Med. Chem.* 1986, **29**:1321-1322). Se prepararon liposomas que contenían TEA-Pn capturado como se describe en el Ejemplo 37. 2-DAE.2HCl se

incubó con los liposomas TEA-Pn en HEPES-Na 5 mM, Dextrosa al 5% pH 7,4, en una relación de 2-DAE-a-fosfolípido de 100 µg/µmol. La cantidad de fármaco cargado era de 88,2 µg de APE/µmol de PL (eficacia 88,2%).

Ejemplo 39. Farmacocinética de 2-DAE liposomal en ratas.

Se estudió la farmacocinética en sangre de 2-DAE liposomal (Ejemplo 38) en ratas como en el Ejemplo 37. La  $t_{1/2}$  de 2-DAE fue de 17,8 h y de la matriz del lípido de liposoma, 18,2 h (A). La semivida de liberación del fármaco desde los liposomas en la sangre era  $t_{1/2} = 677$  h (B). Por ello, estos liposomas eran extraordinariamente estables frente a fugas de fármaco en el torrente sanguíneo.

Ejemplo 40. Carga de vinorelbina en liposomas usando el método TEA-Pn. Efecto del pH.

Los liposomas se prepararon mediante el método de inyección de etanol como en el Ejemplo 11 usando una solución TEA-Pn de TEA 0,608 M, grupos fosfato 0,65 M, pH 6,1 y una osmolalidad de 531 mmol/kg, y extrusión en suspensión lípida 15 veces usando dos filtros de membrana de policarbonato de tamaño de poro 100 nm apilados. El tamaño del liposoma resultante era de  $108,3 \pm 17,1$  nm según QELS con Vinorelbina (VRB) en forma de 10 mg/ml de solución madre de bitartrato de vinorelbina USP añadida a los liposomas en una solución acuosa de HEPES-Na 5 mM, dextrosa al 5%, pH 6,5, en una relación fármaco-fosfolípido de 350 µg/µmol. El pH se ajustó al valor deseado usando NaOH 1-5 N y la mezcla se incubó a  $58 \pm 2$  °C durante 30 min. A continuación, la mezcla se enfrió en hielo durante 15 min, y el fármaco no encapsulado se eliminó mediante cromatografía de filtración en gel con Sephadex G-75, eluyendo con solución tampón HBS-6,5 (HEPES-Na 20 mM, NaCl 135 mM, pH 6,5). Posteriormente, se solubilizaron alícuotas de liposomas purificados en isopropanol ácido y se analizaron para detectar el nivel de vinorelbina usando espectrofotometría a 270 nm. El fosfolípido de liposoma se cuantificó usando el análisis de fosfatos de Bartlett (1959) después de la extracción de metanol-cloroformo.

Las relaciones fármaco-lípido calculadas después de la carga se muestran en la Tabla 24. La carga de vinorelbina era cuantitativa (es decir, prácticamente del 100%) e independiente del pH en el intervalo estudiado.

Tabla 24. Carga de vinorelbina en los liposomas con TEA-Pn capturado a distintos valores de pH de solución tampón externa

pH	Relación fármaco-a-fosfolípido (µg/µmol)	Eficacia de carga (%)
4,5	$351,2 \pm 52,88$	$100,4 \pm 15,2$
5,0	$347,6 \pm 6,35$	$99,3 \pm 1,8$
5,75	$355,2 \pm 11,2$	$101,5 \pm 3,2$
6,25	$377,0 \pm 21,5$	$107,7 \pm 6,6$
7,0	$374,3 \pm 29,58$	$106,9 \pm 9,0$

Ejemplo 41 Vinorelbina liposomal preparada usando el método TEA-Pn en diversas relaciones fármaco/lípido: eficacia de encapsulación y estabilidad in vivo en ratones.

Se prepararon liposomas con solución TEA-Pn capturada según el Ejemplo 40 excepto en que se incluyó [ $^3$ H]-CHE en la matriz lípida a 1,5 mCi/mmol de fosfolípido. El tamaño del liposoma era de  $98,5 \pm 34,3$  nm según QELS. Los liposomas se mezclaron con bitartrato de vinorelbina USP en solución tampón acuosa de HEPES-Na 5 mM, dextrosa al 5%, pH 6,5 en la relación fármaco-a-fosfolípido de 150-450 mg de VRB/mmol, y se incubó a  $58 \pm 2$  °C durante 30 min. No se realizaron ajustes del pH después de la adición del fármaco. Los liposomas cargados con vinorelbina (Ls-VRB) se aislaron y analizaron para conocer el contenido de fármaco y fosfolípido como en el Ejemplo 40.

Se inyectó a seis ratones hembra Swiss Webster (Harlan Bioresearch) de cinco a seis semanas de edad en grupos de tres intravenosamente con Ls-VRB-Pn a una dosis de 5 mg VRB/kg. La dosis de lípido varió en función del grado de carga y puede determinarse a partir de las proporciones de fármaco-a-lípido calculadas anteriormente. 8 horas o 24 horas después de la inyección, los animales se anestesiaron y desangraron, y la sangre se recogió en tubos pesados, en hielo que contenían cantidades conocidas de PBS con EDTA al 0,04%. Las células sanguíneas se separaron mediante centrifugación, y los sobrenadantes se analizaron para conocer el nivel de lípido liposomal por medio recuento de radioactividad [ $^3$ H]-CHE por centelleo y para conocer el nivel de vinorelbina usando HPLC de la forma siguiente. Las muestras se enriquecieron con vinblastina (patrón interno), se extrajeron con éter dietílico, se evaporaron y los residuos se disolvieron en la fase móvil consistente en una solución acuosa de acetato de trietilamonio 50 mM (pH 5,5) y acetonitrilo (58:42 en volumen). Las muestras se cargaron en una columna de sílice de fase inversa C<sub>18</sub> (columna Supelco C-18, 250 mm x 4 mm de D.I., tamaño de partícula de 5 µm) precedida por una columna de protección C-18. La columna se eluyó isocráticamente con la fase móvil anterior a un caudal de 1,0 ml/min. VRB se detectó usando un detector de absorbancia a 280 nm. Los tiempos de retención típicos para VRB y vinblastina (patrón interno) eran de 9,1 min y 7,8 min, respectivamente.

Los resultados se muestran en la Tabla 25. La eficacia de carga se redujo con el aumento en la relación fármaco/lípido, de prácticamente 100% a 150 mg/mmol a aproximadamente 66% a 450 mg/mmol. Se observó que la adición de bitartrato de vinorelbina en las relaciones de más de 250 mg de vinorelbina por mmol fosfolípido provocaba una acidificación sustancial de la suspensión de liposoma (pH <4,0) que conduce, a una eficacia de carga reducida. Por ello, se determinó la necesidad de controlar el pH durante la etapa de carga del fármaco. Las cantidades de matriz de liposoma detectadas en la sangre después de 8 horas estaban en el intervalo de  $30,4 \pm 6,6\%$  de la dosis inyectada (% de D.I.) a  $38,6 \pm 5,2\%$  de D.I. sin relación aparente con la cantidad absoluta de lípido inyectado. Después de 24 horas seguía habiendo del 6,4% de D.I. a 14,8% de D.I. de la matriz lípida detectable en la sangre. La cantidad de fármaco que quedaba encapsulado después de 8 horas variaba del 37% al 63%. Sin embargo, 24 horas después de la inyección, los niveles de fármaco después de la inyección disminuyeron por debajo del límite de detección del método analítico empleado.

Tabla 25. Eficacia de encapsulación y la retención del fármaco *in vivo* de la vinorelbina liposomal preparada en distintas relaciones fármaco/lípido usando el método TEA-Pn (sin ajustar el pH de la solución tampón de carga). Los datos sobre retención del fármaco son promedios  $\pm$  SD (N=3).

Relación vinorelbina/fosfolípido			% de fármaco que permanece encapsulado 8 horas después de la inyección
Entrada, mg/mmol, calculada	Salida, mg/mmol, medida	Eficacia de encapsulación, %	
150	156	104,0	$36,6 \pm 4,2$
250	238	95,2	$56,3 \pm 1,3$
350	260	74,3	$65,9 \pm 2,3$
450	299	66,4	$63,0 \pm 4,1$

Ejemplo 42. Carga de vinorelbina en los liposomas usando el método TEA-SOS en distintas proporciones de fármaco/lípido.

Los liposomas TEA-SOS para la carga del fármaco se prepararon como en el Ejemplo 40 excepto que se utilizó solución TEA-SOS con TEA 0,65 M, pH 5,4, osmolalidad 521 mmol/kg en lugar de la solución TEA-Pn y los liposomas se extrudieron a través de membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 80 nm. El tamaño del liposoma era de  $86,6 \pm 12,9$  nm según QELS. Se añadió VRB a los liposomas en solución acuosa de HEPES-Na 5 mM, Dextrosa al 5%, pH 6,5, en distintas relaciones fármaco-a-fosfolípido, y la mezcla se incubó posteriormente a 60 °C durante 30 min. A continuación, los liposomas cargados con VRB se aislaron y analizaron como en el Ejemplo 40.

Las relaciones fármaco-a-lípido calculadas en los liposomas VRB se muestran en la Tabla 26. Cabe destacar, contrariamente a la carga asistida por anión polimérico, que la carga de vinorelbina en los liposomas con azúcar polianionizado (octasulfato de sacarosa) era prácticamente cuantitativa independientemente de la relación fármaco-lípido para hasta 450 mg VRB/mmol de fosfolípido, y solo ligeramente inferior (88%) a 550 mg de VRB/mmol de fosfolípido.

Tabla 26. Dependencia de la carga de vinorelbina en los liposomas en la proporción fármaco-a-lípido.

Relación de vinorelbina/fosfolípido, mg/mmol		Eficacia de carga (%)
Total	Encapsulado en liposomas	
150	$159,9 \pm 11,5$	$106,6 \pm 8,1$
250	$255, \pm 12,4$	$102,2 \pm 5,1$
350	$381,8 \pm 16,3$	$109,1 \pm 5,1$
450	$456,1 \pm 29,5$	$101,4 \pm 6,6$
550	$486,2 \pm 26,0$	$88,4 \pm 4,2$

Ejemplo 43. Preparación de inmunoliposomas dirigidos contra HER2 cargados con vinorelbina mediante el método TEA-Pn, y farmacocinética en sangre comparativa de liposomas de vinorelbina dirigidos contra HER2 y no dirigidos contra HER2 en ratas.

Se preparó el conjugado scFv F5-PEG-DSPE dirigido contra HER2 como en el Ejemplo 19. Se prepararon inmunoliposomas de vinorelbina dirigidos contra HER2 mediante incubación de liposomas de vinorelbina no dirigida (Ejemplo 41, cargados en la relación fármaco-fosfolípido de 350 mg/mmol) con el conjugado F5-PEG-DSPE (Ejemplo 19) en solución acuosa de HEPES-Na 20 mM, NaCl 135 mM, pH 6,5 en la relación fármaco-lípido de 15 mg/mmol a 60 °C durante 30 min. El conjugado F5 no incorporado se eliminó mediante cromatografía en gel en una columna Sepharose 4B eluida con la misma solución tampón. Se administraron liposomas no dirigidos (Ls-Pn-VRB) y otros dirigidos contra HER2 (F5-ILs-Pn-VRB) por vía intravenosa a ratas Albino hembras (8-9 semanas de edad; 200 g) a una dosis de 5 mg VRB/kg. En varios puntos temporales, se recogió sangre como se describe en el Ejemplo 9, y se analizó para detectar el nivel de VRB y lípido de liposoma como en el Ejemplo 41. La semivida en

sangre de los lípidos de liposomas y el 50% de tiempo de liberación del fármaco se calcularon a partir de gráficos de concentración-tiempo del lípido o gráficos de relación fármaco/lípido-tiempo, respectivamente, encontrando la mejor configuración para la cinética exponencial utilizando la función TREND de la hoja de cálculo de MICROSOFT EXCEL (Microsoft Corp.). Los resultados (Figura 18) indicaron que los liposomas de vinorelbina dirigidos y no dirigidos tenían una farmacocinética de fármaco y lípido idéntica con una semivida del lípido de aproximadamente 12,1 horas y un 50% de tiempo de liberación del fármaco de aproximadamente 4,3 horas.

Ejemplo 44. Preparación y estabilidad comparativa *in vivo* de los liposomas de vinorelbina usando sales de amonio y sales de amonio sustituido.

Solución de sulfato de dextrano amonio (DS-A) con pH 5,8, 0.  $\text{NH}_4^+$  65 M, osmolalidad de 390 mmol/kg, y solución de sulfato de dextrano de trietilamonio (DS-TEA) con un pH de 6,0, 0.  $\text{NH}_4^+$  65 M, osmolalidad de 465 mmol/kg, se prepararon con sulfato de dextrano con un peso mol. de 10.000 (Sigma Chemical Co.) según el método del Ejemplo 4, usando titulación con una solución acuosa de amoniaco 12,4 M o trietilamina pura, respectivamente. Se preparó una solución acuosa de sulfato de amonio (S-A) 325 mM, pH 5,1, osmolalidad 703 mmol/kg, partiendo de sulfato de amonio de calidad analítica. Las tres soluciones contenían menos de 1% de  $\text{Na}^+$  del contenido total del catión. Se prepararon liposomas con estas soluciones capturadas usando el método de mezclado-extrusión de etanol del Ejemplo 41 (DSPC/Colesterol/PEG-DSPE relación molar 3:2:0,015). Se incluyó una etiqueta lípida radioactiva [ $^3\text{H}$ ]-CHE en la matriz lípida a 1,5 mCi/mmol de fosfolípido. La etapa de extrusión consistió en 10 pases a través de dos membranas de policarbonato de 0,1  $\mu\text{m}$  apiladas. Se añadió VRB a los liposomas en HEPES-Na 5 mM, Dextrosa al 5%, pH 6,5, a una relación fármaco-a-fosfolípido de 350 mg/mmol, el pH se ajustó a 6,5 usando NaOH 1 N, y la mezcla se incubó a 58-60 °C durante 30 min. A continuación, se enfrió la reacción en hielo durante 15 min. y el fármaco no encapsulado se retiró usando la cromatografía de filtración en gel Sephadex G-75 eluyendo con una solución acuosa HEPES-Na 20 mM, NaCl 135 mM, pH 6,5. Los liposomas cargados con vinorelbina purificados se analizaron para detectar el nivel de VRB mediante espectrofotometría y para detectar el nivel de fosfolípidos usando el análisis de fosfatos de Bartlett (1959) (consulte los Ejemplos 70, 71). La farmacocinética en sangre del lípido liposomal y el fármaco se estudió en ratas como en el Ejemplo 43.

Los resultados se muestran en las Figuras 19-20 y en la Tabla 27. Los liposomas cargados con dextransulfato de trietilamonio se compararon con los cargados usando sal amónica de sulfato de dextrano. Inesperadamente, los liposomas cargados usando la sal de trietilamonio se consideraron más estables que los cargados usando sal de amonio. La farmacocinética del portador liposomal en sí mismo era similar al de las tres formulaciones distintas y por ello dependía principalmente de la composición lípida empleada. La fuga de vinorelbina del Ls-VRB cargado usando sulfato de dextrano de trietilamonio era aproximadamente tres veces más lenta que la de las soluciones cargadas usando dextransulfato de amonio. Los liposomas cargados usando sulfato de amonio tenían velocidad de fuga de fármaco más rápida.

Tabla 27. Estabilidad comparativa *in vivo* de encapsulación de fármaco en liposomas usando sal de amonio sustituido y sal de amonio capturado.

Formulación, sal capturada en el liposoma	Tamaño del liposoma, nm, promedio $\pm$ SD (según QELS)	Semivida en sangre de la matriz lípida, horas	Tiempo para el 50% de liberación de fármaco en sangre, horas
DS-TEA	120,8 $\pm$ 28,5	9,5 $\pm$ 3,3	66,3 $\pm$ 13,4
DS-A	107,8 $\pm$ 15,4	11,2 $\pm$ 0,6	22,9 $\pm$ 1,7
S-A	114,5. $\pm$ 15,6	10,7 $\pm$ 0,2	1,77 $\pm$ 0,16

Ejemplo 45. Preparación y estabilidad *in vivo* de liposomas cargados con vinorelbina de distintos tamaños.

Se prepararon liposomas etiquetados con [ $^3\text{H}$ ]-CHE (1,5 mCi/mmol de fosfolípido) con solución capturada de octasulfato de sacarosa de trietilamonio (TEA 0,65 M, pH 6,4, osmolalidad 502 mmol/kg) siguiendo el método de mezclado-extrusión de etanol del Ejemplo 11. La etapa de extrusión incluía 15 pases por dos membranas de policarbonato apiladas con un tamaño de poro de 0,05, 0,08 o 0,1  $\mu\text{m}$ . La carga de vinorelbina, el aislamiento de liposomas de vinorelbina y la caracterización de liposomas se realizaron siguiendo el método del Ejemplo 40. Se utilizaron ratas Albino hembras (8-9 semanas de edad; 200 g) para estudiar la estabilidad *in vivo* del liposoma. Se estudió la farmacocinética del fármaco y el lípido liposomal en ratas como en el Ejemplo 43.

Los resultados se muestran en las Figuras 21, 22 y en la Tabla 28 a continuación. Se compararon los liposomas extrudidos a través de filtros de policarbonato de 0,05, 0,08 y 0,1  $\mu\text{m}$  y muestran tener una farmacocinética similar del portador del fármaco y el liposomal, así como una extensión similar de la fuga de contenidos. La liberación del fármaco de los liposomas en la sangre estaba caracterizada por tiempos de liberación del 50% en el intervalo de aproximadamente 40-80 horas y por encima de 24 horas.

Tabla 28. Caracterización de liposomas de vinorelbina.

Tamaño del liposoma, nm, promedio $\pm$ SD (según QELS)	Carga de fármaco, mg/mmol de fosfolípido	Eficacia de carga, %	Semivida en sangre de la matriz lipídica (horas)	Tiempo para el 50% de liberación de fármaco en sangre (horas)
87,6 $\pm$ 28,1	352,4 $\pm$ 13,9	100,7 $\pm$ 4,0	14,6 $\pm$ 0,7	39,7 $\pm$ 3,1
98,5 $\pm$ 15,1	322,6 $\pm$ 22,7	92,2 $\pm$ 6,5	13,0 $\pm$ 0,2	47,9 $\pm$ 3,8
109,6 $\pm$ 24,6	357,0 $\pm$ 10,5	102,0 $\pm$ 3,0	14,3 $\pm$ 0,3	78,0 $\pm$ 1,4

**Ejemplo 46.** Preparación de liposomas de vinorelbina dirigidos contra HER2 usando el método de captura TEA-SOS y farmacocinética de vinorelbina inmunoliposomal dirigida contra HER2 scFv y no dirigida contra HER2 scFv en ratas.

Se prepararon liposomas, se cargaron con vinorelbina en una relación de fármaco-fosfolípido de 350 mg/mmol, y se analizaron como se describe en el Ejemplo 43, excepto que la solución TEA-SOS del Ejemplo 45 se sustituyó por la solución TEA-Pn. La etapa de extrusión incluyó 15 pases a través de filtros de policarbonato de tamaño de poro 0,08  $\mu$ m. El tamaño del liposoma era de 95,0  $\pm$  26,0 nm según QELS. Se prepararon inmunoliposomas de vinorelbina dirigida contra HER2 unida a F5scFv a partir de estos liposomas de vinorelbina, y se estudió la farmacocinética en sangre del lipido liposomal y el fármaco de vinorelbina de liposoma dirigido o no dirigido contra HER2 en ratas como se describe en el Ejemplo 43. La semivida en circulación del lipido liposomal era de 11,4 horas y 10,3 horas, y el 50% del tiempo de liberación del fármaco era de 30,9 horas y de 30,3 horas para F5-ILs-VRB y Ls-VRB, respectivamente. Por ello, la farmacocinética del fármaco y el lipido de Ls-VRB y F5-ILs-VRB era muy similar, indicando que la introducción del conjugado scFv-PEG-DSPE no afectaba a la depuración del portador por sí mismo ni provocaba un aumento de fugas del fármaco procedente del portador mientras estaba en circulación (Figs. 23, 24).

**Ejemplo 47.** Preparación y propiedades farmacocinéticas de liposomas de vinorelbina formados por derivados lípidos no iónicos de poli(etilenglicol).

Se obtuvo metoxi-PEG (Peso mol. 2000)-derivado de C<sub>20</sub>-ceramida sintética (PEG-ceramida) de Northern Lipids, Inc., Canadá. El metoxi-PEG(peso mol. 2000)-distearoilglicerol (PEG-DSG) (SUNBRIGHT GS20) se adquirió de NOF Corp., Japón.

Se prepararon liposomas con la composición lipídica de DSPC, colesterol y lipido PEG (PEG-ceramida o PEG-DSG) en la relación molar de 3:2:0,3 y solución de TEA-SOS capturado (TEA 0,65 M, pH 6,4, osmolalidad 502 mmol/kg) siguiendo el método de mezclado/extrusión con etanol del Ejemplo 11. La etapa de extrusión incluía dos pases a través de dos filtros de membrana de policarbonato apilados 2 veces usando un tamaño de poro de 0,2  $\mu$ m y 10 veces usando un tamaño de poro de 0,08  $\mu$ m. Los liposomas se cargaron con vinorelbina en la relación fármaco-fosfolípido de 350 mg/mmol, caracterizados por el tamaño, y concentración de fármaco y lipido, y su farmacocinética se estudió en ratas como en el Ejemplo 46. Ambas formulaciones mostraron un tiempo de circulación prolongado de la matriz lipídica y mostraron una liberación del fármaco in vivo, con al menos el 50% del fármaco permaneciendo encapsulado después de 24 horas en la sangre *in vivo*, como se muestra en la Tabla 29 de más abajo.

Tabla 29 Caracterización de liposomas de vinorelbina con varios lípidos PEG

Lípido PEG	Tamaño del liposoma, nm, promedio $\pm$ SD (según QELS)	Carga de fármaco, mg/mmol de fosfolípido	Eficacia de carga en %	Semivida en sangre de la matriz lipídica (horas)	Tiempo para el 50% de liberación de fármaco en sangre (horas)
PEG-ceramida	103,3 $\pm$ 30,9	291,4 $\pm$ 18,0	83,26 $\pm$ 5,14	14,0	102,7
PEG-DSG	101,3 $\pm$ 20,1	359,3 $\pm$ 7,2	102,7 $\pm$ 2,1	15,1	24,6

Cabe destacar que el aumento de PEGilación de estos liposomas (contenido lipido de PEG de aproximadamente 5,7% en moles. del lipido total) no tenía prácticamente ningún efecto en la duración de la circulación en sangre del liposoma, comparado con liposomas similares con el tamaño correspondiente y que tenían una baja PEGilación de aproximadamente 0,3 mol. % del lipido total (Ejemplo 45, 109,6 nm,  $t_{1/2}$ =14,3 horas; 98,5 nm,  $t_{1/2}$ =13,0 horas).

**Ejemplo 48.** Preparación de vinorelbina liposomal dirigida contra HER2 y citotoxicidad de vinorelbina liposomal dirigida contra HER2 y no dirigida contra HER2 frente a células MDA-MB-453 *in vitro*.

Los liposomas cargados con vinorelbina (Ls-VRB) se prepararon como en el Ejemplo 42 (sin [<sup>3</sup>H]-CHE) usando la carga del fármaco con un pH 6,0 y 350  $\mu$ g de vinorelbina/ $\mu$ mol de fosfolípido. Se formó vinorelbina inmunoliposomal dirigida contra HER2 (F5-ILs-VRB) incubando estos liposomas con el conjugado F5-PEG-DSPE como se describe en los Ejemplos 19 y 42 anteriores, excepto en que no se añadió [<sup>3</sup>H]-CHE. Se preparó vinorelbina "libre" diluyendo 10 mg/ml de una solución de bitartrato de vinorelbina USP en el medio de cultivo celular.

MDA-MB-453 son células de adenocarcinoma de cáncer de mama (American Type Culture Collection, Rockville, MD) que sobreexpresan de forma moderada el receptor de HER2 (aproximadamente 3x10<sup>4</sup> a 1x10<sup>5</sup> copias/célula). Se determinó la citotoxicidad de VRB suministrado como fármaco libre, como vinorelbina liposomal no dirigida, o como vinorelbina

inmunoliposomal (F5) dirigida contra HER2 frente a células MDA-MB-453 como se describe en el Ejemplo 27, excepto en que las células se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos con las condiciones de cultivo recomendadas por el proveedor (Leibowitz L-15 con un 10% de suero fetal bovino, sin suplemento de CO<sub>2</sub>) a una densidad de 10.000 células/pocillo, y las formulaciones de fármacos se añadieron en una serie de diluciones por etapas de 1:3 empezando con 0,03-0,1 mg/ml. Los datos sobre viabilidad celular se representaron gráficamente con la concentración de fármaco (Figura 25) y las concentraciones de fármacos necesarias para reducir la viabilidad celular al 50% (CI<sub>50</sub>) se estimaron a partir de los gráficos. La CI<sub>50</sub> del liposoma de vinorelbina dirigido contra F5 de 0,06 µg/ml estaba muy cerca de la del fármaco libre (0,07 µg/ml) y era sustancialmente inferior a la de los liposomas no dirigidos (2,2 µg/ml). Esto representa una mejora de la actividad en 37 veces como resultado de la administración del fármaco específica células cancerosas.

**Ejemplo 49. Citotoxicidad de vinorelbina liposomal libre, dirigida y no dirigida contra HER2 frente a las células CaLu-3 in vitro.**

Los liposomas y los métodos del ejemplo anterior (Ejemplo 48) se usaron para estudiar la citotoxicidad de la vinorelbina libre, Ls-VRB y F5-ILs-VRB en células de carcinoma de pulmón no microcítico humano que sobreexpresan HER2 CaLu-3 (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Las células se cultivaron en medio RPMI-1460 con un 10% de suero fetal bovino en presencia de CO<sub>2</sub> al 5%. Los resultados se muestran en la Figura 26. La CI<sub>50</sub> de VRB libre era de 1,2 µg/ml, 10 µg/ml para F5-ILs-VRB y 50 µg/ml para Ls-VRB no dirigido. Esto representa una mejora de 5 veces en la actividad del fármaco encapsulado en el liposoma en función de administración dirigida a las células.

**Ejemplo 50. Citotoxicidad de la vinorelbina liposomal libre, dirigida contra HER2 y no dirigida contra HER2 frente a células SKBr-3 in vitro.**

Los liposomas y los métodos del Ejemplo 48 se usaron para estudiar la citotoxicidad de la vinorelbina libre, Ls-VRB y F5-ILs-VRB en células SKBr-3 de carcinoma de mama humano con una sobreexpresión de HER2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD), excepto que las células se cultivaron en el medio McCoy 5A modificado con el 10% de suero fetal bovino en presencia de CO<sub>2</sub> al 5%, sembradas en placas con una densidad de 5000 células/pocillo, y el fármaco se incubó con las células durante 6 h.

Los resultados se muestran en la Figura 27. La CI<sub>50</sub> de VRB libre era de 0,28 µg/ml, 0,17 µg/ml para F5-ILs-VRB y 0,8 µg/ml para Ls-VRB no dirigido. Esto representa una mejora de 4,7 veces en la actividad del fármaco como una función de la administración dirigida.

**Ejemplo 51 Eficacia antitumoral in vivo de la vinorelbina liposomal en xenoinjertos de cáncer de colon humano HT29 en ratones.**

Se prepararon liposomas en vesículas unilamelares pequeñas (93,2 ± 26,4 nm según QELS) a partir de distearoilfosfatidilcolina, colesterol y PEG-DSPE (relación molar 3:2:0,045) mediante hidratación a partir de una solución etanólica concentrada en una solución acuosa de octasulfato de sacarosa de trietilamonio (trietilamonio 0,6 M, pH 5,7-6,2), seguido de una extrusión repetida a través de membranas de policarbonato (tamaño de poro 100 nm), retirada de la sal polianiónica extraliposomal y carga con vinorelbina mediante incubación con los liposomas en una solución tampón isoosmótica a pH 6,5, relación fármaco/lípido de 325 mg VRB/mmol de fosfolípido a 60 °C como se describe en el Ejemplo 42

Se inyectó a ratones lampiños homocigóticos BALB/c hembras (6-8 semanas, peso 17-20 g) subcutáneamente en el costado con 1x10<sup>6</sup> de células de carcinoma de colon humano HT-29 (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Empezando en el día 16 posterior a la inoculación del tumor, cuando el diámetro medio del tumor era de 5-8 mm, los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos de seis animales cada uno y se trataron con vinorelbina libre o liposomal a una dosis de 5 mg/kg en la vena de la cola cada tres días durante un total de cuatro inyecciones. Para el grupo de control, los ratones se trataron con un volumen igual de solución salina. El tamaño del tumor de cada ratón se midió usando un calibre y el volumen del tumor se calculó usando la fórmula siguiente: (longitud del tumor)x(anchura del tumor)<sup>2</sup>/2. Para evaluar la toxicidad relacionada con el tratamiento, los animales también se pesaron dos veces a la semana. La vinorelbina liposomal mostró una eficacia superior en la supresión del crecimiento de los tumores HT-29 en comparación con la vinorelbina libre, haciendo que los tumores entraran en regresión, mientras en el grupo del fármaco libre los tumores continuaron creciendo (Figura 28). Hubo un ligero cambio en el peso corporal de los animales durante el transcurso del tratamiento, lo que indicaba que el tratamiento era bien tolerado y que la liposomalización no aumentaba la toxicidad del fármaco (Figura 29).

**Ejemplo 52 Eficacia antitumoral in vivo de la vinorelbina liposomal contra tumores singénicos C-26 de cáncer de colon de murino.**

La vinorelbina liposomal y la vinorelbina libre se prepararon como en el Ejemplo 48. Se inocularon ratones BALB/c machos (6-8 semanas, 17-20 g de peso) subcutáneamente con 2x10<sup>5</sup> de células de carcinoma de colon murino C-26. En el día 17 después de la inoculación, cuando el diámetro del tumor medio alcanzó los 5-8 mm, los ratones se dividieron aleatoriamente en seis grupos de tratamiento de cinco animales/grupo. Se inyectó a los ratones con tumor a través de la vena de la cola con vinorelbina libre a 6 mg/kg, 8 mg/kg o 12 mg/kg, y con vinorelbina liposomal a 4 mg/kg

o 6 mg/kg cada tres días para un total de cuatro inyecciones. Para el grupo de control, se inyectó a los ratones un volumen equivalente de solución salina normal. Los tamaños tumorales y los pesos corporales de los animales se controlaron como en el Ejemplo 51. La vinorelbina liposomal incluso a 4 mg/kg, fue considerablemente más eficaz a la hora de reducir el crecimiento del tumor que el fármaco libre a 12 mg/kg (Figura 30). Los pesos corporales de los animales en el transcurso del tratamiento mostraron ligeros cambios (<10% disminución), lo que indicaba que la toxicidad de la vinorelbina liposomal no había aumentado en comparación con la del fármaco libre (Figura 31).

Ejemplo 53 Eficacia antitumoral in vivo de vinorelbina liposomal dirigida contra HER2 frente a tumores de xenoinjertos de cáncer de mama humano BT-474 en ratones: efecto del contraíón de carga.

Se prepararon liposomas cargados con VRB  $99,5 \pm 10,2$  nm de tamaño siguiendo el método TEA-Pn del Ejemplo 41 y el método TEA-SOS del Ejemplo 42, respectivamente, excepto en que no se añadió [ $^3$ H]-CHE. Se cargó VRB en una relación fármaco/fosfolípido de 350 mg/mmol. Se formó vinorelbina liposomal dirigida contra HER2 incubando estos liposomas con el conjugado F5-PEG-DSPE (consulte el Ejemplo 19) como se describe en el Ejemplo 43. Se realizaron xenoinjertos de carcinoma de mama humano que sobreexpresan BT-474 HER2 con en ratones lampiños homocigóticos como en el Ejemplo 10. En el día 25 después de la inoculación de células tumorales, cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de  $200 \text{ mm}^3$  (intervalo  $144\text{-}309 \text{ mm}^3$ ), los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de ocho animales/grupo, y se trataron intravenosamente con 5 mg/kg de VRB libre, F5-ILs-VRB con Pn como contraíón o F5-ILs-VRB con SOS como contraíón, a una dosis de 5 mg/kg semanalmente para un total de tres inyecciones. El grupo de control recibió un volumen equivalente de solución salina normal. Los tumores y el peso corporal de los animales se controlaron como en el Ejemplo 10. La vinorelbina liposomal dirigida contra HER2 cargada usando octasulfato de sacarosa era mucho más eficaz a la hora de reducir el crecimiento del tumor que la misma construcción dirigida cargada usando poli(fosfato), y ambas preparaciones inmunoliposomales eran considerablemente más eficaces que la vinorelbina libre cuando se administraba a una dosis de 5 mg VRB/kg (Figura 32). Los ratones tratados con el fármaco demostraron pocos cambios de peso, lo que indicaba que el tratamiento se estaba tolerando bien (Figura 33).

Ejemplo 54. Eficacia antitumoral in vivo de vinorelbina liposomal dirigida a HER2 contra tumores de xenoinjertos de cáncer de mama humano BT-474 en ratones: efecto de PEGilación.

Se prepararon liposomas de DSPC y colesterol en la relación molar 3:2 siguiendo el Ejemplo 48 mediante hidratación de la matriz lípida de DSPC, colesterol y PEG-diestearoilglicerol con PEG de peso molecular 2000 (GS-20, NOF Corp., Japón) en una relación molar 3:2:0,015 ("PEG al 0,5%") o 3:2:0,3 ("PEG al 10%") a través del método de la solución etanólica en una solución acuosa de octasulfato de sacarosa de trietilamonio, seguido de una extrusión con membrana como se describe en el Ejemplo 48. Se cargó VRB en los liposomas en la relación fármaco/fosfolípido de 350 mg/mmol. Se formó vinorelbina inmunoliposomal F5 incubando estos liposomas con el conjugado F5-PEG-DSPE (Ejemplo 19) como se describe en el Ejemplo 43. Se realizaron xenoinjertos de BT-474 a ratones lampiños y se trataron con VRB libre, "F5-ILs-VRB-PEG al 0,5%" o "F5-ILs-VRB-PEG al 10%" a 5 mg/kg como en el Ejemplo 53. Como se muestra en la Figura 34, F5-ILs-VRB con una alta PEGilación proporcionó un PEG-DSG derivado del lípido PEG no iónico que era mucho más eficaz a la hora de reducir el crecimiento del tumor que F5-ILs-VRB con una cantidad inferior de PEG-DSG, mientras que ambas preparaciones era más activas que el fármaco libre.

Ejemplo 55 Eficacia antitumoral in vivo de la vinorelbina liposomal dirigido contra EGFR en xenoinjertos de cáncer cerebral humano U87 en ratones.

Los liposomas ( $86,6 \pm 12,9$  nm de tamaño según QELS) con solución 0,65 M TEA-SOS encapsulada se prepararon y cargaron con VRB siguiendo el Ejemplo 42. Se preparó VRB inmunoliposomal dirigida contra EGFR (C225Fab'-ILs-VRB) mediante incubación de los liposomas VRB con el conjugado PEG-DSPE de fragmentos Fab de anticuerpos dirigidos contra EGFR como se describe en el Ejemplo 36.

Se inyectó subcutáneamente a los ratones macho NCR *nu/nu* (5-6 semanas, 17-20 g de peso) en el costado con  $1 \times 10^7$  de células de glioblastoma humano U87 (ATCC) suspendidas en el medio de cultivo en un volumen total de 150  $\mu$ l. Cuando el tumor alcanzó un tamaño medio de  $250 \text{ mm}^3$ , los ratones se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de 10-12 animales. Los ratones fueron tratados con tres inyecciones intravenosas semanales de VRB libre, Ls-VRB no diana o C225Fab'-ILs-VRB a una dosis de 5 mg VRB/kg. El grupo de control recibió un volumen equivalente de solución salina. Los tamaños tumorales y los pesos corporales de los animales se controlaron como en el Ejemplo 10. C225-Fab'-ILs-VRB era más eficaz a la hora de inhibir el crecimiento de los tumores con xenoinjertos de cáncer cerebral humano con una sobreexpresión de EGFR que la vinorelbina liposomal no dirigida o la vinorelbina libre a una dosis igual (Figura 35).

Ejemplo 56. Preparación y farmacocinética de doxorubicina encapsulada en los liposomas usando el método de sulfato de trietilamonio.

Los liposomas con varias composiciones de matriz lípida (como se indica en la tabla de más abajo) se formaron como se describe en el Ejemplo 2. N-Glutaril-DSPE (Glu-DSPE) se adquirió de Avanti Polar Lipids, AL, EE. UU. Se formó una capa lípida pura a partir de la solución lípida en cloroformo usando evaporación rotatoria, las trazas de

compuestos volátiles se eliminaron al vacío (90  $\mu\text{m}$  Hg, 2 horas), la capa lípida se hidrató en sulfato de trietilamonio (TEA-SO<sub>4</sub>) solución (TEA 0,65 N), se sometió a seis ciclos de congelación y descongelación rápidas, y se extruyó a través de dos filtros de policarbonato de tamaño de poro 0,1  $\mu\text{m}$  diez veces y a través de dos filtros de policarbonato apilados de tamaño de poro 0,05  $\mu\text{m}$  diez veces. Para la cuantificación de la matriz lípida en las muestras de sangre, se incluyó [<sup>3</sup>H]-CHE en la matriz lípida a 0,5-1,5 mCi/mmol fosfolípido. Los liposomas con la solución de TEA-SO<sub>4</sub> capturada se cargaron con doxorubicina según el Ejemplo 2. Los liposomas en solución salina tamponada con HEPES (HEPES-Na 20 mM, NaCl 135 mM, pH 6,5) se incubaron con clorhidrato de doxorubicina (relaciones fármaco/fosfolípido de 140-170 mg/mmol) a 60 °C durante 45 min, seguido de inactivación en hielo y eliminación de la doxorubicina no encapsulada mediante cromatografía en gel. Se realizó un análisis de la doxorubicina mediante espectrofotometría (Ejemplo 71) y se realizó un análisis del fosfolípido usando el método de Barlett (Ejemplo 70). Las propiedades de los liposomas resultantes se resumen en la Tabla 30 siguiente.

Tabla 30. Propiedades de doxorubicina liposomal en varias composiciones lípidas.

Composición lípida (relación molar)	Tamaño del liposoma, nm, (promedio $\pm$ SD según QELS)	fármaco/fosfolípido, (mg/mmol)
DSPC/Chol/PEG-DSPE (3:2:0,015)	81,8 $\pm$ 27,3	163,6 $\pm$ 4,4
DSPC/Chol (3:2)	79,1 $\pm$ 27,9	137,0 $\pm$ 17,5
DSPC/Chol/Glu-DSPE (2,85:2:0,15)	83,6 $\pm$ 27,2	141,7 $\pm$ 10,4
DSPC/Chol/PEG-DSPE (2,7:2:0,3)	83,7 $\pm$ 23,1	175,0 $\pm$ 6,8

La farmacocinética en sangre de estos liposomas que contienen doxorubicina con una composición lípida de DSPC/Chol/PEG-DSPE 2,7:2:0,3 se estudió en ratas en una dosis intravenosa única de 5 mg doxorubicina/kg como se describe en el Ejemplo 9. Los liposomas tenían una circulación larga (semivida de aproximadamente 28 horas) (Figura 36). La relación estable doxorubicina-a-fosfolípido indicaba que la formulación era muy estable contra las fugas de fármaco en la circulación, perdiendo menos del 25% del fármaco en un periodo de tiempo de 48 horas.

Ejemplo 57. Liposomas cargados con doxorubicina e inmunoliposomas dirigidos contra HER2 preparados mediante el método de TEA-sulfato: preparación y eficacia antitumoral in vivo contra xenoinjertos de cáncer de mama humano con una sobreexpresión de HER2.

Se prepararon liposomas cargados con doxorubicina y que tenían diversas composiciones y propiedades de lípidos (enumerados en la siguiente tabla) como se describe en el Ejemplo 56. Se prepararon inmunoliposomas dirigidos contra HER2 cargados con doxorubicina se prepararon a partir de liposomas cargados con doxorubicina mediante incubación simultánea con conjugados scFv F5-PEG-DSPE dirigidos contra HER2 (aprox. 30 scFv/liposoma) como se describe en el Ejemplo 19. Se sensibilizaron ratones NCR *nu/nu* con xenoinjertos tumorales de cáncer de mama humano subcutáneo (BT-474), se trataron (en grupos de 10-12 animales) con doxorubicina liposomal e inmunoliposomal dirigida contra HER2 a una dosis de 5 mg/kg una vez a la semana durante un total de tres semanas una vez que los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 200 mm<sup>3</sup>, y se controló la progresión del tumor y el peso corporal de los animales como se describe en el Ejemplo 29. Para las formulaciones de liposomas de doxorubicina no dirigidos, se estudiaron las composiciones lípidas que no contenían PEG-DSPE, 0,5% en moles. PEG-DSPE, o 10% en moles. PEG-DSPE; para doxorubicina inmunoliposomal-F5, se estudiaron las formulaciones con 0,5% en moles. PEG-DSPE y 10% en moles. PEG-DSPE (aquí la cantidad de PEG-DSPE se expresa como % en moles. de fosfolípido de liposoma). Los resultados (Figura 37, Tabla 31) demostraron que todos los tratamiento de doxorubicina eran efectivos a la hora de retrasar el crecimiento del tumor. Sobre la base de los tamaños tumorales, en el día 53 después de la inoculación, las diferencias en la inhibición del crecimiento tumoral entre los tres grupos de liposomas no dirigidos no aumentaron la significancia estadística (ANOVA  $p=0,081$ ), pero la doxorubicina inmunoliposomal era mucho más eficaz que la doxorubicina liposomal no dirigida (ANOVA  $p=5,5 \times 10^{-10}$ ), donde la formulación de "PEG-DSPE al 10%" era mucho más efectiva que "PEG-DSPE al 0,5%" (prueba de la t de Student,  $p=0,027$ ). En el grupo de "PEG-DSPE al 10%" F5-ILs, los tumores entraron en regresión hasta 1 mm<sup>3</sup> o menos en el 67% de los animales, mientras que en el grupo "PEG-DSPE al 0,5%" F5-ILs solo en el 9%. En el grupo de control (tratamiento con solución salina), los tumores superaron el límite de tamaño aceptable del 15% de peso corporal en el día 38-43.

Tabla 31. Estudio sobre eficacia antitumoral *in vivo* de la doxorubicina liposomal: características del liposoma y resultados del tratamiento.

	Composición lípida	Tamaño del liposoma, nm (promedio $\pm$ SD)	Relación fármaco/fosfolípido, mg/mmol (promedio $\pm$ SD)	Tamaño promedio del tumor en el día 58, mm <sup>3</sup> (promedio $\pm$ SEM)
5	DSPC/Chol/PEG-DSPE (3:2:0,015)	83,4 $\pm$ 23,3	136,7 $\pm$ 6,7	490 $\pm$ 74
	DSPC/Chol (3:2)	80,5 $\pm$ 26,6	151,2 $\pm$ 1,9	587 $\pm$ 61
	DSPC/Chol/PEG-DSPE (2,7:2:0,3)	81,0 $\pm$ 24,7	140,1 $\pm$ 4,2	365 $\pm$ 60
10	DSPC/Chol/PEG-DSPE (3:2:0,015) + F5 scFv-PEG-DSPE	no medido	140,7 $\pm$ 2,8	119 $\pm$ 39
	DSPC/Chol/PEG-DSPE (2,7:2:0,3) + F5 scFv-PEG-DSPE	no medido	132,9 $\pm$ 2,2	15,5 $\pm$ 7,6

15 Ejemplo 58 Preparación de vinblastina liposomal y farmacocinética en sangre de vinblastina liposomal en ratas.

Se prepararon liposomas con solución TEA-SOS acuosa capturada (TEA 0,65 M, pH 6,4, osmolalidad 502 mmol/kg) y tamaño 99,5  $\pm$  10,2 nm (promedio  $\pm$  SD según QELS) siguiendo el método del Ejemplo 11 usando extrusión 2 veces a través de dos membranas de policarbonato apiladas de 0,2  $\mu$ m y diez veces a través de dos membranas de policarbonato apiladas de 0,08  $\mu$ m. Se añadió vinblastina (VBL) en forma de sulfato de vinblastina USP en una relación fármaco-a-fosfolípido de 150 mg/mmol. El pH de la mezcla de fármaco-liposoma se ajustó a 6,5 usando NaOH 1 N, y la mezcla se incubó posteriormente a 60 °C durante 30 min. Posteriormente, se enfrió la reacción en hielo durante 15 min y el fármaco no encapsulado se eliminó usando cromatografía de filtración en gel Sephadex G-75, eluyendo con HEPES-Na 5 mM, NaCl 135 mM, pH 6,5. Los liposomas purificados se analizaron espectrofotométricamente para VBL y para conocer el nivel de fosfolípido siguiendo el método de Bartlett como en los Ejemplos 70 y 71. [<sup>3</sup>H]-CHE se incluyó en la formación en una relación de 1,5 mCi/mmol fosfolípido. La vinblastina liposomal tenía 152,4  $\pm$  12,0 mg VBL/mmol fosfolípido (encapsulación cuantitativa).

Se estudió la farmacocinética en sangre de la vinblastina liposomal en ratas Albino hembra (8-9 semanas de edad; 200 g) a una dosis de 5 mg VBL/kg como se describe en el Ejemplo 9. La vinblastina se cuantificó en muestras de plasma sanguíneo como se describe en el Ejemplo 41 (usando vinorelbina como patrón interno). Los liposomas de vinblastina mostraron una buena circulación en sangre (semivida en plasma del componente lípido 12,8  $\pm$  0,04 horas) (Figura 38) y una estabilidad muy buena frente a las fugas de fármaco de los liposomas con una carga de vinblastina inicial remanente encapsulada superior al 70% después de 24 horas (Figura 39). El tiempo posterior a la inyección para conseguir una liberación del 50% del fármaco encapsulado fue de 40,6  $\pm$  1,2 horas.

40 Ejemplo 59 Preparación de liposomas cargados con vincristina usando el método TEA-SOS y efecto del pH sobre la eficacia de carga.

Se prepararon liposomas con un tamaño de 86,6  $\pm$  12,9 nm (según QELS), composición lípida de DSPC/Chol/PEG-DSPE en la relación molar de 3:2:0,015 y solución TEA-SOS acuosa capturada (TEA 0,65 M, pH 5,4, osmolalidad 521 mmol/kg) siguiendo el método del Ejemplo 11 usando una etapa de extrusión de 15 pases a través de dos membranas de policarbonato apiladas de tamaño de poro 0,08  $\mu$ m. Se añadió vincristina (VCR) a los liposomas en HEPES-Na 5 mM, solución tampón acuosa de Dextrosa al 5%, pH 6,5, como sulfato de vincristina en una relación fármaco-fosfolípido de 350  $\mu$ g vincristina/ $\mu$ mol fosfolípido, el pH se ajustó a la relación indicada usando NaOH 1 N, y la mezcla se incubó a 60 °C durante 30 min. A continuación, se enfrió en hielo durante 15 min. y los liposomas se separaron del fármaco no encapsulado usando cromatografía de filtración en gel Sephadex G-75 eluyendo con HBS-6.5 (HEPES 20 mM, NaCl 135 mM, pH 6,5). A continuación, los liposomas purificados se analizaron para la vincristina mediante espectrofotometría usando absorbancia a 265 nm después de la solubilización en isopropanol ácido, y para el contenido de fosfolípido, usando el análisis de fosfato de Bartlett (1959).

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 32. La carga de fármaco era superior al 90% en el intervalo de pH 4,5-7,5, y prácticamente cuantitativa a pH 5,0-7,5. A un pH de 3,5, que es el pH observado en la mezcla liposomal después de la adición del fármaco, pero sin ajuste de pH, la carga era considerablemente inferior.

Tabla 32. Dependencia del pH de la vincristina cargada en liposomas con TEA-SOS capturado.

60

65

	pH	Proporción fármaco/fosfolípido, $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$	Eficacia de carga (%)
	3,5	39,7 $\pm$ 4,9	11,3 $\pm$ 0,2
	4,5	327,2 $\pm$ 20,6	93,5 $\pm$ 5,4
5	5,0	360,6 $\pm$ 5,8	103,0 $\pm$ 1,7
	5,5	371,2 $\pm$ 30,2	106,1 $\pm$ 9,1
	6,0	347,7 $\pm$ 20,4	99,3 $\pm$ 5,8
	6,5	347,7 $\pm$ 20,9	99,4 $\pm$ 5,9
10	7,0	377,3 $\pm$ 22,2	107,8 $\pm$ 6,8
	7,5	371,5 $\pm$ 24,9	106,1 $\pm$ 7,6

**Ejemplo 60.** Preparación de liposomas cargados con vincristina usando el método TEA-SOS: efecto de la relación fármaco/lípido sobre la eficacia de carga.

Los liposomas que contenían SOS-TEA se prepararon como en el Ejemplo 59 y se cargaron con sulfato de vincristina en una relación fármaco-fosfolípido de 150-550  $\mu\text{g}$  vincristina/ $\mu\text{mol}$  fosfolípido a un pH de 6,5 siguiendo el procedimiento del Ejemplo 59. Los liposomas purificados a partir del fármaco no encapsulado se analizaron posteriormente para detectar el nivel de VCR mediante espectrofotometría y para el fosfolípido liposomal usando el análisis de Bartlett (1959). La eficacia de carga del fármaco era superior al 90% durante todo el intervalo de relaciones fármaco/lípido del estudio, y era prácticamente cuantitativa entre 150-450  $\mu\text{g}$  vincristina/ $\mu\text{mol}$  de fosfolípido (Tabla 33).

Tabla 33. Carga de vincristina en liposomas que contienen TEA-SOS en diferentes relaciones de fármaco-a-lípido.

	Fármaco-a-fosfolípido de entrada ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ )	Fármaco-a-fosfolípido encapsulado ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ )	Eficacia de carga (%)
	150	163,6 $\pm$ 6,6	109,0 $\pm$ 4,8
	250	251,1 $\pm$ 17,0	100,5 $\pm$ 6,8
30	350	347,7 $\pm$ 20,9	99,4 $\pm$ 5,9
	450	452,0 $\pm$ 18,8	100,4 $\pm$ 4,2
	550	521,6 $\pm$ 24,9	94,8 $\pm$ 4,3

**Ejemplo 61.** Preparación de vincristina inmunoliposomal y citotoxicidad de vincristina liposomal e inmunoliposomal frente a células cancerosas *in vitro*.

Se preparó vincristina liposomal (Ls-VCR) como se ha descrito en el ejemplo 59 usando una relación fármaco/fosfolípido de 350 mg/mmol. Se preparó vincristina inmunoliposomal F5 específica de HER2 (F5-ILs-VCR) a partir de vincristina liposomal mediante incubación simultánea con conjugado scFv F5-PEG-DSPE dirigido contra HER2 como se describe en el Ejemplo 19. Se preparó solución de vincristina "libre" (VCR) diluyendo sulfato de vincristina USP en agua, seguido de una filtración estéril. Se determinó la citotoxicidad de VCR, Ls-VCR y F5-ILs-VCR frente a las células SKBr-3 (ATCC) de carcinoma de mama humano con una sobreexpresión de HER2 realizando un análisis de viabilidad celular basado en MTT usando el procedimiento del Ejemplo 27, donde las células se inocularon en placas de microtitulación de 96 pocillos a 5000 células/pocillo, se aclimataron durante la noche, y se incubaron con el medio que contenía el fármaco durante 4 horas, seguido de una incubación posterior en un medio exento de fármaco durante 3 días. Los resultados se muestran en la Figura 40. La  $\text{Cl}_{50}$  era 75 ng/ml para VCR libre, 11 ng/ml para F5-ILs-VCR y 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para Ls-VCR. La vincristina liposomal dirigida preparada según la presente descripción era 6,8 veces más activa que el fármaco libre, y 273 veces más activa que el fármaco liposomal no dirigido, mostrando una mejora sustancial en la actividad anticancerosa como una función de la administración de fármaco específica de célula.

**Ejemplo 62** Farmacocinética en sangre de Ls-VCR en ratas.

Se prepararon liposomas con solución SOS-TEA capturada (TEA 0,65 M, pH 5,8, osmolaridad 530 mmol/kg) y composición lípida de DSPC/Chol/PEG-DSPE (relación molar 3:2:0,015), que también contenían [ $^3\text{H}$ ]-CHE a 1,5 mCi/mmol de fosfolípido, siguiendo el método del Ejemplo 11 usando una etapa de extrusión formada por 10 pases a través de membranas de policarbonato apiladas con un tamaño de poro de 80 nm o 100 nm. Los liposomas se cargaron con VCR a un pH de 6,5, relación fármaco/fosfolípido de 350 mg/mmol, como se describe en el Ejemplo 59. Los liposomas cargados con VCR se administraron a ratas Albino hembra intravenosamente (180-220 g) a una dosis de 5 mg de VCR/kg, y se estudió la farmacocinética en sangre del fármaco y el lípido del liposoma como se describe en el Ejemplo 9. La cantidad de VCR en las muestras de sangre se cuantificó mediante HPLC como se describe en el Ejemplo 41, excepto en que el relación volumétrica de la solución acuosa de acetato de trietilamonio (pH 5,5) y el acetonitrilo en la fase móvil era de 65:35. El tiempo de retención típico para VCR era de 8,8 min. Los resultados se muestran en la Figura 41 y en la Tabla 34. Ambas preparaciones tenían una duración en circulación extensa (semivida en sangre de 12-17 horas). La vincristina liposomal era muy estable contra fugas de fármaco en las dos preparaciones (semivida de más de 120 horas) (Figura 42).

Tabla 34. Características de liposomas cargados con vincristina a 350 mg/mmol de fosfolípido usando el método TEA-SOS.

Tamaño de poro de extrusión, nm	Tamaño del liposoma, nm (promedio $\pm$ SD)	Carga de fármaco, mg/mmol de fosfolípido	$t_{1/2\beta}$ lípido, horas	$t_{1/2\beta}$ VCR, horas	$t_{1/2}$ VCR liberación, horas
80	101,2 $\pm$ 20,2	347,7 $\pm$ 20,93	17,5 $\pm$ 1,5	16,0 $\pm$ 2,0	>120
100	125,6 $\pm$ 32,0	366,8 $\pm$ 18,11	12,1 $\pm$ 0,7	12,0 $\pm$ 0,8	No detectable

Ejemplo 63. Farmacocinética en sangre de Ls-VCR en ratas en diversas relaciones fármaco-lípido.

Se prepararon liposomas con solución SOS-TEA capturada (TEA 0,65 M, pH 6,4, osmolalidad 485 mmol/kg) y composición lípida de DSPC/Chol/PEG-DSPE (relación molar 3:2:0,015), que también contenían [ $^3$ H]-CHE a 1,5 mCi/mmol de fosfolípido, siguiendo el método del Ejemplo 11 usando una etapa de extrusión formado por 10 pases a través de membranas de policarbonato apiladas con un tamaño de poro de 50 nm o 80 nm. Los liposomas se cargaron con VCR a un pH de 6,5 como se describe en el Ejemplo 59 añadiendo 20 mg/ml de una solución madre acuosa de sulfato de VCR en las relaciones fármaco/lípido calculadas de 100, 200 o 350 mg/mmol de fosfolípido. La eficacia de la carga de fármaco era superior al 96% para todas las preparaciones. Los liposomas cargados con VCR se administraron a ratas Albino hembra intravenosamente (8-9 semanas de edad, 190-220 g) a una dosis de 5 mg de VCR/kg, y se estudió la farmacocinética en sangre del fármaco y el lípido del liposoma como se describe en el Ejemplo 62. Los resultados se muestran en la Tabla 35. La vincristina liposomal tenía una buena duración en circulación (semivida en sangre de unas 20-30 horas) y era excepcionalmente estable en todos los tamaños y relaciones fármaco-lípido estudiados (semivida de liberación del fármaco superior a 93 horas).

Tabla 35. Características de liposomas cargados con vincristina usando el método TEA-SOS en varias relaciones fármaco-lípido.

Tamaño de poro de extrusión, nm	Tamaño del liposoma, nm (promedio $\pm$ SD)	VCR, mg/mmol fosfolípido		$t_{1/2}$ lípido, horas	$t_{1/2}$ VCR, horas	$t_{1/2}$ liberación del fármaco, horas
		añadido	encapsulado			
50	76,8 $\pm$ 27,2	100	96,1 $\pm$ 3,0	35,6 $\pm$ 2,7	30,3 $\pm$ 4,0	227 $\pm$ 96
		200	193,3 $\pm$ 3,9	20,8 $\pm$ 2,2	18,4 $\pm$ 0,7	244 $\pm$ 130
		350	375,2 $\pm$ 10,0	24,8 $\pm$ 0,9	19,6 $\pm$ 0,9	93,2 $\pm$ 6,7
80	101,6 $\pm$ 25,3	100	104,5 $\pm$ 2,1	33,0 $\pm$ 7,6	26,8 $\pm$ 4,8	153 $\pm$ 10

Ejemplo 64. Preparación de vincristina liposomal dirigida contra HER2 y eficacia antitumoral de vincristina liposomal dirigida y no dirigida contra HER2 frente a xenoinjertos de cáncer de mama humano con sobreexpresión de HER2 en ratones.

Se prepararon liposomas cargados con vincristina (Ls-VCR-SOS) usando el método TEA-SOS siguiendo el Ejemplo 63 (con omisión del componente [ $^3$ H]-CHE) usando extrusión con membranas de 50 nm de tamaño de poro y cargando el fármaco en una relación fármaco-fosfolípido de 100 mg/mmol. Se formó vincristina inmunoliposomal F5 (F5-ILs-VCR) incubando Ls-VCR-SOS con el conjugado F5-PEG-DSPE dirigido contra HER2 (Ejemplo 19) como se describe en el Ejemplo 43. Se prepararon los liposomas cargados con vincristina usando citrato de TEA (Ls-VCR-Cit) de forma similar a los liposomas Ls-VCR-SOS, excepto que la solución de citrato de trietilamonio (preparada titulando la solución acuosa de ácido cítrico con la trietilamina pura con un pH de 5,1 y ajustando la concentración a trietilamina 0,65 M) se substituyó por la solución de TEA-SOS. El diseño del estudio de tratamiento siguió el método del Ejemplo 10. Se practicaron xenoinjertos subcutáneos de cáncer de mama humano BT-474 en ratones lampiños, y cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 250 mm<sup>3</sup> (intervalo 144-309 mm<sup>3</sup>) los ratones en grupos de ocho a nueve fueron tratados con VCR libre, Ls-VCR o F5-ILs-VCR con una dosis intravenosa semanal de 2 mg de VCR/kg durante un total de tres semanas, empezando en el día 19 después de la inoculación del tumor. Los tamaños tumorales y los pesos corporales de los animales se controlaron como se describe en el Ejemplo 10. Para el grupo de control, los ratones se trataron con un volumen igual de solución salina. Las diferencias en los tamaños tumorales entre los grupos de tratamiento se evaluaron estadísticamente en el día 63 después de la inoculación del tumor usando la prueba de Mann-Whitney. La dinámica del tamaño promedio del tumor en los grupos se ilustra en la Figura 43. F5-ILs-VCR demostró una eficacia máxima en comparación tanto con Ls-VCR como con VCR libre, provocando en el día 63 una regresión completa del tumor en seis de los ocho animales (75%). Ls-VCR-Cit también fue efectivo, provocando regresiones completas del tumor en el día 63 en dos de los nueve animales (22%). aunque fue menos efectivo que F5-ILs-VCR ( $p < 0,005$ ). Ls-VCR-SOS y VCR libre fueron igual de efectivos ( $p > 0,2$ ) y menos efectivos que F5-ILs-VCR o Ls-VCR-Cit. Por ello, sorprendentemente, con la administración dirigida a células, un fármaco liposomal encapsulado usando un anión polivalente de la presente descripción demostró ser más eficaz que el fármaco encapsulado liposomalmente a través de un anión sin unión. La dinámica de peso corporal de los animales indicó que todas las preparaciones de VCR eran menos tóxicas que el VCR libre, provocando menos pérdida de peso corporal durante el tratamiento (Figura 44).

Ejemplo 65. Preparación de vincristina liposomal dirigida contra EGFR y eficacia antitumoral de vincristina liposomal no dirigida y dirigida contra EGFR frente a xenoinjertos de cáncer cerebral humano con sobreexpresión de EGFR en ratones.

5 Se prepararon liposomas cargados con vincristina (Ls-VCR) se prepararon usando el método TEA-SOS como en el Ejemplo 64. Se preparó vincristina inmunoliposomal dirigida contra EGFR mediante incubación simultánea de los liposomas con el conjugado Fab' C225Fab-PEG-DSPE dirigido contra HER2 como se describe en el Ejemplo 36.

10 Se inyectaron ratones macho NCR *nu/nu* (5-6 semanas de edad, 17-20 g de peso) subcutáneamente en el costado con 0,15 ml del medio de cultivo celular que contenía  $1 \times 10^7$  células de glioblastoma humano U87 que expresaban un mutante EGFRvIII del receptor del factor de crecimiento epidérmico de forma estable (HER1). En el día 11, cuando el tamaño del tumor alcanzó los 300-400 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron de forma aleatoria en cuatro grupos de 10-12 animales/grupo. Se administraron tratamientos con VCR libre (sulfato de vincristina 1 mg/ml en solución salina), Ls-VCR o C225Fab-ILs-VCR en una dosis intravenosa de 1,5 mg/kg en los días 11, 18 y 25 después de la inoculación del tumor. Se inyectó a los ratones en el grupo de control de forma similar con un volumen equivalente de solución salina normal. Se controlaron los tamaños tumorales y los pesos corporales de los animales como en el Ejemplo 10. Los resultados se muestran en la Figura 45. Todos los animales tratados con formulaciones de VCR mostraron un crecimiento tumoral retardado en comparación con los animales de control. No hubo una diferencia significativa entre los grupos tratados con VCR libre y Ls-VCR. C225Fab-ILs-VCR dirigido contra EGFR era más eficaz que el VCR libre o liposomal no dirigido.

20 Ejemplo 66. Preparación de liposomas con solución de hexafosfato de inositol trietilamonio (TEA-IHP).

25 Se obtuvo sal de dodecasodio de hexafosfato de inositol, un poliol anionizado (IHP) de Sigma (St. Louis, MO). La solución acuosa que contenía trietilamonio 0,65 M y 0,681 M de los grupos fosfatos, pH 6,5 y osmolalidad de 718 mmol/kg, se preparó mediante intercambio de iones en la resina de poliestireno sulfonada reticulada Dowex 50Wx8-200, seguido de una titulación con TEA puro y dilución con agua siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4. El contenido de sodio residual fue inferior al 1% de la suma de cationes. Los lípidos secos (150 μmol de DSPC, 100 μmol de Chol, 0,75 μmol de PEG-DSPE) se disolvieron en 0,5 ml de etanol al 100% USP a 60 °C y se mezclaron con 4,5 ml de solución de hexafosfato de inositol trietilamonio precalentada a la misma temperatura. El etanol se extrajo parcialmente mediante evaporación rotatoria a 30-40 mm Hg y 40-45 °C hasta que la mezcla no mostró burbujas. A continuación, la suspensión lípida se extruyó a 60-65 °C 15 veces usando membranas de policarbonato de tamaño de poro de 0,1 nm apiladas. Los liposomas resultantes tenían  $104,3 \pm 39,0$  nm de tamaño según QELS. El trietilamonio IHP no encapsulado se extrajo mediante cromatografía en gel en una columna Sepharose 4B, se eluyó con HEPES-Na 5 mM, dextrosa al 5%, solución tampón a pH 6,5 y los liposomas se cuantificaron mediante la concentración de fosfolípidos usando el método de Bartlett con la extracción según el Ejemplo 70.

35 Ejemplo 67. Carga de fármacos en liposomas con solución TEA-IHP capturada.

40 Los liposomas del Ejemplo 67 se cargaron con CPT11 o vinorelbina. La vinorelbina se cargó en una relación fármaco-a-fosfolípido de 175 o 350 g/mol, y CPT11 en una relación de 250 o 500 g/mol. Los fármacos se añadieron a los liposomas en la solución tampón de HEPES-dextrosa (Ejemplo 67) en las relaciones de entrada de fármaco/fosfolípido indicadas a continuación (consulte la Tabla 36). En caso necesario, el pH se ajustó a 6,5-6,8 usando NaOH 1 N. Las mezclas se incubaron a 60 °C durante 30 min, se enfriaron en hielo durante 15 minutos y se realizó una cromatografía en una columna de filtración en gel Sephadex G-25, eluida con HEPES-Na 5 mM, NaCl 145 mM, pH 6,5. Las alícuotas de los liposomas purificados se solubilizaron en metanol acidificado y se analizaron mediante espectrofotometría (Ejemplo 71). El fosfolípido se cuantificó siguiendo el método de Bartlett (1959) con extracción (Ejemplo 70). Ambos fármacos se cargaron cuantitativamente (es decir, prácticamente al 100%) en los liposomas, como se muestra en la Tabla 36 a continuación.

50 Tabla 36. Propiedades de fármacos cargados en liposomas con hexafosfato de inositol capturado.

Fármaco	Relación de entrada fármaco/lípido, g/mmol fosfolípido	Relación fármaco/lípido encapsulado, g/mmol fosfolípido	Eficacia de carga, %
Vinorelbina	175	$175,3 \pm 8,0$	$100,2 \pm 4,5$
Vinorelbina	350	$352,3 \pm 11,8$	$100,6 \pm 3,3$
CPT-11	250	$265,1 \pm 11,2$	$106,1 \pm 4,7$
CPT-11	500	$518,7 \pm 27,8$	$103,7 \pm 5,8$

60 Ejemplo 68. Estabilidad química de CPT-11 libre o liposomal en presencia de plasma de ratón *in vitro*.

65 En el cuerpo, CPT-11, que es un pro-fármaco, experimenta una transformación química para formar un metabolito de fármaco activo conocido como SN-38. Tanto el SN-38 como el CPT-11 también se convierten de su forma de lactona activa en productos inactivos conocidos como carboxilatos SN-38 o CPT-11. En este Ejemplo, se estudió el efecto de la liposomalización de CPT-11 según la presente invención sobre la conversión química de CPT-11 en estos productos en presencia de plasma sanguíneo. Se prepararon liposomas con octasulfato de sacarosa de trietilamonio capturado (TEA 0,65 M, pH 6,4, osmolalidad 485 mmol/kg) y la composición lípida de DSPC, Colesterol y PEG-DSPE en una relación

molar de 3:2:0,015 según el Ejemplo 11, usando extrusión diez veces a través de dos filtros de policarbonato apilados de 0,08  $\mu\text{m}$ . Los liposomas tenían un tamaño de  $87,4 \pm 19,2$  nm según QELS. CPT-11 se cargó aproximadamente a 500 mg de CPT-11 base/mmol fosfolípido liposomal mediante incubación en una solución acuosa de HEPES-Na 5 mM, dextrosa al 5%, pH 6,5, a 60 °C durante 30 min., seguida por inactivación en hielo durante 15 min. Los liposomas cargados con CPT-11 se purificaron posteriormente en una columna Sephadex G-75 eluida con solución salina tamponada con HEPES (HEPES 5 mM, NaCl 145 mM, pH 6,5). Los liposomas CPT-11 resultantes tenían  $536,5 \pm 20,1$  mg de CPT-11/mmol de fosfolípido. La solución de CPT-11 libre se preparó disolviendo clorhidrato de irinotecán USP preparado recientemente en 1 mg/ml en 144 mM de solución acuosa de NaCl, acidificada a pH 3 con HCl diluido. Se mezclaron alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  de CPT-11 libre o liposomal o CPT-11 libre con 90  $\mu\text{l}$  de plasma de ratón estabilizado con heparina (Harlan Bioproducts, EE. UU.) y se incubaron a 37 °C en un baño de agua con agitación. En un momento específico, se realizó una cromatografía por triplicado de las muestras de liposomas en columnas de exclusión por tamaños Sepharose CL-4B (2 ml volumen basal) eluidas con HBS-6,5, y las fracciones con fármaco se detectaron mediante fluorescencia. Los picos primero (volumen vacío) y segundo (seguimiento) con contenido de fármaco se recogieron y consideraron como fracciones del fármaco liberadas y encapsuladas liposomalmente. Las muestras se extrajeron con 400  $\mu\text{l}$  de metanol enfriado en hielo mediante vortización durante 10 s, seguido de centrifugación a 14.100xg durante 5 min. Los sobrenadantes se analizaron para detectar el CPT-11 y sus productos de conversión mediante HPLC usando una modificación de un método de Warner and Burke, *J Chromatogr., Ser. B Biomed. Sci. Appl.* 1997, vol. 691, pág. 161-71. La fase móvil estaba formada por acetato de trietilamonio al 3% pH 5,5 (solución A) y acetonitrilo (solución B) suministrados a 1,0 ml/min en una gradiente lineal de 20% en vol. de B a 50% en vol. de B en 14 min. Los productos eluidos se detectaron mediante fluorescencia con excitación a 375 nm y emisión a 500 nm. Los tiempos de retención fueron de 5,3 min (CPT-11 carboxilado), 6,8 min (SN-38 carboxilado), 9,3 min (CPT-11) y 11,0 min (SN-38). Los resultados (Tabla 37) indicaron que mientras que el CPT-11 libre y el CPT-11 liberado de los liposomas habían sufrido conversión, el CPT-11 intraliposomal se mantenía estable.

Tabla 37. Conversión de CPT-11 libre y liposomal en SN-38 y formas carboxiladas en plasma de ratón *in vitro*.

Muestra	Tiempo, horas	CPT-11, %		SN-38, %	
		lactona	carboxilato	lactona	carboxilato
CPT-11 libre	2	$1,9 \pm 0,4$	$35,2 \pm 1,9$	$4,4 \pm 0,1$	$58,4 \pm 2,1$
	12	<0,1	$11,5 \pm 0,9$	$9,9 \pm 0,8$	$78,6 \pm 1,3$
	24	<0,1	<0,1	$22,5 \pm 9,8$	$77,5 \pm 9,8$
Ls-CPT-11 (encapsulado)	12	$97,7 \pm 0,1$	<0,1	$2,3 \pm 0,1$	<0,1
	24	$97,7 \pm 0,1$	<0,1	$2,3 \pm 0,1$	<0,1
Ls-CPT-11 (liberado)	12	$60,5 \pm 10,4$	$25,0 \pm 7,1$	$5,0 \pm 0,3$	$9,5 \pm 3,0$
	24	$78,3 \pm 6,7$	$14,0 \pm 5,2$	$6,5 \pm 0,5$	$1,2 \pm 1,7$

#### Ejemplo 69. Estabilidad química in vivo de CPT-11 libre o liposomal en ratas.

Se preparó CPT-11 liposomal como en el Ejemplo 68 usando octasulfato de sacarosa trietilamonio con TEA 0,65 M, pH 6,4 y osmolalidad de 502 mmol/kg. El tamaño del liposoma era de  $98,5 \pm 18,4$  nm, y la encapsulación de CPT-11 era de  $510,1 \pm 16,5$  mg de CPT-11/mmol fosfolípido. El CPT-11 libre y el liposomal se administraron intravenosamente con una dosis de 25 mg/kg en ratas Albino hembra (180-220 g) con catéteres centrales permanentes, y las muestras de sangre se recogieron a intervalos durante un periodo de 48 horas. Las muestras de sangre se mezclaron con PBS enfriado en hielo que contenía EDTA al 0,04% y se centrifugaron rápidamente para retirar las células sanguíneas. Se evaluaron alícuotas de los fluidos sobrenadantes para detectar el nivel de CPT-11, SN-38, y sus formas carboxiladas mediante HPLC como en el Ejemplo 68 anterior. Los resultados se muestran en las Figuras 46 y 47. Mientras el CPT-11 libre se eliminó rápidamente, siendo indetectable después de 30 minutos, el CPT-11 liposomal era persistente en la circulación ( $t_{1/2}$  15,2 horas) con el 37,8% del fármaco en la sangre a las 24 horas, y aproximadamente el 10% del fármaco todavía en circulación después de 48 horas. No hubo una conversión detectable de la forma liposomal de CPT-11 ni SN-38, así como tampoco de la forma carboxilada de CPT-11. Se administró CPT-11 libre intravenosamente a modo de solución, se eliminó de la circulación con bastante rapidez (semivida de unos 16 min) y se produjo una conversión apreciable a la forma carboxilada del fármaco.

#### Ejemplo 70. Cuantificación del fosfolípido liposomal.

*Digestión ácida modificada - método de fosfomolibdato azul I.* Este método se ha modificado después de Bartlett (1959). Las alícuotas de 10-20 ml de liposomas se colocaron en tubos de vidrio resistentes al calor, se digirieron mediante calentamiento con 0,5 ml de ácido sulfúrico 10 N durante 2 horas a 110-130 °C, se mineralizaron mediante la adición de 50 ml de peróxido de hidrógeno al 9%, y se calentaron durante otros 30 min. Hasta no detectar peróxido de hidrógeno con una tira de papel indicador. Las muestras digeridas a temperatura ambiente se diluyeron con 1 ml de solución acuosa de molibdato de amonio al 0,2% y se mezclaron con 0,1 ml de solución acuosa de ácido ascórbico al 5% y se incubaron en un baño de agua hirviendo durante 10 min. La absorbancia del complejo de fosfomolibdato reducido se midió a 800 nm y se comparó con una curva patrón producida simultáneamente usando soluciones patrón de fosfato inorgánico.

*Digestión ácida modificada - método de fosfomolibdato azul II.* Este método es una modificación del método de Morrison (1964). Se mezclaron alícuotas de 5 µl de liposomas que tenían fosfolípido 1-10 mM con 60 µl de ácido sulfúrico concentrado y 10 µl de peróxido de hidrógeno al 30% en tubos de vidrio resistentes al calor. Las mezclas se calentaron a 200-220 °C durante 10 min., se diluyeron con 0,7 µl de agua desionizada, mezclada con 10 µl de solución acuosa de sulfito de sodio al 10%, se incubaron en un baño de agua hirviendo durante 5 min, y se enfriaron a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µl de solución acuosa de molibdato de amonio al 2% y 10 µl de solución acuosa de ácido ascórbico al 10%, y las muestras se incubaron en un baño de agua hirviendo durante 10 min. Las muestras se enfriaron rápidamente a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia del complejo de fosfomolibdato reducido a 825 nm en comparación con la muestra en blanco. Se determinó la cantidad de fosfolípido a partir de la curva patrón obtenida en el mismo análisis usando soluciones patrón con 2, 4, 6, 8 y 10 mM de dihidrógeno fosfato de potasio.

*Método de extracción.* Se extrajeron alícuotas de 25-100 µl de liposomas se extrajeron 3 veces con porciones de 200 µl de la mezcla de metanol-cloroformo (1:2 en volumen). Las fases orgánicas se combinaron en tubos de vidrio resistentes al calor, y los disolventes se retiraron al vacío. Los residuos se trataron con ácido sulfúrico 10 N y se sometieron a un análisis adicional para determinar el nivel de fósforo según el método I anterior.

Salvo que se indique lo contrario, los datos analíticos se presentan como un promedio ± error estándar de análisis por triplicado.

Ejemplo 71. Cuantificación de fármacos en los liposomas.

*Cuantificación espectrofotométrica.* Se mezclaron alícuotas de liposomas (10-50 µl) con 1 ml de solución acuosa de isopropanol de 70% en vol. con HCl 0,075-0,1 N, y la absorbancia frente a la muestra en blanco se midió en las longitudes de onda siguientes: doxorubicina, 485 nm; CPT-11 y topotecán, 372 nm; elipticinas, 306 nm, vinorelbina, 270 nm; vincristina y vinblastina, 265 nm. La cantidad de fármaco se determinó comparando con una curva patrón de un análisis simultáneo.

*Cuantificación fluorométrica.* Se diluyeron alícuotas de muestras que contenían liposomas (p. ej. plasma sanguíneo) se diluyen con isopropanol acidificado (alícuotas de 0,02-0,1 ml: 1 ml de isopropanol al 70%- HCl 0,075 N; alícuotas >0,1 ml: isopropanol al 90%- HCl 0,1 N a 1 ml). Si se produce una precipitación de proteínas, las muestras se incuban en hielo 1-2 horas y se clarifican mediante 10 min de centrifugación a 12.100xg. La fluorescencia de los sobrenadantes se mide en las siguientes longitudes de onda: CPT-11, excitación 370 nm, emisión 423-425 nm;

Topotecán, excitación 380-385 nm, excitación 520-525 nm; elipticinas, excitación 306 nm, emisión 520 nm. La cantidad de fármaco se calcula a partir de las curvas estándar de un análisis simultáneo después de restar la fluorescencia en blanco.

Ejemplo 72. Efecto de los lipopolímeros sobre la eficacia de carga de la vinorelbina en liposomas.

Los liposomas compuestos por 200 partes molares de DSPC, 133 partes molares de colesterol y lípidos PEG-DSPE (1-20 partes molares) derivatizados con poli(etilenglicol)(peso molar 2000)-lípidos o PEG-DSG (20 partes molares), y que contenían solución de TEA-SOS 0,65 M de encapsulada se prepararon siguiendo el método del Ejemplo 11, usando una membrana de 80 nm de tamaño de poro para la etapa de extrusión. Los liposomas se cargaron con vinorelbina en una relación fármaco-fosfolípido de 350 mg/mmol y se purificaron a partir del fármaco no encapsulado siguiendo el método del Ejemplo 40. Se realizó un análisis de los liposomas para detectar el contenido de fármaco y lípidos como se describe en los Ejemplos 70, 71 y para el tamaño del liposoma según QELS usando la aproximación gaussiana ponderada en volumen. Los resultados (Tabla 38) indicaron que mientras que aunque el derivado de PEG aniónico, PEG-DSPE, en la cantidad de más de 1% en moles del fosfolípido del liposoma (0,3% en moles del lípido total) tenía un efecto negativo en la eficacia de carga del fármaco, el derivado neutro, PEG-DSG, sorprendentemente no afectaba a la eficacia de carga incluso a 9,1% en moles del fosfolípido del liposoma (5,7% en moles del lípido total).

Tabla 38. Propiedades de los liposomas de vinorelbina preparados con el método TEA-SOS en diversas cantidades de derivados del lípido PEG.

Lípido PEG	Cantidad del lípido PEG, mol. % del lípido total	Tamaño del liposoma, nm (promedio SD)	Carga de fármaco, mg/mmol de fosfolípido	Eficacia de carga, % encapsulación
PEG-DSPE	0,3	108 ± 32	359,5 ± 17,8	102,7 ± 5,2
PEG-DSPE	0,6	110 ± 18	346,6 ± 14,5	99,0 ± 4,1
PEG-DSPE	1,8	104 ± 35	332,0 ± 14,0	94,9 ± 3,8
PEG-DSPE	2,9	94 ± 33	259,8 ± 9,5	74,2 ± 2,0
PEG-DSPE	4,0	100 ± 36	155,4 ± 7,0	44,4 ± 0,9
PEG-DSPE	5,7	103 ± 31	61,2 ± 5,2	17,5 ± 0,3
PEG-DSG	5,7	97 ± 36	362,7 ± 14,2	103,6 ± 4,2

Ejemplo 73. Efecto del agente de captura del fármaco intraliposomal en la duración de CPT-11 en sangre en ratones.

Los liposomas con soluciones a 0,65 N de sales de trietilamonio (TEA) o trietanolamonio (TEOA) capturadas de hexafosfato de inositol (IHP, ácido fítico) u octasulfato de sacarosa se prepararon y cargaron con CPT-11 a 500 g/mol de fosfolípido siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 66. Los liposomas se administraron intravenosamente a ratones Swiss-Webster con una dosis de 5 mg CPT-11/kg de peso corporal. 24 horas después, los ratones se anestesiaron y desangraron mediante una punción a corazón abierto. La sangre se recogió, se analizó para conocer el contenido de CPT-11 en el plasma sanguíneo mediante HPLC como se describe en el Ejemplo 68, y la cantidad de fármaco se expresó como % de la dosis inyectada remanente en la sangre (% de D.I.). TEOA-IHP era menos efectivo a la hora de mejorar la duración en sangre del fármaco que TEA-IHP, TEOA-SOAS y TEA-SOS (Tabla 39).

Tabla 39. Permanencia de CPT-11 en sangre 24 horas después de la administración intravenosa de liposomas CPT-11 en ratones.

Agente de captura del fármaco intraliposomal	% de D.I. remanente en la sangre
TEOA-IHP	2,74 ± 0,54
TEA-IHP	5,86 ± 0,20
TEOA-SOS	7,03 ± 0,17
TEA-SOS	11,32 ± 0,46

Ejemplo 74. Carga del fármaco en liposomas que contienen octasulfato de sacarosa dietilamonio 1,05 N

Se preparó una solución acuosa de octasulfato de sacarosa dietilamonio 1,05 N (DEA-SOS) pH 6,0, osmolaridad 727 mmol/kg, usando el método de intercambio de iones/titulación descrito en el Ejemplo 6 empleando dietilamina pura (pureza del 99,5%). La matriz lípida de 3 partes molares de DSPC, 2 partes molares de colesterol y 0,015 partes molares de PEG2000-DSPE, se formuló en liposomas (tamaño promedio ponderado en volumen 92,4 nm) en presencia de la solución DEA-SOS, y se cargó en CPT-11 en los liposomas en diversas relaciones de entrada de fármaco/lípido siguiendo el método del Ejemplo 11. El fármaco no encapsulado se extrajo mediante cromatografía en gel y se determinó la cantidad de fármaco encapsulado por lípido unitario (relación de salida fármaco/lípido). Se calculó la eficacia de encapsulación como % de la relación de salida fármaco/lípido en relación con la relación de entrada. Los resultados se muestran en la Tabla 40. La carga consiguió su nivel máximo de aproximadamente 1,76 mol de fármaco por mol fosfolípido (1,67-1,70 mol fármaco/g lípido total), lo que coincide bastante bien con la cantidad (1,78 mol de dietilamonio/mol de fosfolípido) basado en el contenido de dietilamonio de los liposomas, suponiendo un intercambio estequiométrico de iones de dietilamonio intraliposomal para las moléculas de fármaco y un volumen capturado intraliposomal estimado de unos 1,7 l/mol de fosfolípido.

Tabla 40. Carga de CPT-11 en liposomas de DSPC/Chol/PEG-DSPE que contienen DEA-SOS 1,05 N.

Proporción de entrada fármaco/lípido, mol/g	Proporción de salida fármaco/lípido, mol/g	Eficacia de encapsulación, %
1,25	1,247 ± 0,038	99,8 ± 3,0
1,50	1,534 ± 0,052	102,3 ± 3,5
1,80	1,669 ± 0,043	92,7 ± 2,4
2,06	1,690 ± 0,054	82,0 ± 2,6
2,20	1,704 ± 0,062	77,5 ± 2,8
2,42	1,685 ± 0,103	69,6 ± 4,3

Salvo que se indique lo contrario, los datos analíticos se presentan como un promedio ± error estándar de análisis por triplicado. Los datos sobre farmacocinética de plasma de rata son el promedio ± error estándar de análisis duplicados.

**Reivindicaciones**

- 5 1. Una composición que comprende un liposoma en un medio, en donde el liposoma comprende 1,2-diestearoil-SN-fosfatidilcolina, colesterol y N-(omega-metoxi-poli[etilenglicol]oxicarbonil)-1,2-distearoilfosfatidil-etanolamina en la relación molar 3:2:0,015, y capturados en el interior del liposoma se encuentran irinotecán y octasulfato de sacarosa.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en donde el trietilamonio también está capturado en el interior del liposoma.
- 15 3. Una composición farmacéutica que comprende la composición del liposoma de la reivindicación 1, un portador aceptable a nivel farmacéutico y una sustancia tampón.
4. La composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que el pH está entre 6,0 y 7,5.
5. La composición farmacéutica según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde la composición farmacéutica se prepara como un inyectable.
- 20 6. La composición de la reivindicación 1, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde el N-(omega-metoxi-poli[etilenglicol]oxicarbonil)-1,2-distearoilfosfatidil - etanolamina es N-(omega-metoxi-poli[etilenglicol] (peso molecular 2000)-oxicarbonil)-1,2-distearoilfosfatidil etanolamina.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

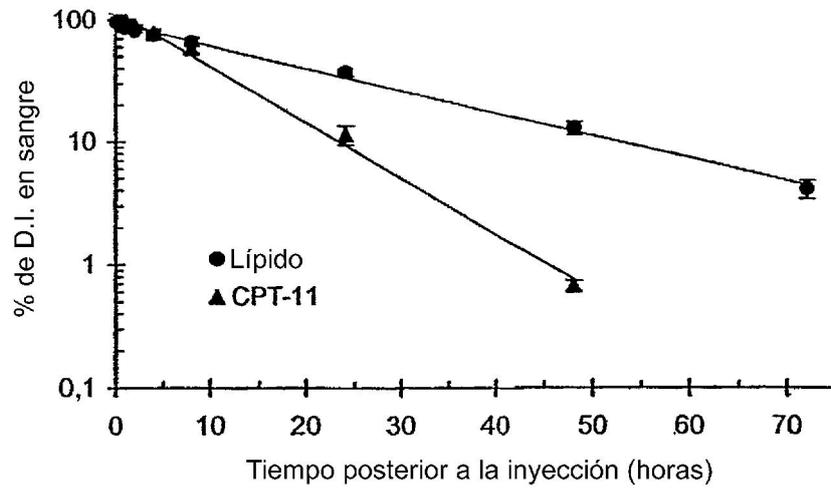


Figura 1

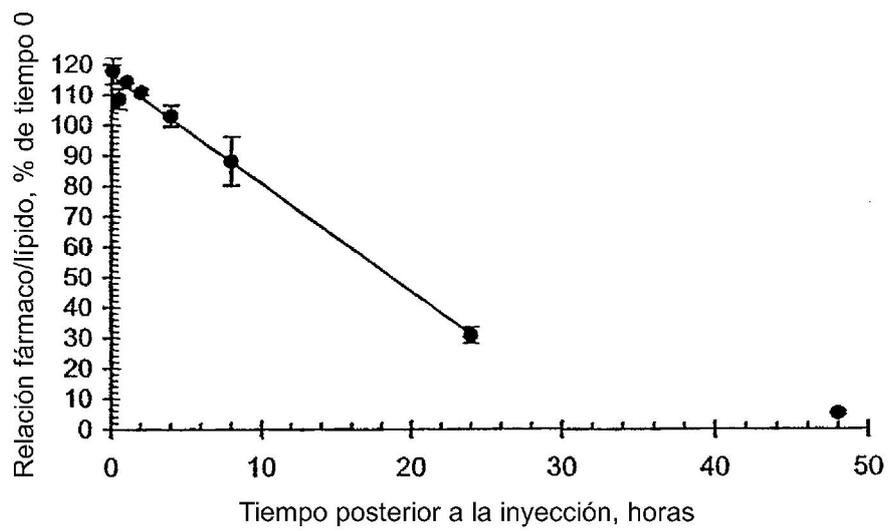
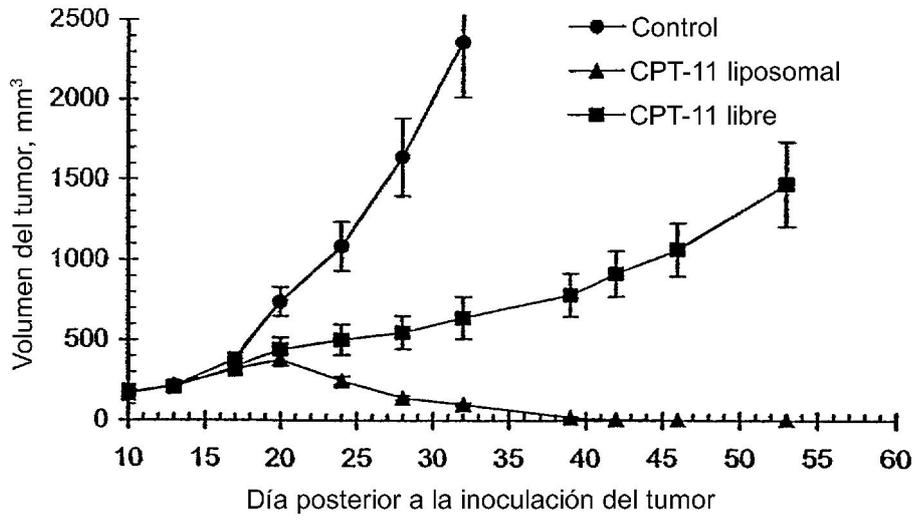
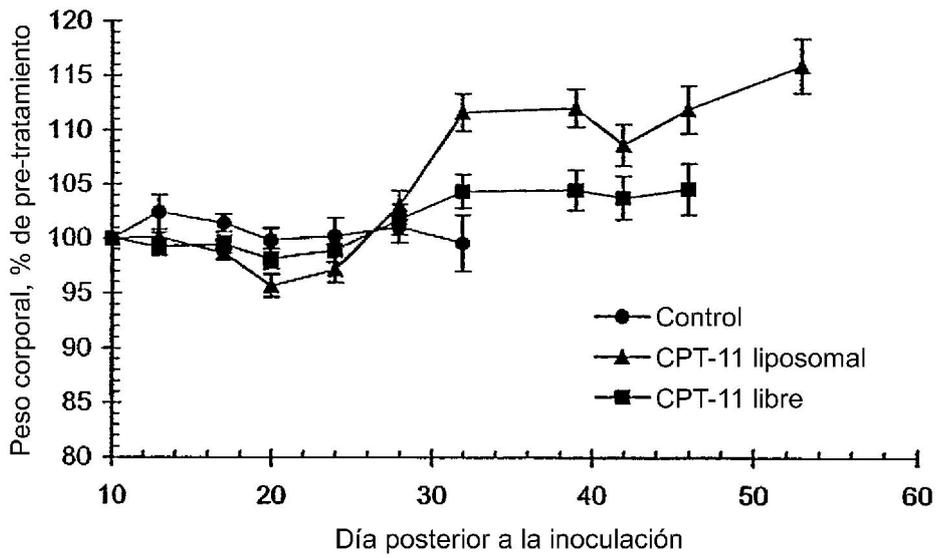


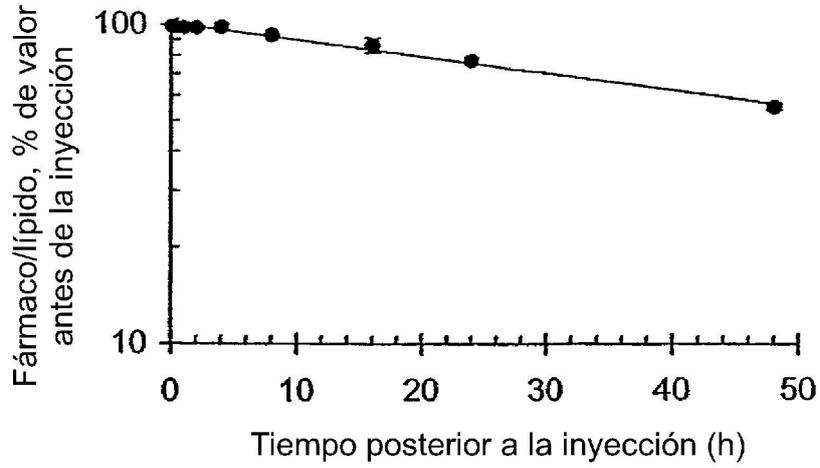
Figura 2



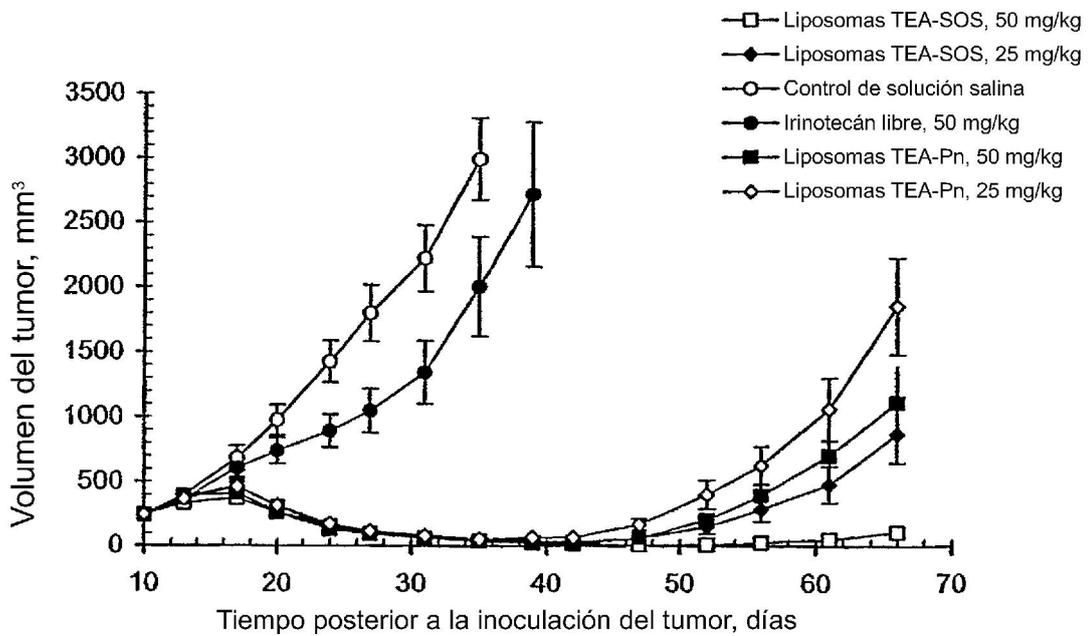
**Figura 3**



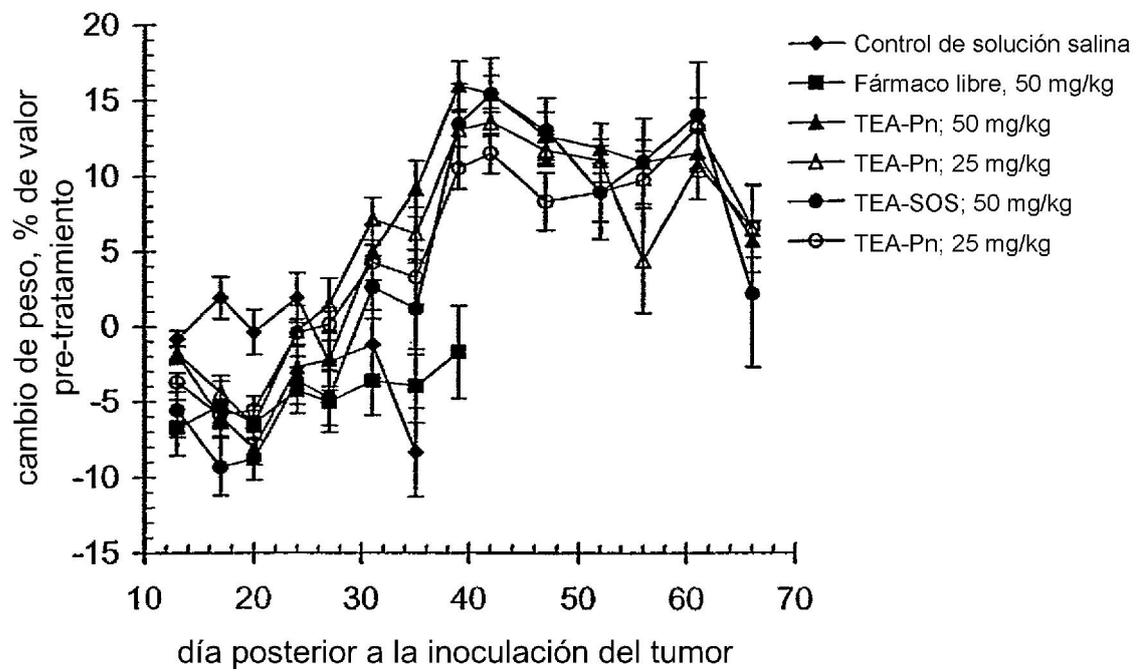
**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**

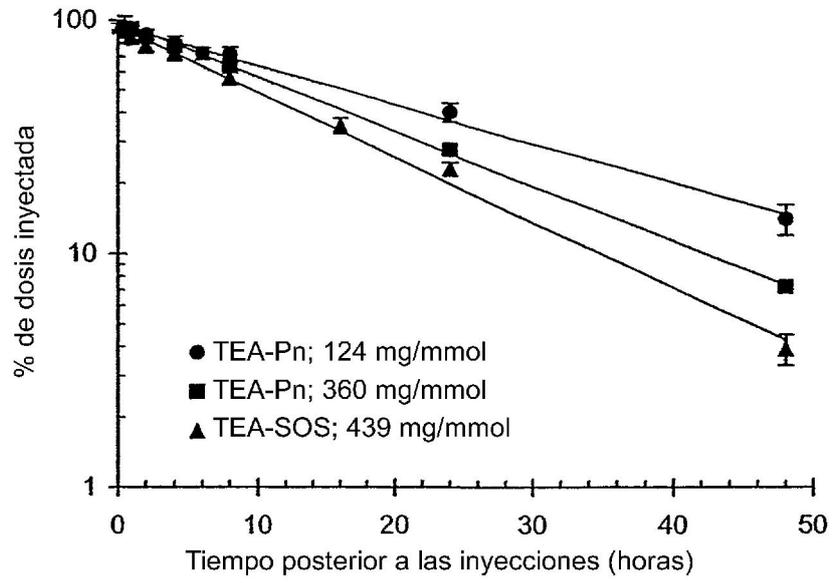


Figura 8A

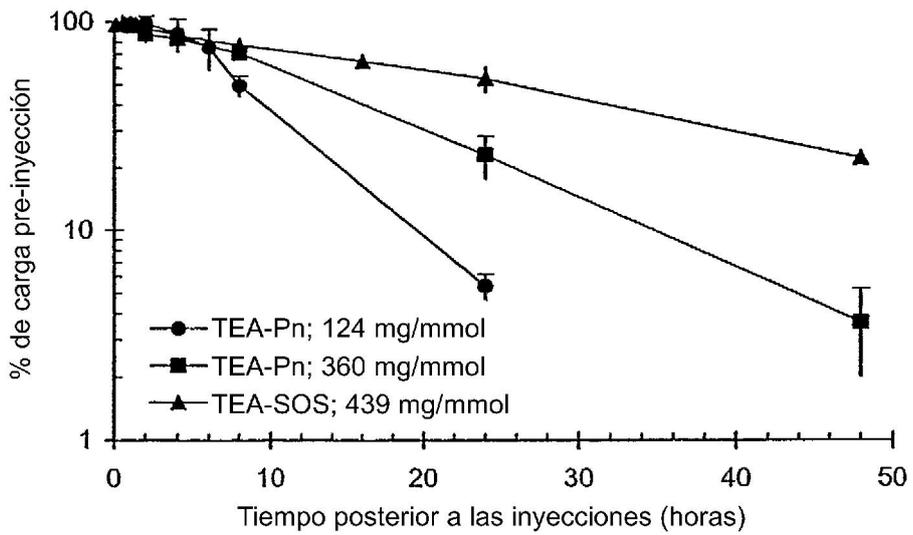


Figura 8B

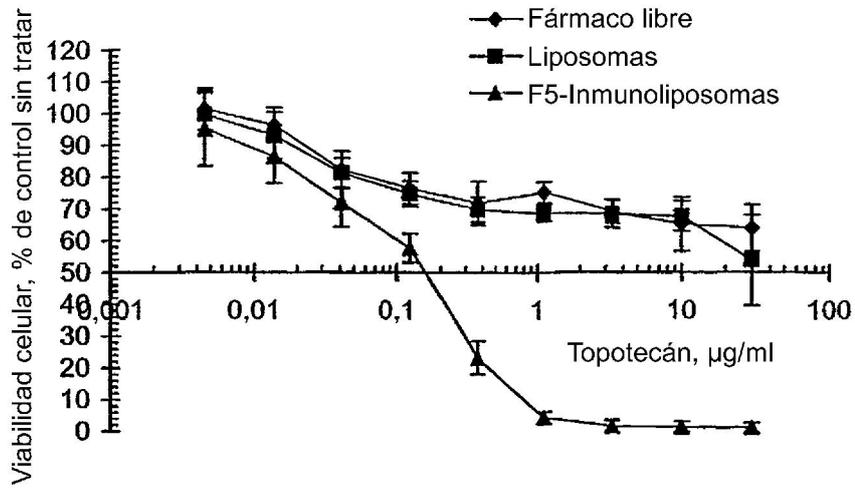


Figura 9

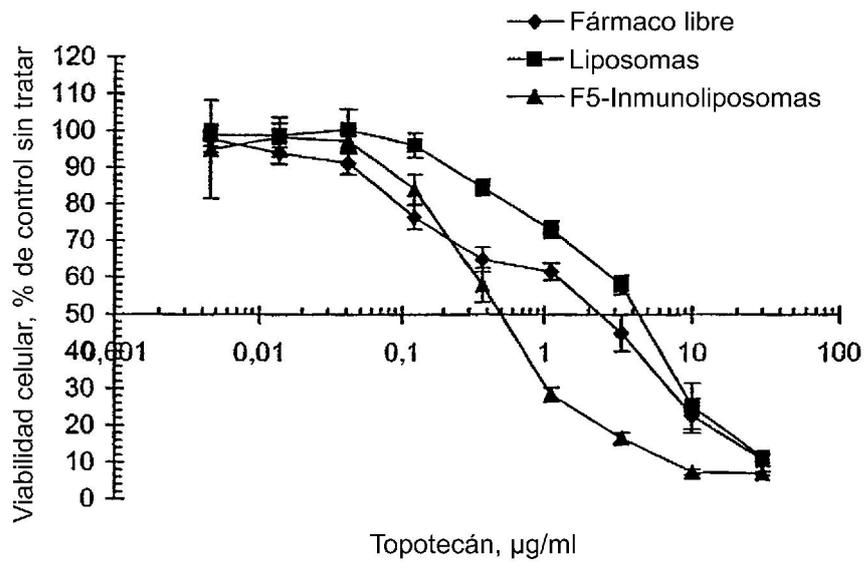


Figura 10

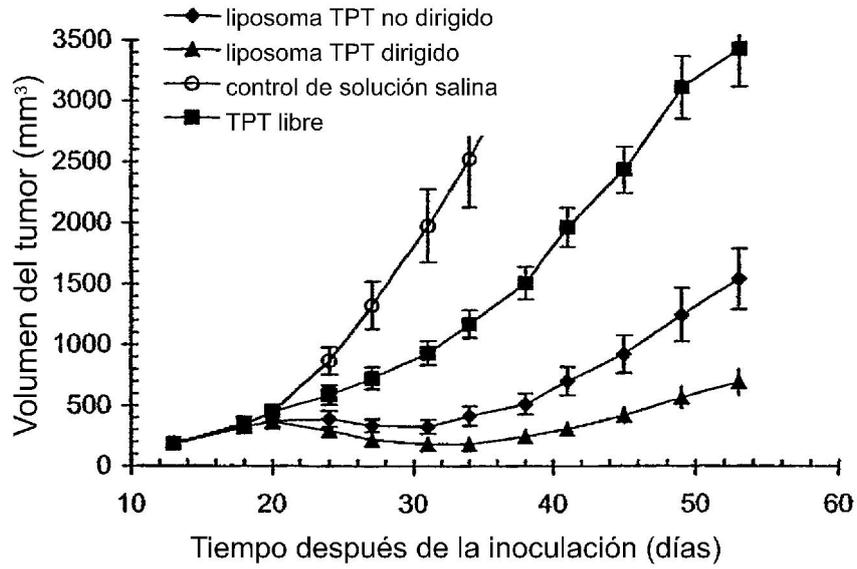


Figura 11

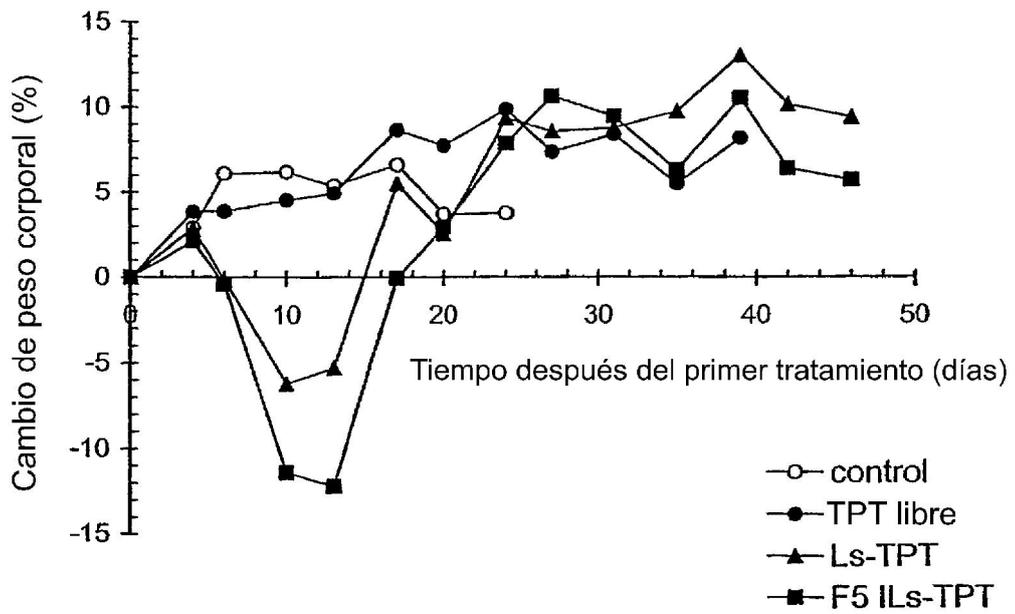


Figura 12

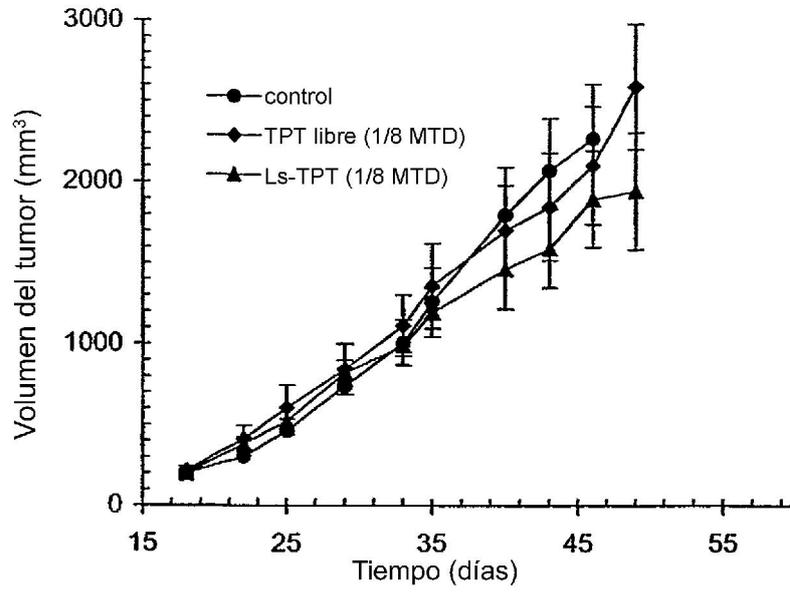


Figura 13A

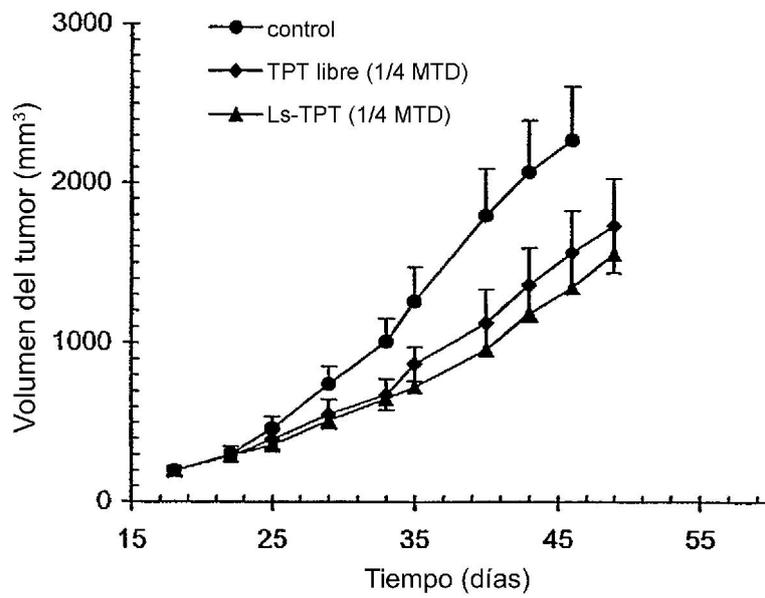


Figura 13B

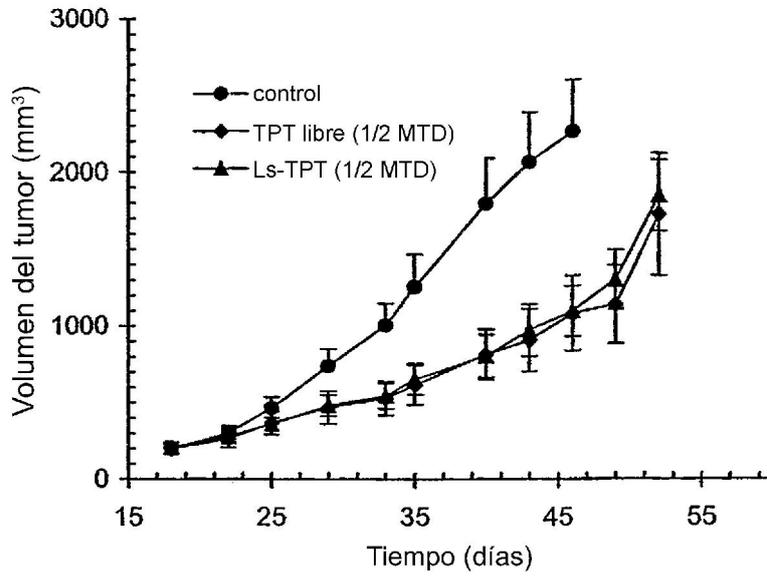


Figura 13C

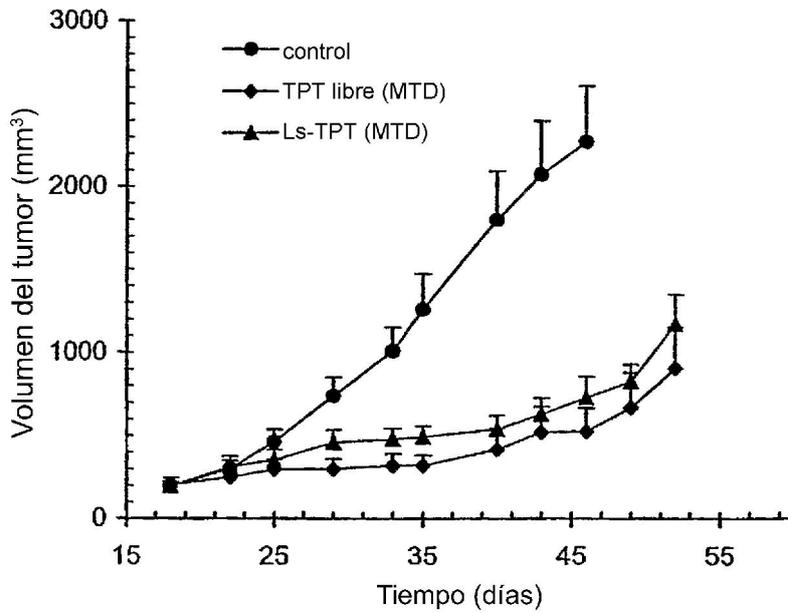


Figura 13D

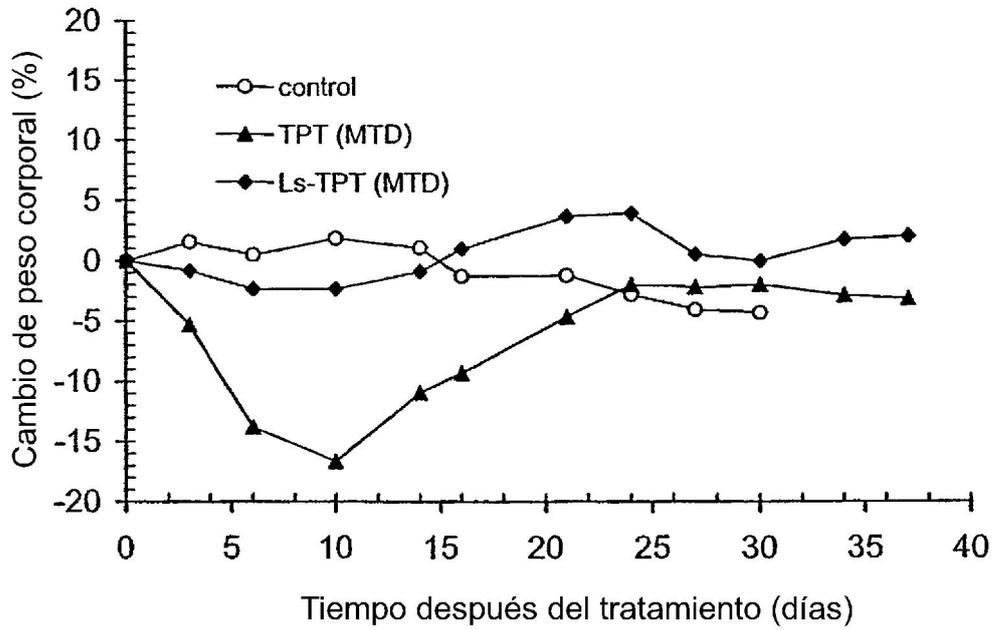


Figura 14

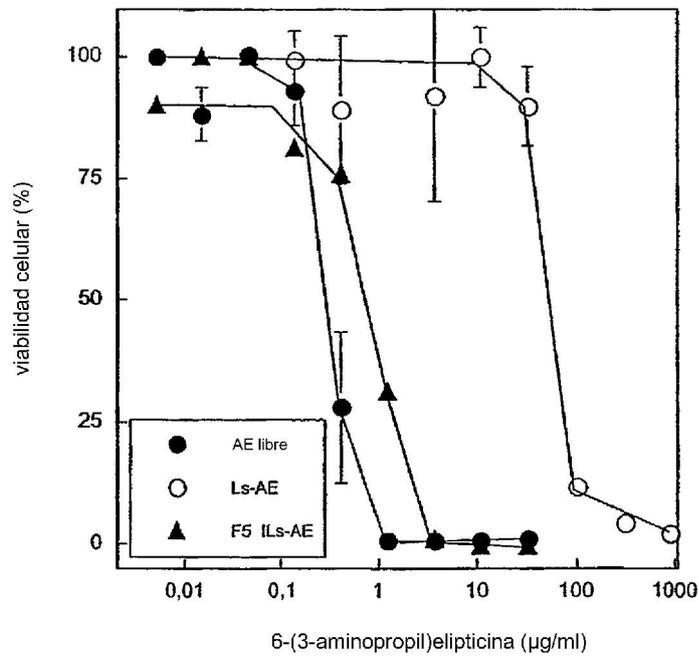


Figura 15

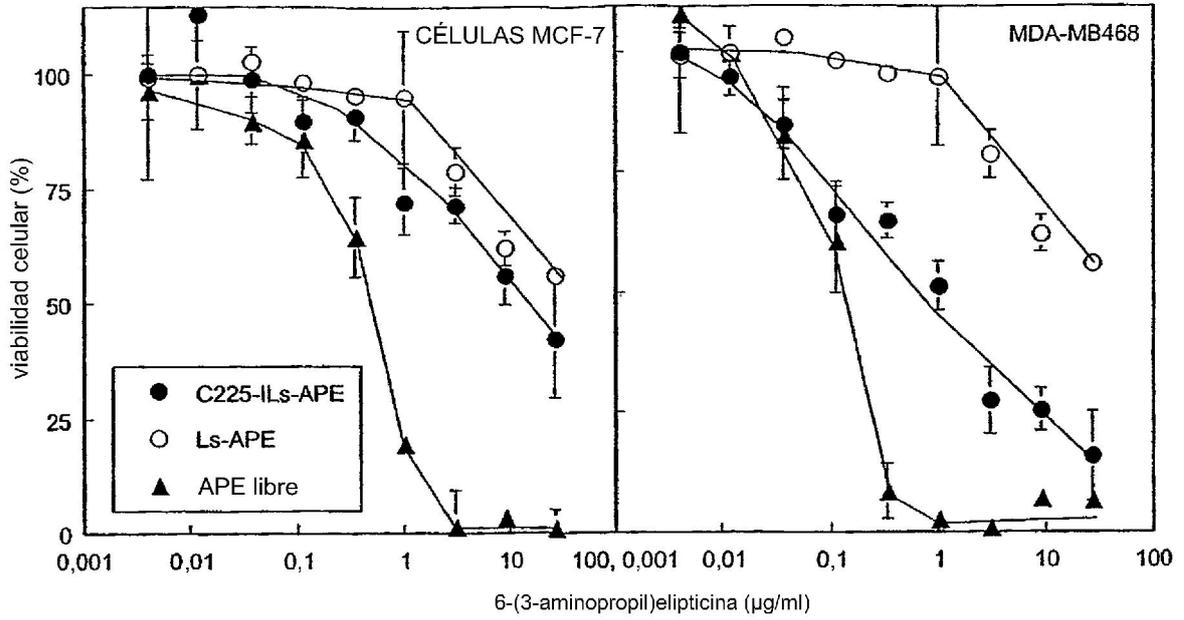


Figura 16

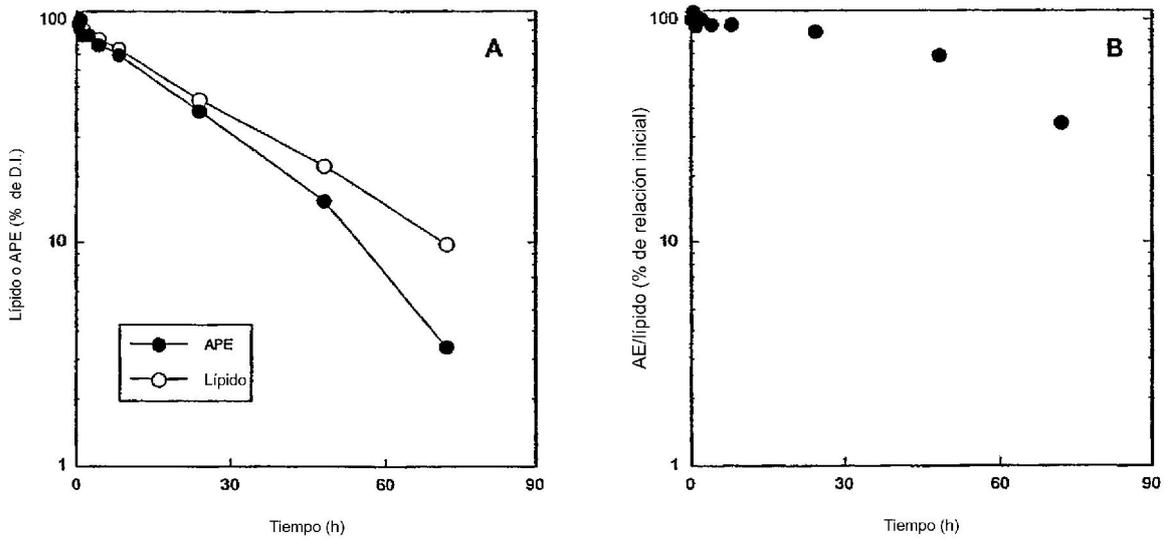


Figura 17

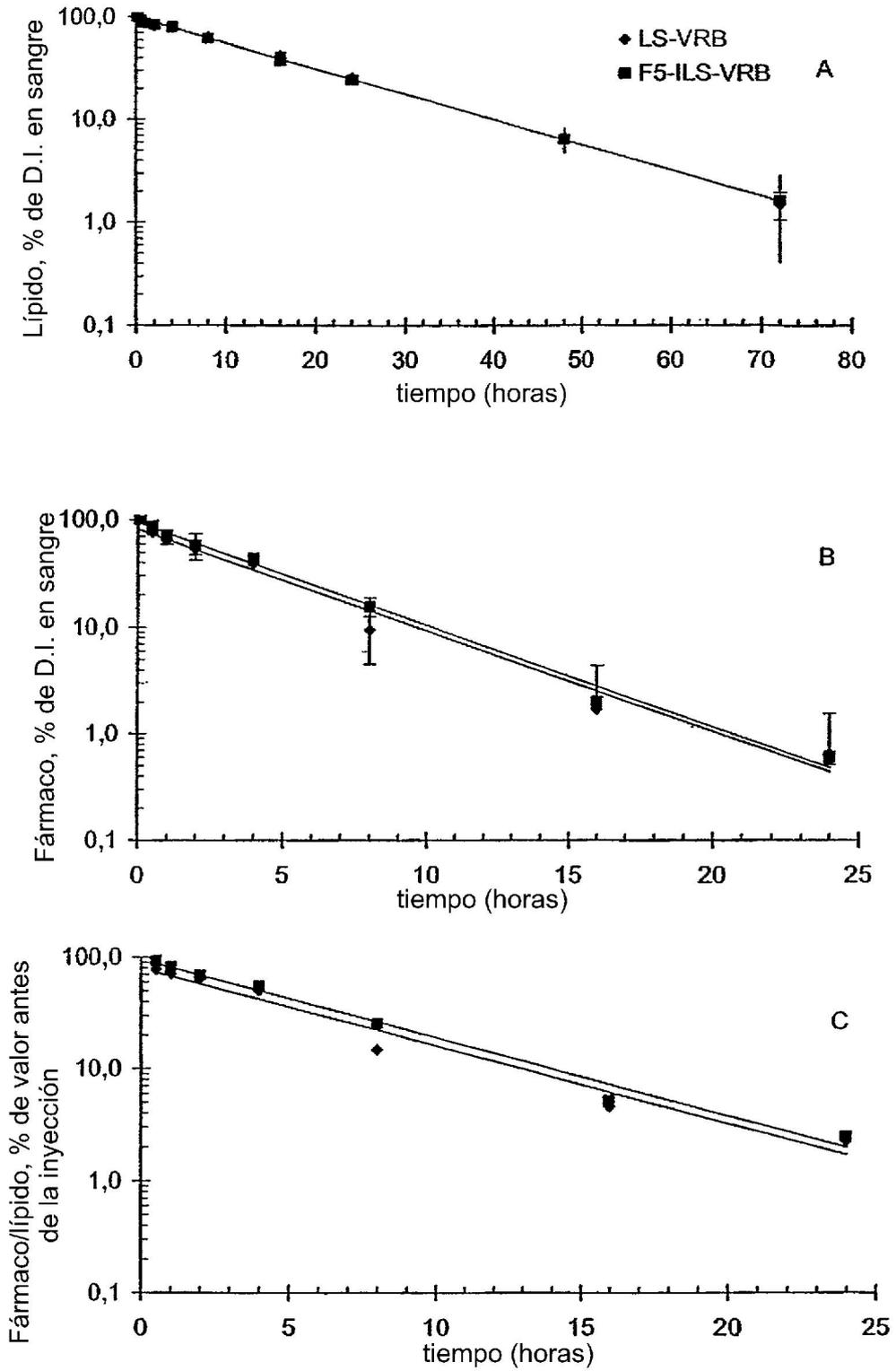


Figura 18

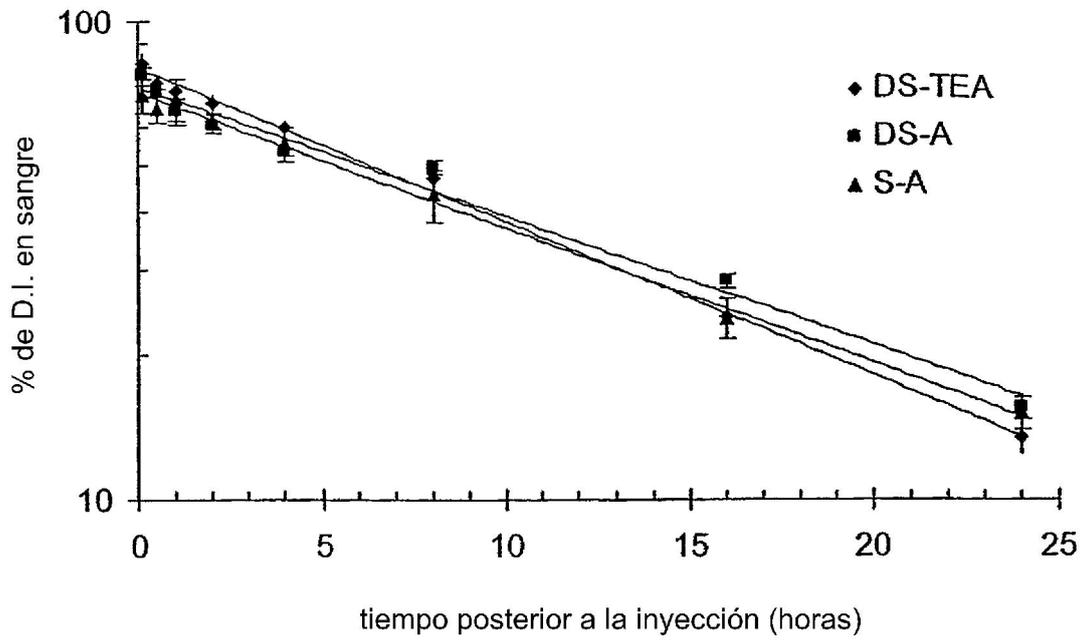


Figura 19

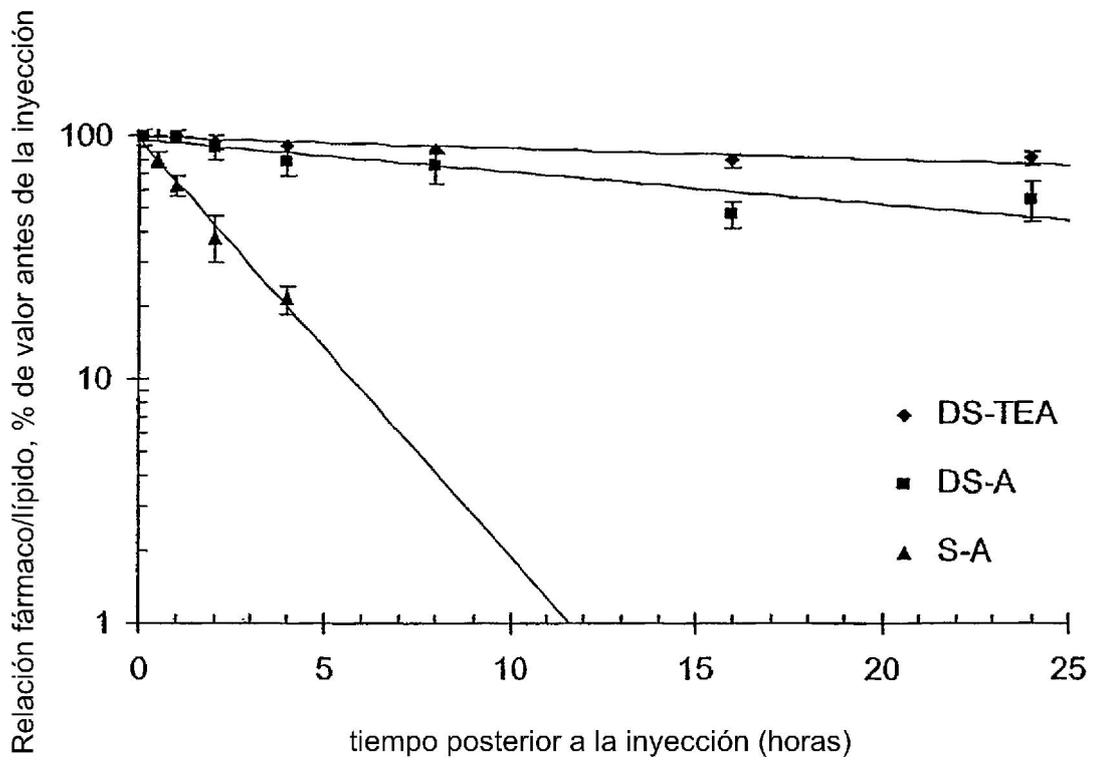


Figura 20

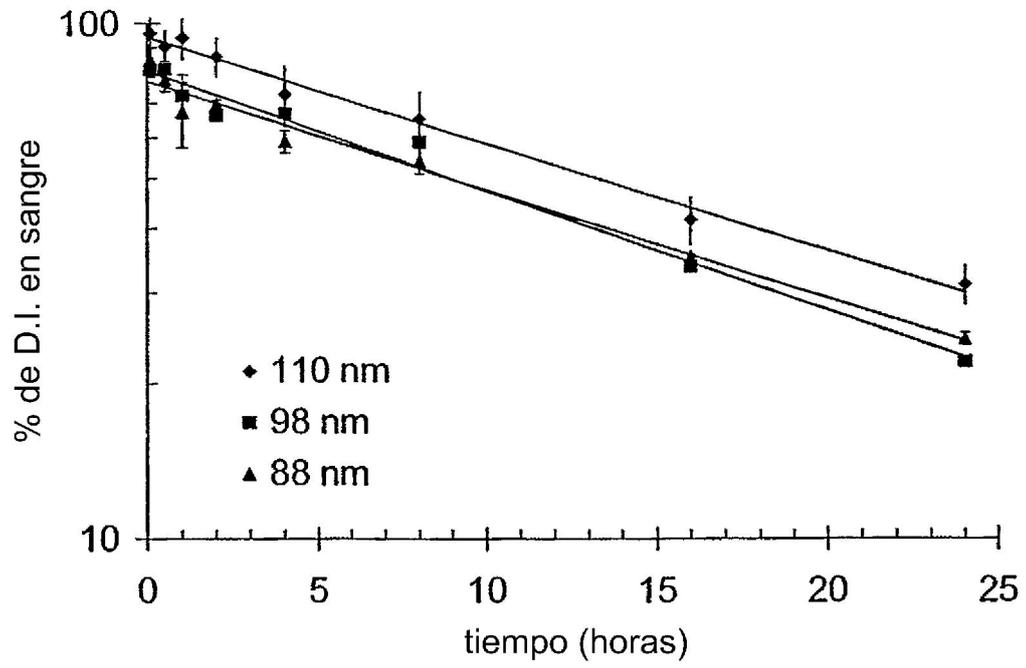


Figura 21

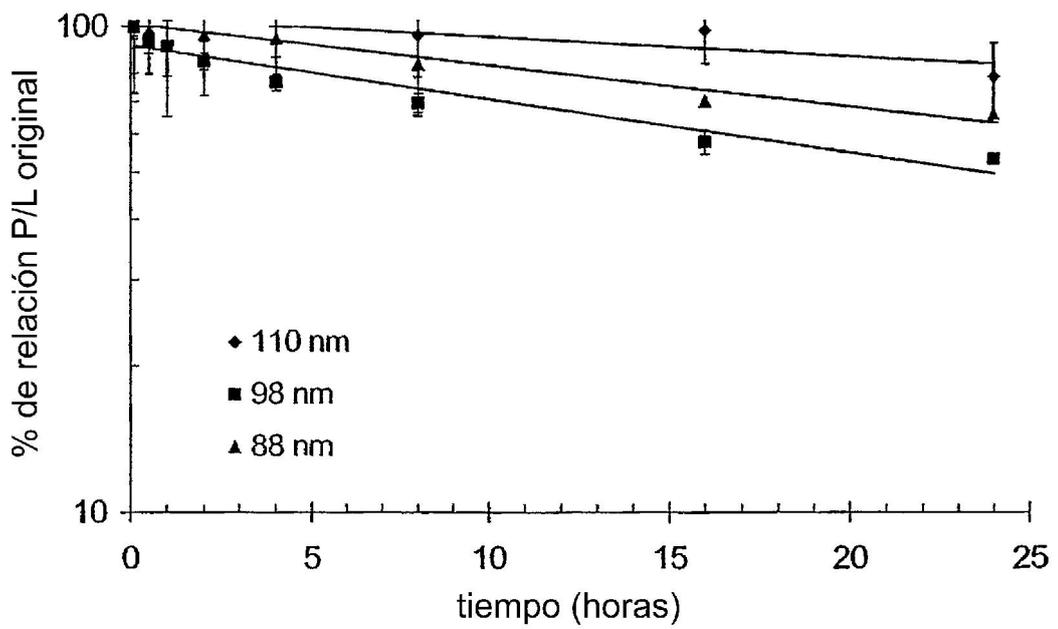


Figura 22

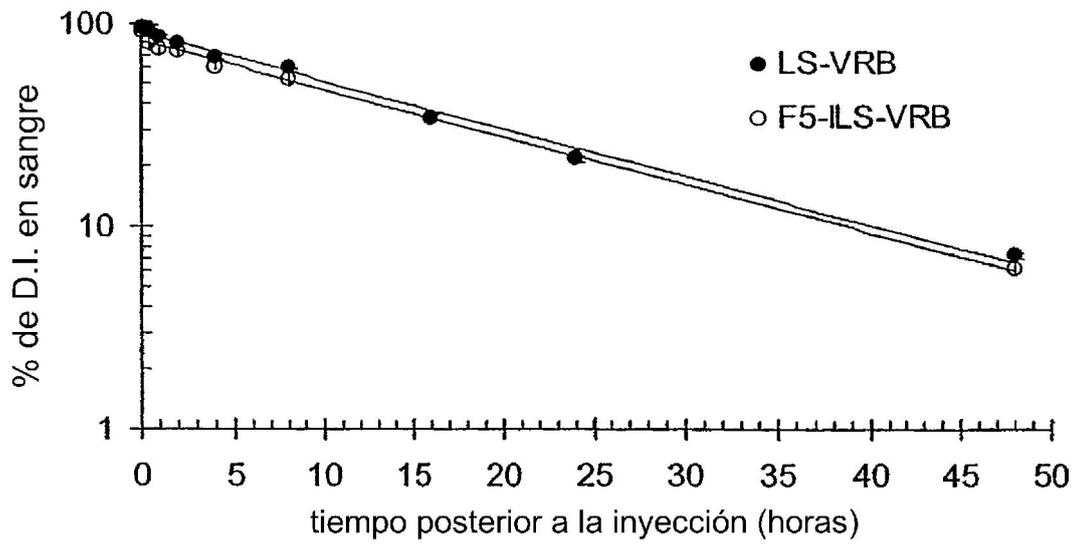


Figura 23

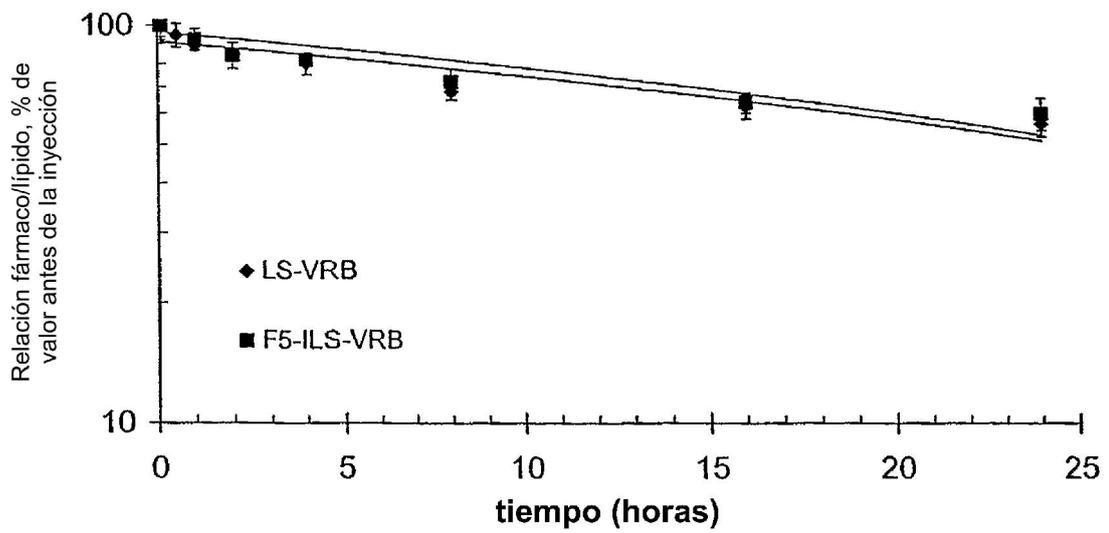


Figura 24

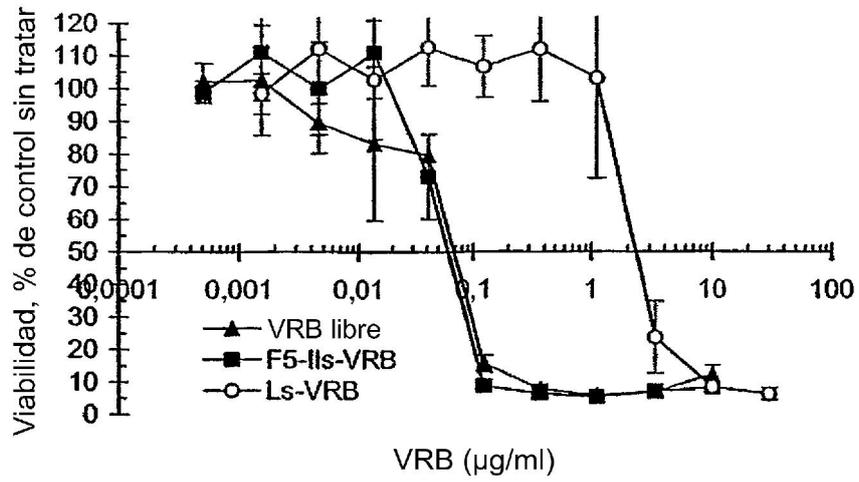


Figura 25

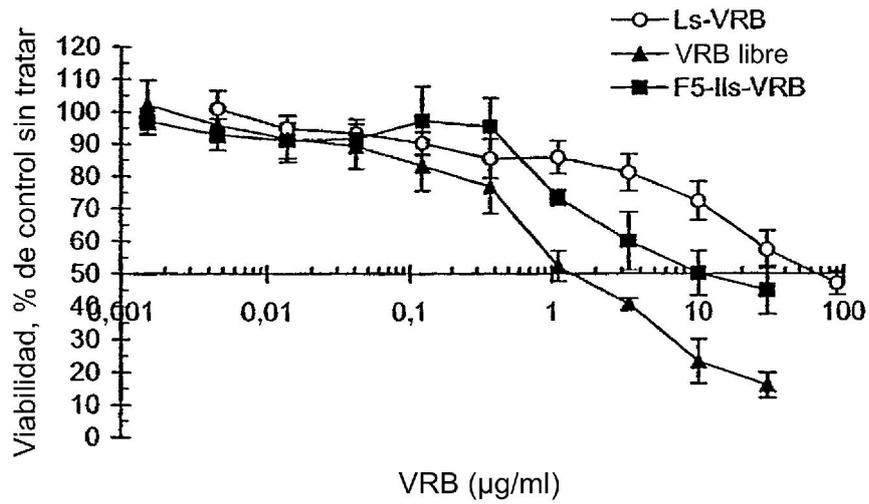


Figura 26

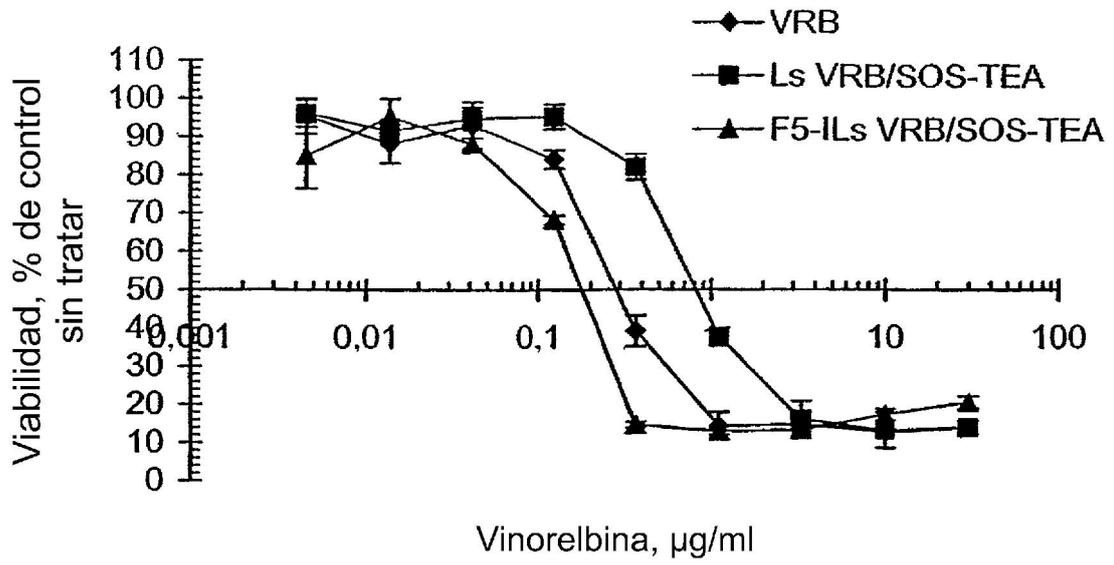


Figura 27

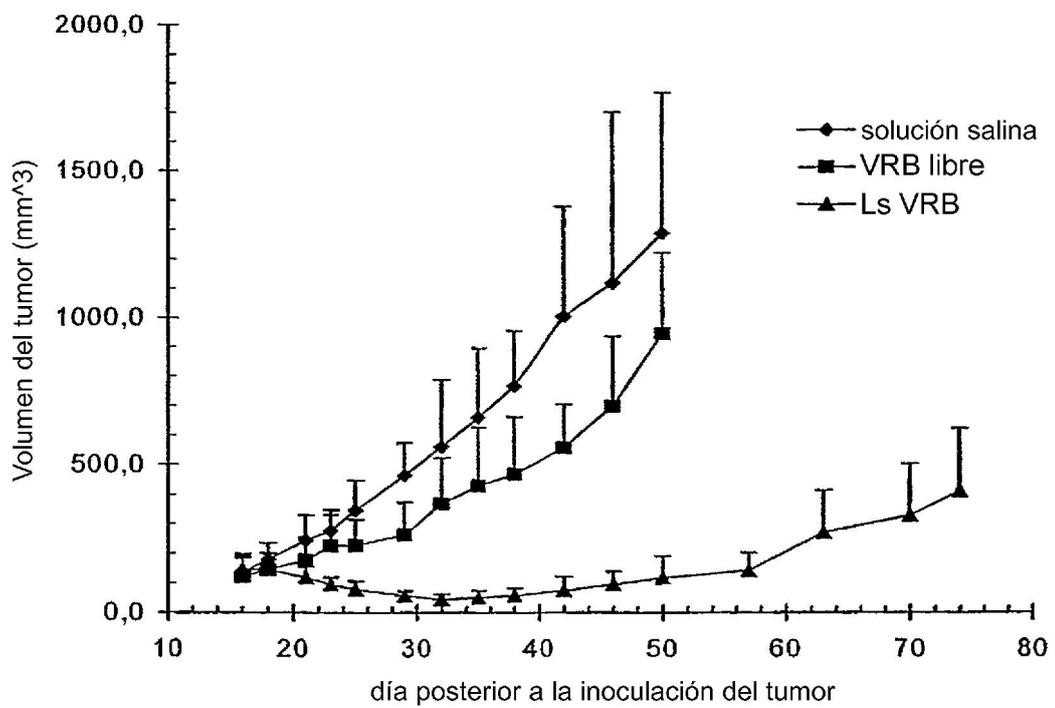


Figura 28

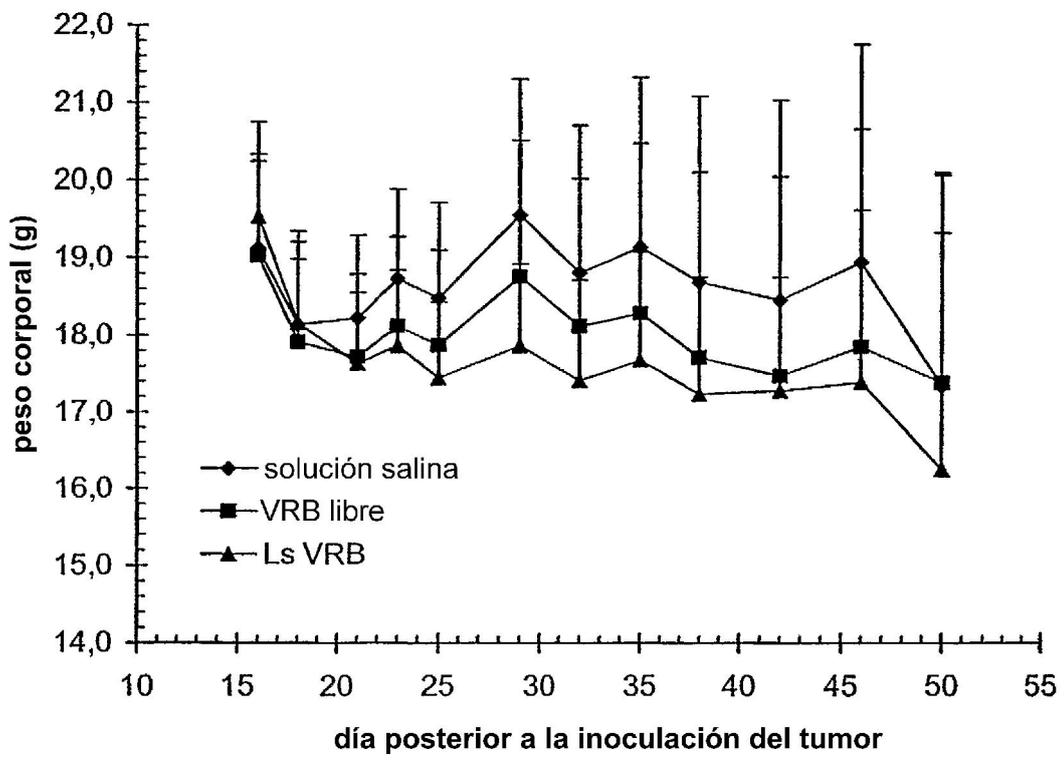


Figura 29

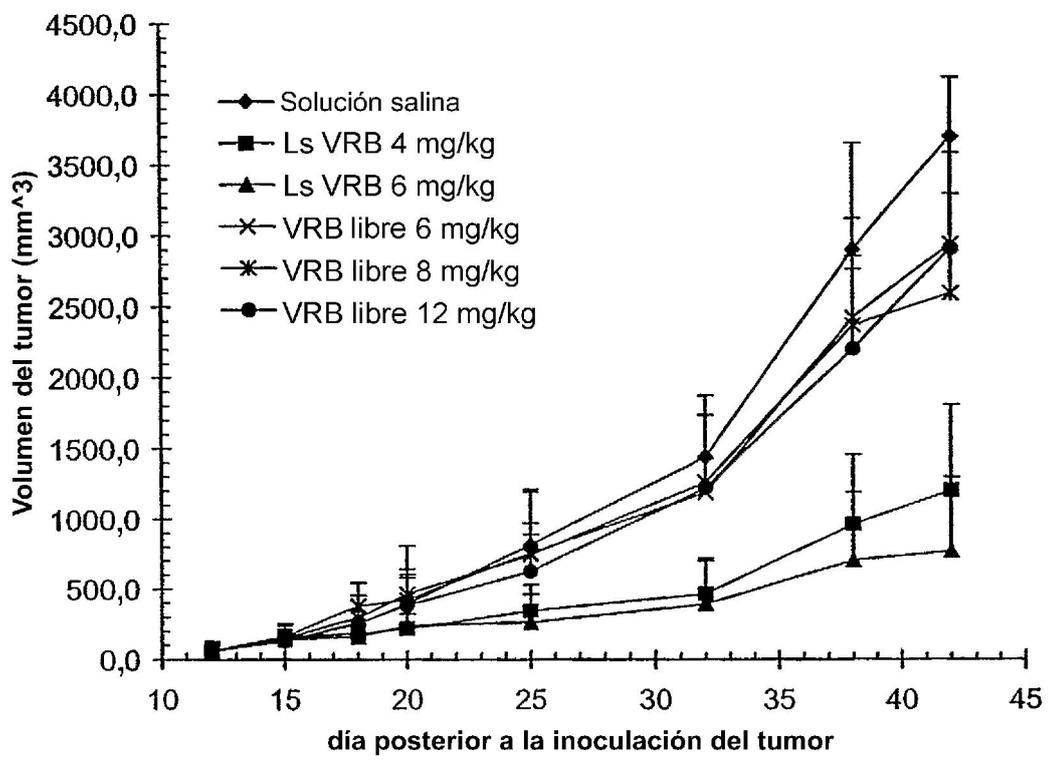
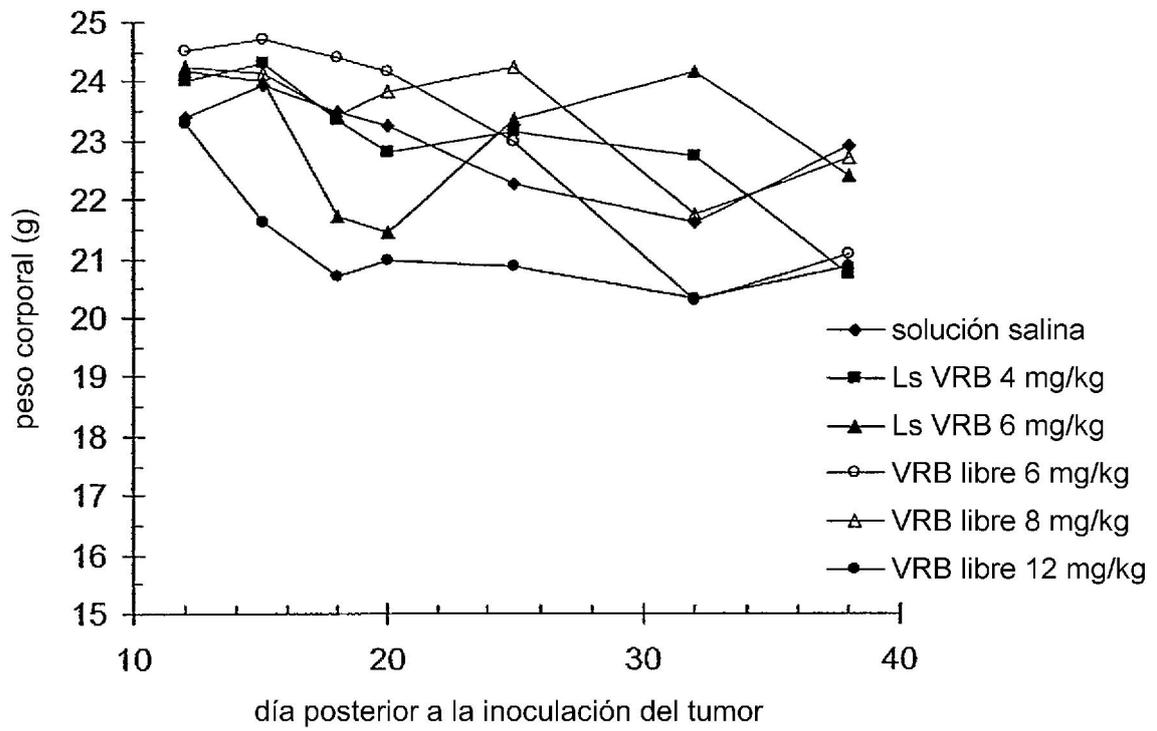


Figura 30



**Figura 31**

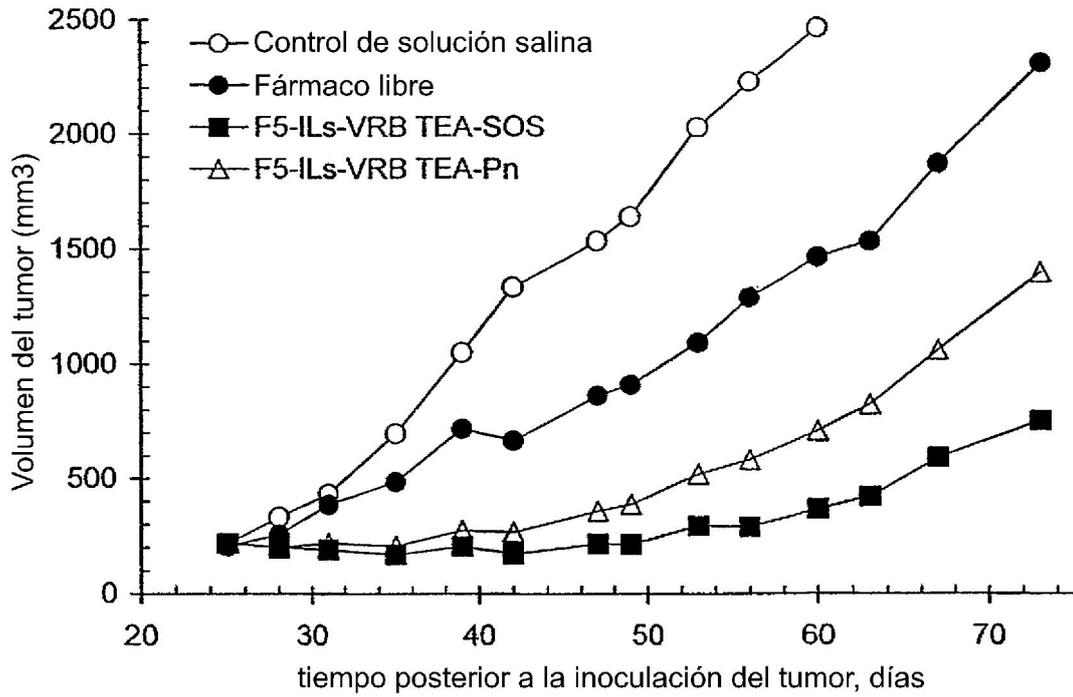


Figura 32

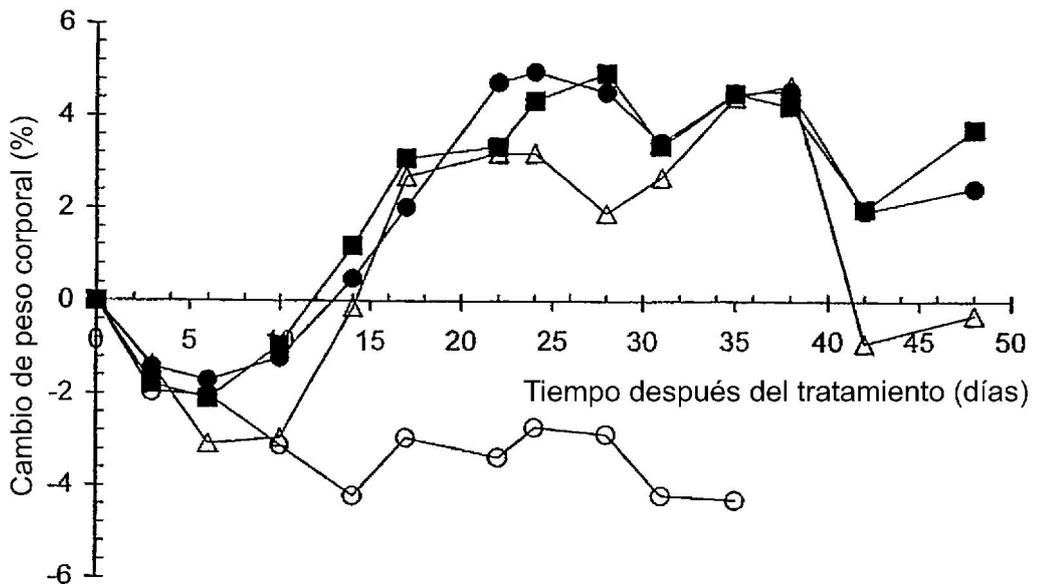


Figura 33

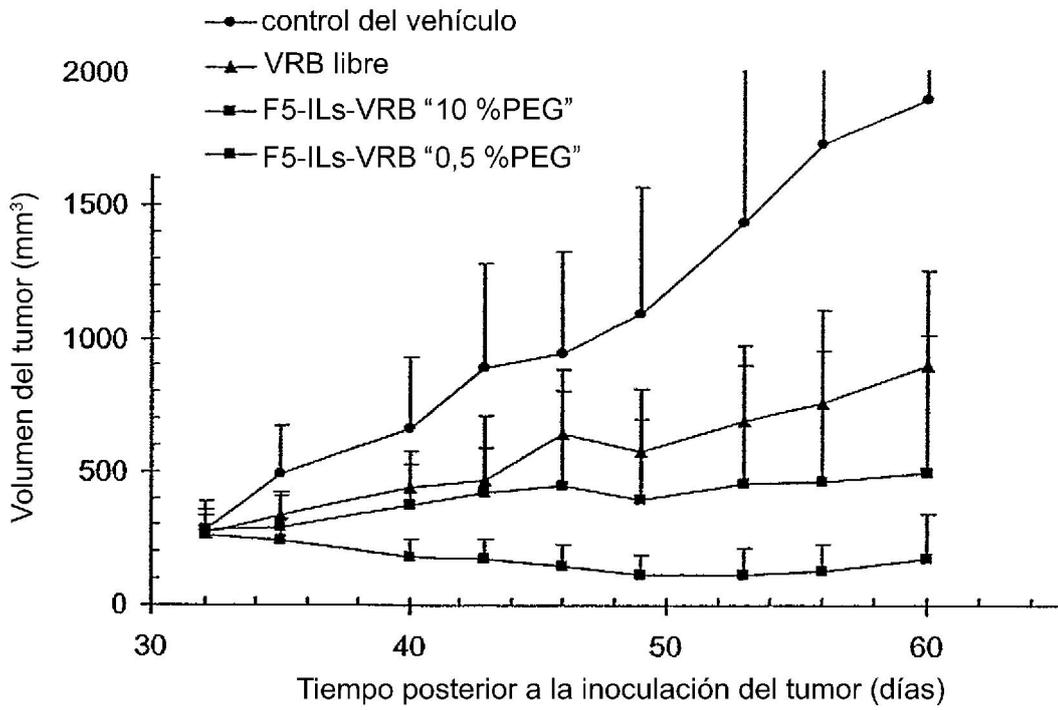


Figura 34

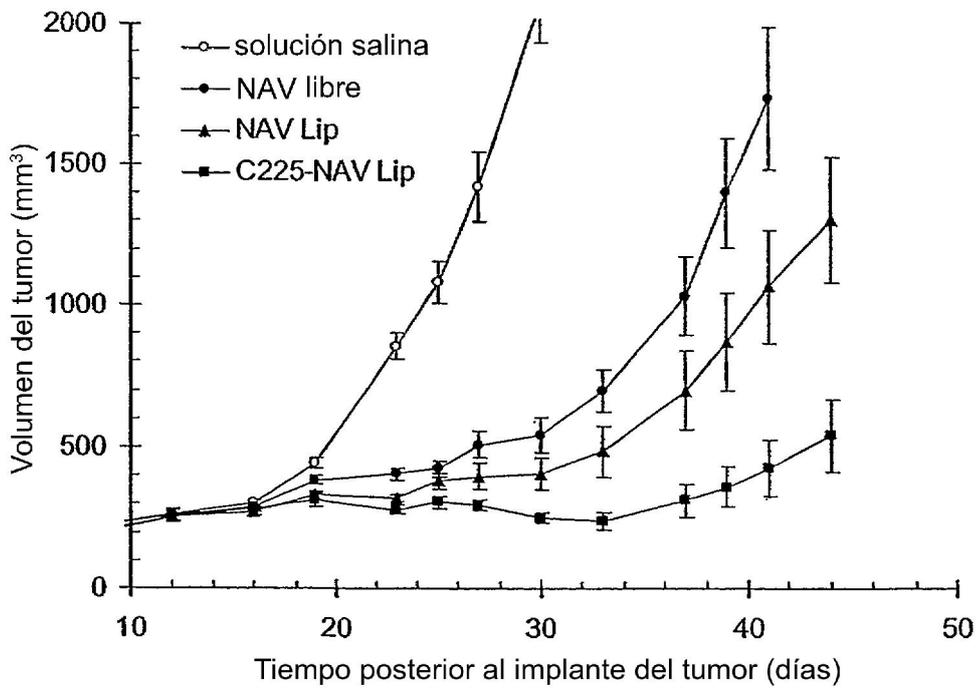
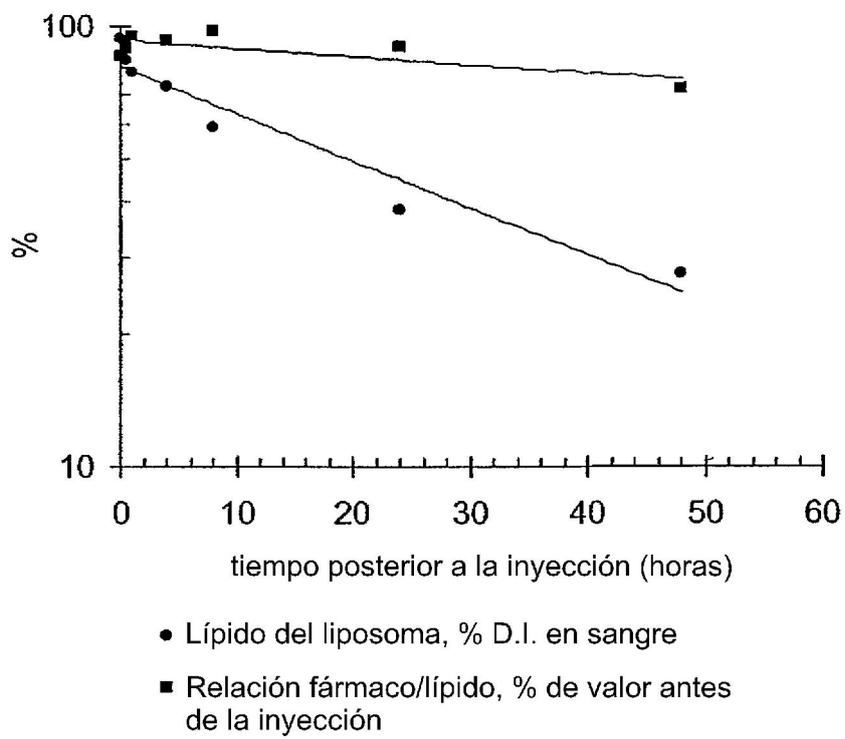


Figura 35



**Figura 36**

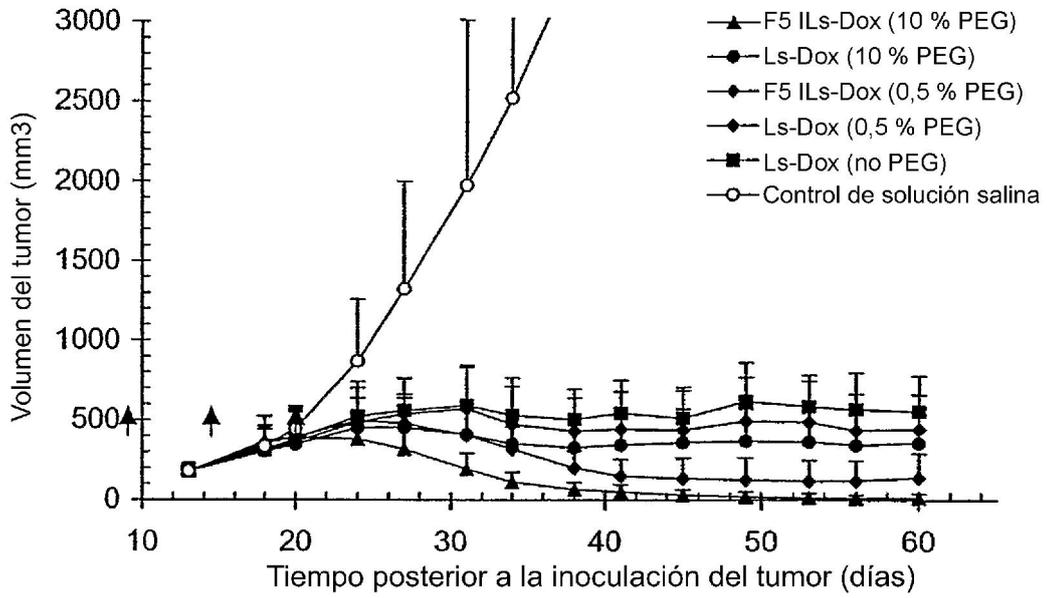


Figura 37

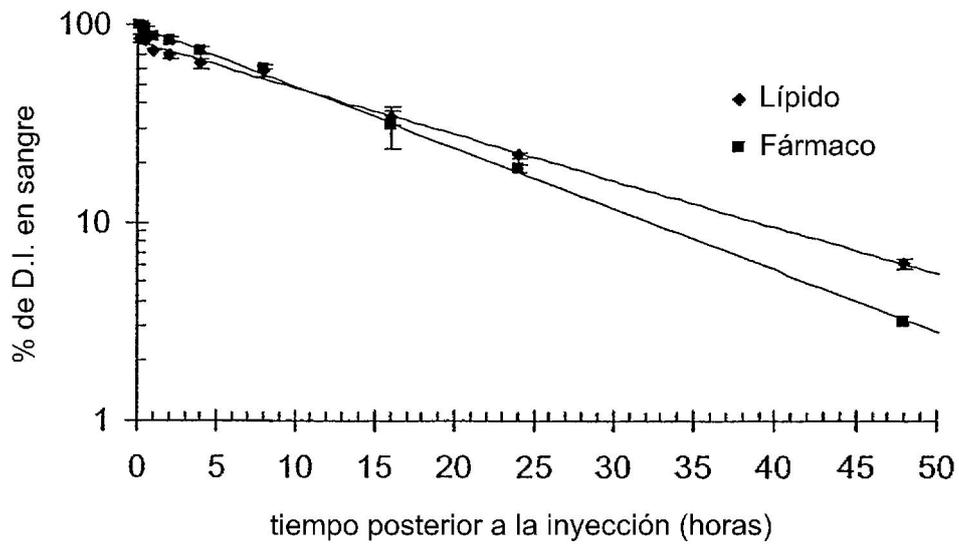


Figura 38

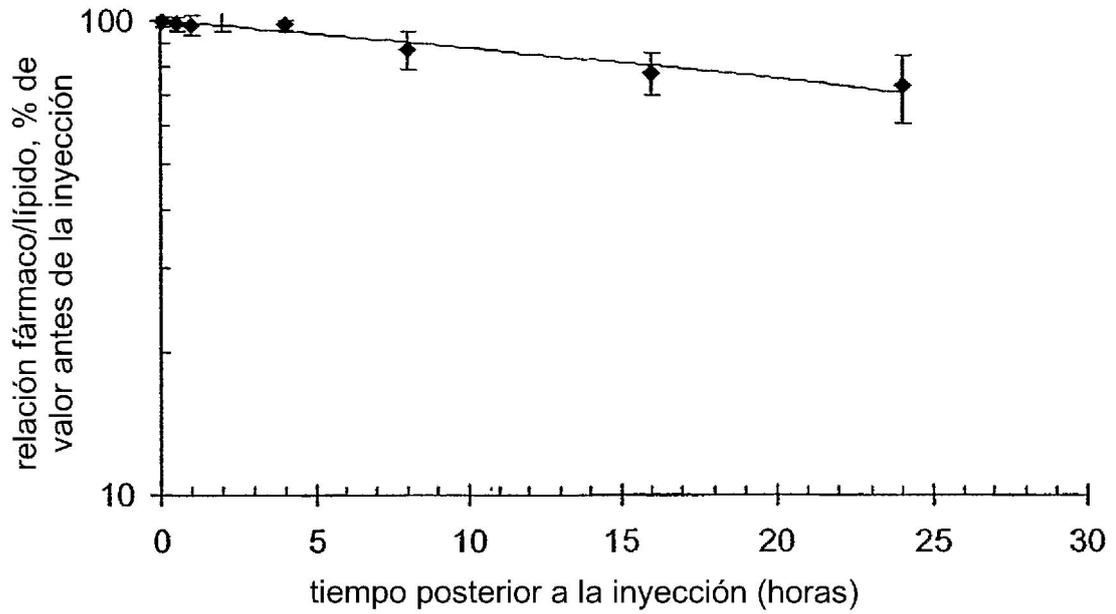


Figura 39

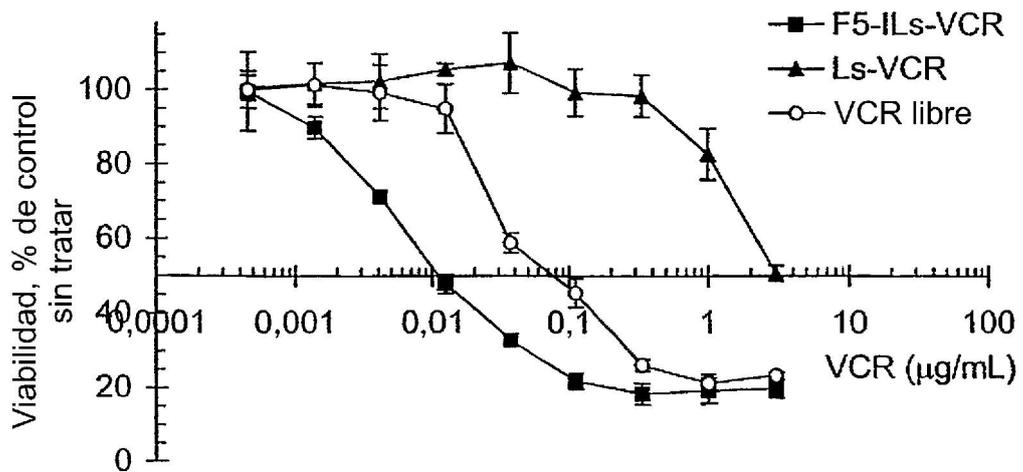


Figura 40

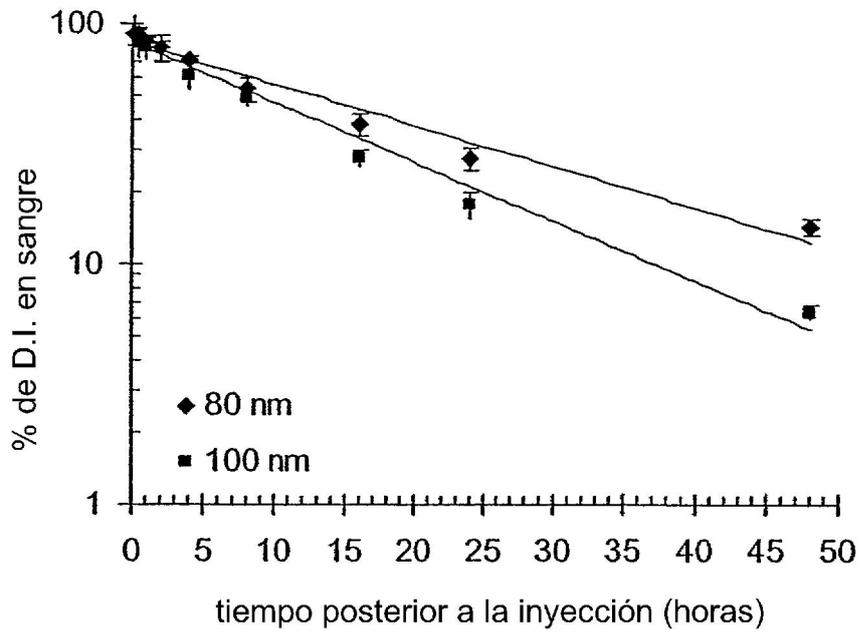


Figura 41

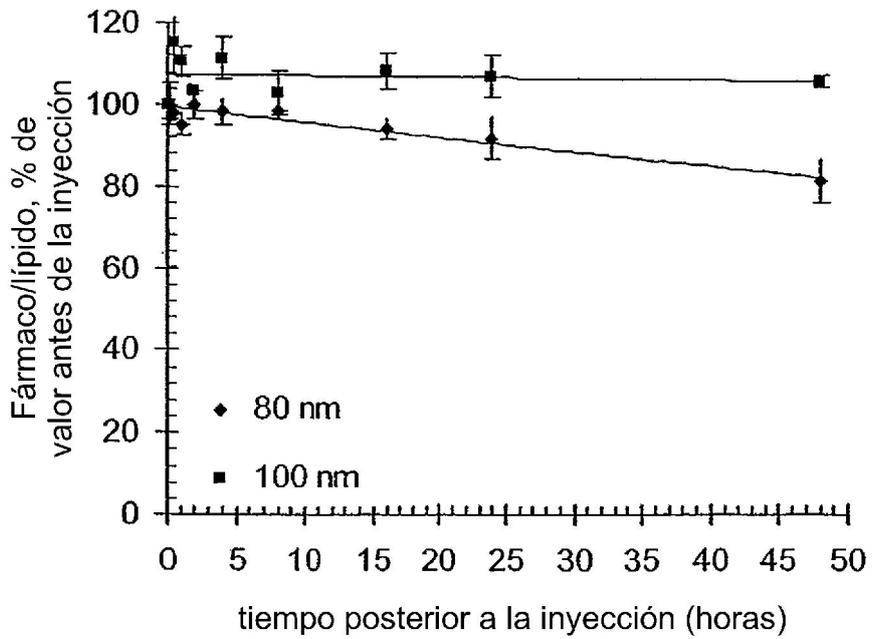


Figura 42

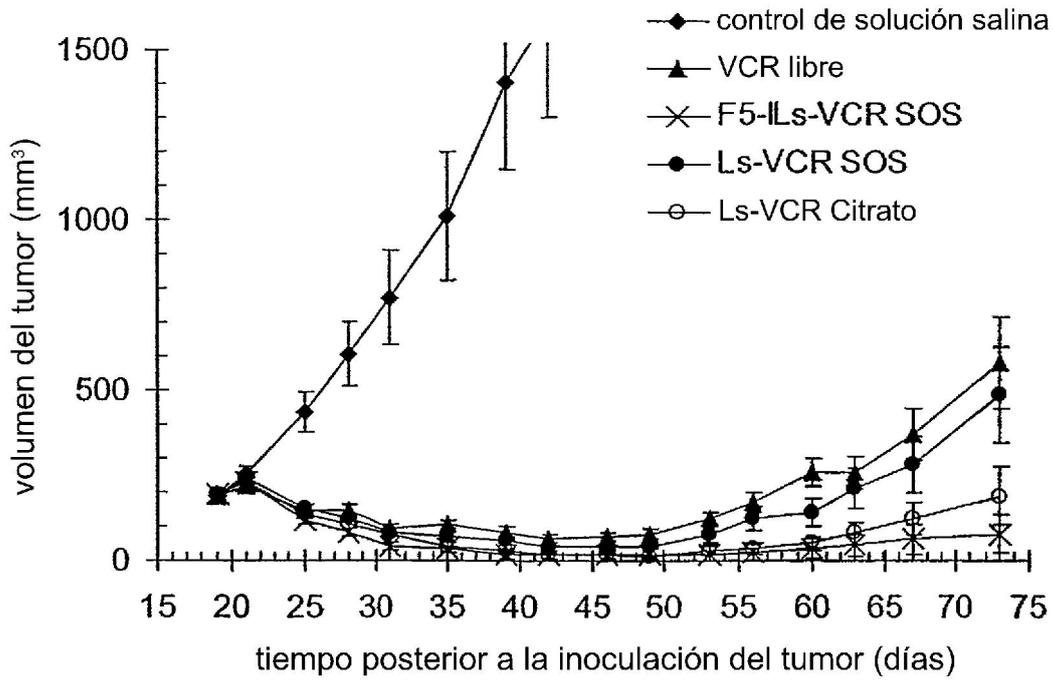


Figura 43

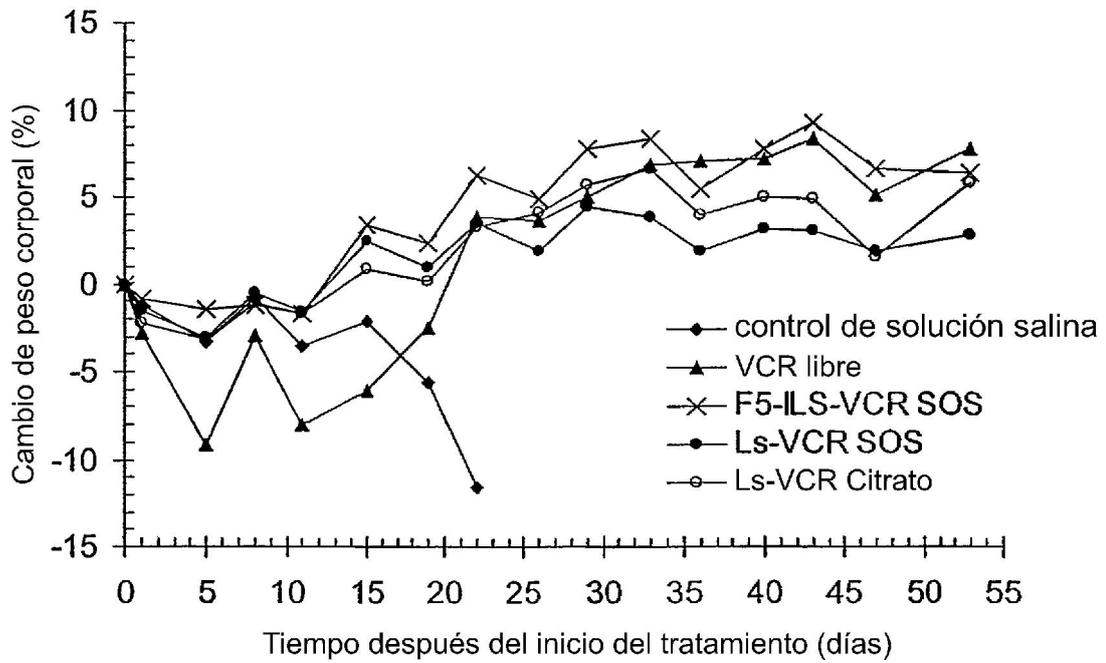


Figura 44

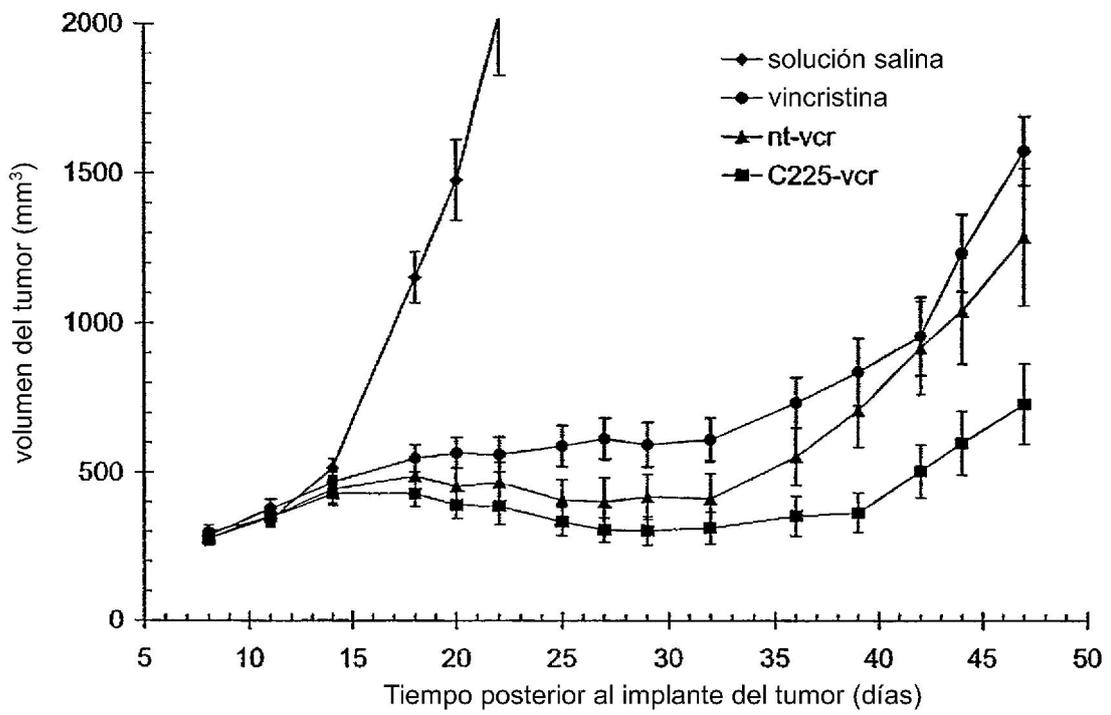
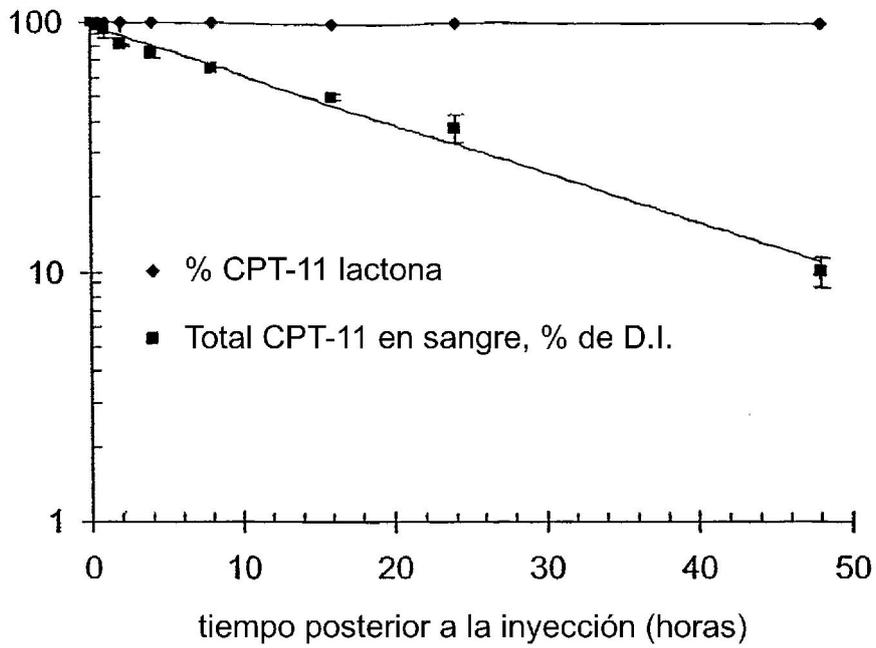
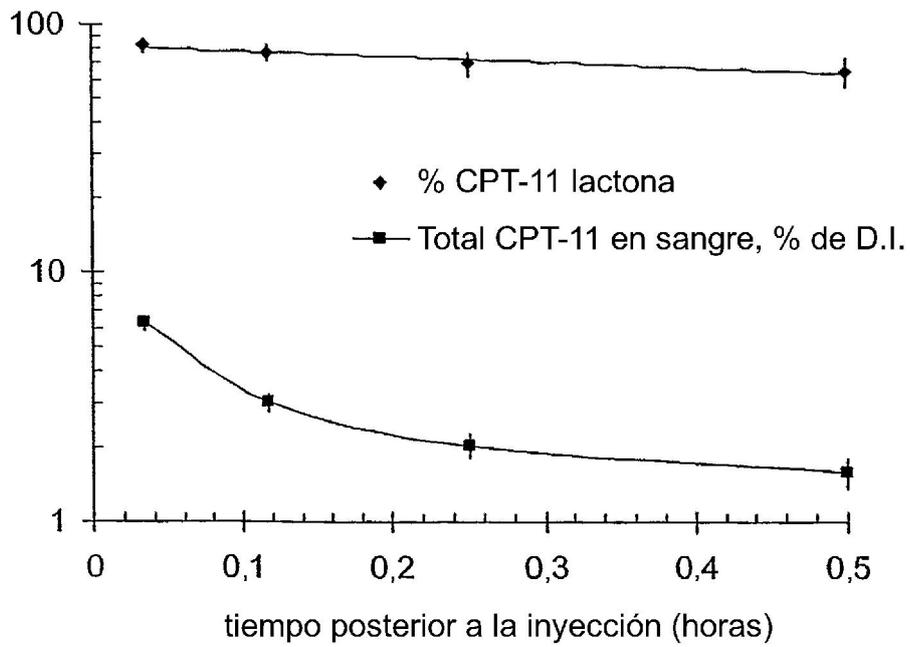


Figura 45



**Figura 46**



**Figura 47**