

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 033**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 31/475 (2006.01)

A61K 31/724 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2010 PCT/CN2010/078115**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11050710**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2010 E 10826073 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2494960**

54 Título: **Liposoma que tiene una fase acuosa interna que contiene sal de sulfobutil éter ciclodextrina**

30 Prioridad:

26.10.2009 CN 200910075783

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

24.04.2018

73 Titular/es:

**CSPC ZHONGQI PHARMACEUTICAL
TECHNOLOGY (SHIJIAZHUANG) CO., LTD.
(100.0%)**

**No. 276 Zhongshan West Road Shijiazhuang
Hebei 050051, CN**

72 Inventor/es:

**LI, CHUNLEI;
ZHANG, LAN;
WANG, CAIXIA;
ZHANG, LI;
SHEN, DONGMIN;
LI, YANHUI;
XIU, XIAN;
LIANG, MIN y
LI, YONGFENG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 665 033 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Liposoma que tiene una fase acuosa interna que contiene sal de sulfobutil éter ciclodextrina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un liposoma que tiene una fase acuosa interna que contiene sal de sulfobutil éter ciclodextrina, a métodos para fabricar el liposoma y al uso del mismo en preparar un medicamento para el tratamiento de enfermedades tumorales.

10

Antecedentes de la invención

Como un portador para fármacos, un liposoma tiene las características tales como aumentar la eficacia terapéutica, reducir los efectos adversos, administración dirigida, y liberación retrasada. Especialmente donde se usa un liposoma como el portador de un fármaco antitumoral, el fármaco se puede administrar de forma dirigida al área del tumor y, por tanto, tiene toxicidad reducida y eficacia aumentada.

Hay muchos fármacos antitumorales en aplicación clínica que se pueden categorizar en 5 grupos: agentes citotóxicos, hormonas, modificadores de la respuesta biológica, anticuerpos monoclonales y otros fármacos antitumorales. Entre ellos, los agentes citotóxicos captan la mayor cuota del mercado, y se pueden categorizar en 5 grupos según el mecanismo de acción: (1) fármacos que actúan sobre la estructura química del ADN, tal como agentes alquilantes y compuestos de platino; (2) fármacos que modifican la síntesis de ácidos nucleicos, tal como metotrexato y fluorouracilo; (3) fármacos que actúan sobre la transcripción de ácidos nucleicos, tal como doxorubicina y epidoxorubicina; (4) fármacos que actúan sobre la síntesis de tubulina, tal como taxanos y alcaloides de la vinca; fármacos que actúan sobre topoisomerasa, tal como camptotecina; (5) otros fármacos citotóxicos. Entre ellos, los fármacos de los grupos (2) y (4) son de carácter específico del ciclo celular, solo pueden destruir células en un periodo específico del ciclo de proliferación de la célula tumoral maligna. Vinorelbina y topotecán son de los grupos y se investigan intensamente en la presente invención.

Es necesario controlar la liberación del fármaco del liposoma con el fin de reducir la toxicidad y aumentar la eficacia, donde el fármaco antitumoral con carácter específico del ciclo celular se prepara en liposomas. En caso de liberaciones de fármacos demasiado rápidas del liposoma, se provocarán los siguientes resultados: (1) parte del fármaco se libera del liposoma antes de alcanzar el área del tumor y se depura de la sangre demasiado rápidamente para alcanzar el área del tumor; (2) en vista de que las células tumorales están en diferentes periodos de crecimiento al mismo tiempo, el fármaco que alcanza el área del tumor no puede destruir células fuera de periodos específicos, lo que induce exposición muy reducida del fármaco a las células tumorales y tiene mala eficacia terapéutica, pero induce una respuesta tóxica de tejidos normales. De esta manera es importante controlar la liberación del fármaco del liposoma especialmente para los fármacos con carácter específico del ciclo celular.

La liberación del fármaco liposómico está influida por factores diversificados incluyendo el tamaño de partícula, composición de la membrana lipídica, fase acuosa interna y métodos de carga del fármaco, entre otros. Los métodos de carga del fármaco incluyen carga del fármaco activa y carga del fármaco pasiva. La carga del fármaco pasiva en general es adecuada para fármacos liposolubles, mientras que la carga del fármaco activa en general es adecuada para fármacos solubles en agua. Puesto que vinorelbina y topotecán son ambos fármacos alcaloscentes débiles solubles en agua, se elige carga de fármaco activa para preparar sus liposomas. Se usan comúnmente en la técnica tres métodos de carga de fármaco activa: método del gradiente de pH, método del gradiente de sulfato de amonio y método del gradiente de complejación.

(1) Método del gradiente de pH:

Este método es inventado por investigadores canadienses en la década de 1980. Descubrieron que los alcaloides farmacéuticos tal como doxorubicina se podrían transportar activamente y agregar específicamente en liposomas en presencia de un gradiente de pH. La primera cosa en el proceso de preparación es elegir el tampón de la fase acuosa interna y el tampón de la fase externa, que es crítico ya que los tampones determinan directamente la estabilidad del fármaco en almacenamiento y la liberación del fármaco *in vivo*. Se forma un liposoma vacío por hidratación con el tampón de la fase acuosa interna. El liposoma vacío así obtenido se procesa adicionalmente para reducir el tamaño de partícula dentro de un intervalo deseado. A continuación, la fase externa del liposoma se puede sustituir usando los medios técnicos tal como diálisis de flujo cruzado, cromatografía en columna y modulación de pH, de modo que se forme un gradiente de pH entre las fases transmembrana externa e interna. La carga del fármaco se puede lograr a una temperatura apropiada después de que se forme el gradiente transmembrana.

El gradiente transmembrana de pH también se puede formar usando un ionóforo. Durante la preparación del liposoma vacío, una sal de ion divalente, tal como sulfato de manganeso, se encapsula en el liposoma, y después la fase externa del liposoma se sustituye por un tampón que contiene un ionóforo, tal como A23187 y EDTA. El ionóforo puede transportar específicamente ion divalente al exterior de la membrana y transportar H⁺ al interior del

liposoma. El uso del método anterior también puede formar un gradiente de pH entre el interior y el exterior de la membrana.

5 El mecanismo de carga de fármaco por gradiente de pH se ha investigado intensamente. Entre 3 preparaciones de liposomas de antraciclina disponibles en el mercado, 2 preparaciones se preparan por carga de fármaco activa usando gradiente de pH.

(2) Método del gradiente de sulfato de amonio

10 El método del gradiente de sulfato de amonio es inventado por investigadores israelíes a principios de la década de 1990. El proceso de preparación en este método es similar a ese en el método de gradiente de pH tradicional. Primero, se prepara un liposoma vacío usando tampón sulfato de amonio. A continuación, el sulfato de amonio en la fase externa del liposoma se elimina por diálisis de flujo cruzado, entre otros, para formar un gradiente de sulfato de amonio entre el interior y el exterior de la membrana lipídica. Después la carga de fármaco se logra con la condición de calentamiento. Se confirma en la investigación inicial que la carga del fármaco por gradiente de sulfato de amonio puede estar relacionada con diferencia de pH entre el interior y el exterior de la membrana de fosfolípidos causada por la difusión transmembrana de amoniaco libre. Sin embargo, se muestra por deducción teórica estricta que la carga del fármaco usando el método del gradiente de sulfato de amonio puede ser un proceso complicado de difusión bidireccional, y la formación del gradiente de pH puede ser solamente uno de los factores.

20 La ventaja del método del gradiente de sulfato de amonio está en que el pH aproximadamente neutro de la solución acuosa de sulfato de amonio podría no inducir hidrolización de las moléculas de fosfolípido en exceso, porque se requiere una temperatura relativamente alta si se usa fosfolípido saturado para preparar el liposoma. El lípido es apto para hidrolizar cuando se usa el método del gradiente de pH tradicional. Además, la liberación de fármaco *in vivo* del liposoma preparado usando el método del gradiente de amonio puede ser diferente.

(3) Método del gradiente de complejación

30 En este método, se usa una sal de ion de metal de transición, tal como sulfato de cobre o sulfato de níquel, en el tampón de la fase acuosa interna para preparar el liposoma vacío. A continuación, el ion metálico fuera del liposoma se elimina por diálisis de flujo cruzado entre otros, para formar el gradiente de ion metálico entre el interior y el exterior de la membrana lipídica. Después la carga del fármaco se logra con la condición de calentamiento. El mecanismo de carga del fármaco es que el fármaco forma un complejo estable con el ion del metal de transición en la fase acuosa interna del liposoma y, por tanto, se retiene en el liposoma.

35 Sulfobutil éter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD) es un derivado ionizado de β -ciclodextrina (β -CD) desarrollado por Cydex de los EE UU en la década de 1990, que es el producto de la reacción de sustitución de β -CD con 1,4-butano sutona. La sustitución se puede producir en el grupo hidroxilo de la posición 2, 3, 6 en la unidad de glucosa de SBE- β -CD. SBE- β -CD es un excipiente farmacéutico excelente que tiene las ventajas tales como buena solubilidad en agua, baja nefrotoxicidad y baja hemólisis, y está licenciado por la FDA como un excipiente para inyección.

45 SBE- β -CD se ha usado hasta ahora para solubilización por inclusión de fármaco insoluble, y se ha usado mucho en varias formas farmacéuticas tales como inyección, formulación oral, formulación tópica, entre otras. Chakraborty usó SBE- β -CD para investigar la preparación liposómica de anfotericina B, con el fin de usar solubilización por inclusión del fármaco insoluble por SBE- β -CD (Therapeutic and hemolytic evaluation of in-situ liposomal preparation containing amphotericin-B complexed with different chemically modified β -cyclodextrins. J Pharm Pharmaceut Sci. 2003 Vol.6, No.2).

50 Wang Zhixuan & Deng Yingjie, *et al.* (Advances in liposome entrapped drug cyclodextrin complex delivery systems, Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2006 Vol.23) revisan investigaciones mundiales de complejo de fármaco y ciclodextrina atrapado en liposomas, que se prepara transformando el fármaco insoluble en complejo con ciclodextrina soluble en agua y atrapando el complejo en la fase acuosa interna del liposoma. Es difícil para fármacos insolubles entrar en la fase acuosa interna del liposoma, mientras que la complejación-inclusión por ciclodextrina aumenta la solubilidad en agua del fármaco insoluble y, por tanto, es fácil atrapar el fármaco en el liposoma. El fin principal de transformar el fármaco en complejo fármaco ciclodextrina atrapado en el liposoma es aumentar la solubilidad del fármaco insoluble y por tanto la carga de fármaco.

60 Como fármacos de primera línea en terapia antitumoral, las preparaciones liposómicas de vinorelbina y topotecán se han investigado intensamente. Ahora la carga de fármaco de vinorelbina y topotecán liposómicos ha sido investigada por muchos grupos de investigación. Sin embargo, surgen algunos problemas tal como los siguientes:

65 La empresa Inex de Canadá logra la carga del fármaco usando esfingomielina y colesterol en una proporción molar de 55:45 como membrana lipídica, usando solución de sulfato de magnesio como fase acuosa interna para preparar un liposoma vacío, después transportando el ion magnesio fuera de la membrana liposómica a través del ionóforo A23187 y transportando H^+ al interior del liposoma y generando de esta manera un gradiente de pH. La vinorelbina liposómica así obtenida tiene un índice de encapsulación de más del 90%, y es estable cuando se almacena a 2-8°C

durante un año (Optimization and characterization of a sphingomyelin/cholesterol liposome formulation of vinorelbine with promising antitumor activity. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005 Vol.94 No.5.)

5 Un grupo de investigación canadiense liderado por Bally usa 2 métodos y obtiene liposomas de topotecán que tienen un alto índice de encapsulación. En el primer método, se usan DSPC y colesterol como membrana lipídica, solución de sulfato de manganeso como fase acuosa interna para preparar el liposoma vacío. Después se forma el gradiente de pH usando el ionóforo A23187 y lo logra la carga del fármaco. El mecanismo de este método es similar al usado por la empresa Inex. El segundo método usa DSPC y colesterol como membrana lipídica, solución de sulfato de cobre como fase acuosa interna para preparar el liposoma vacío. Sin embargo, la carga de topotecán se logra sin 10 añadir A23187, porque se forma un complejo estable entre el ion cobre y topotecán. El principio usado aquí es justo el método de gradiente de complejación como se ha descrito anteriormente. La desventaja de este método es que el ion metálico restante en la formulación puede producir efecto tóxico en la sangre (An evaluation of transmembrane ion gradient-mediated encapsulation of topotecan within liposomes. Journal of Controlled Release. 96 (2004); Copper-topotecan complexation mediates drug accumulation into liposomes. Journal of Controlled Release. 114 (2006)). 15

Investigadores de los EE UU usan diestearoil fosfatidilcolina (DSPC), colesterol y conjugado diestearoil fosfatidiletanolamina-metoxil-polietilenglicol (DSPE-mPEG) como membrana lipídica, usan sal de trietilamina (TA) de octasulfato de sacarosa como la fase acuosa interna para preparar el liposoma vacío. Después el octasulfato de 20 sacarosa TA se elimina usando diálisis de flujo cruzado, entre otros, para formar un gradiente de octasulfato de sacarosa TA, y la carga del fármaco se logra. El principio es sustantivamente idéntico al usado en el método del gradiente de sulfato de amonio. Sin embargo, cada molécula de octasulfato de sacarosa tiene 8 grupos ácidos y puede formar un complejo estrecho con vinorelbina y, por tanto, vinorelbina se retiene bien. La semivida en plasma del liposoma de vinorelbina así obtenido es hasta 9,2 horas (Improved pharmacokinetics and efficacy of a highly stable nanoliposomal vinorelbine. The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2009 Vol.328 No.1.). 25 La preocupación sería en este método es que el octasulfato de sacarosa es fisiológicamente activo y activa el factor de crecimiento de fibroblastos in vivo (Structural basis for activation of fibroblast growth factor signaling by sucrose octasulfate. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Oct. 2002, Vol. 22, No. 20), e induce una serie de efectos fisiológicos. Por tanto, el uso de octasulfato de sacarosa como excipiente para inyección puede tener un gran riesgo. 30

La empresa Alza de los EE UU usa fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), colesterol y DSPE-mPEG como membrana lipídica, usa polímero polianiónico, tal como sulfato de dextrano, sulfato de proteoglicano y sulfato de 35 celulosa, en la fase acuosa interna. Después se usa diálisis de flujo cruzado para sustituir la fase externa y formar un gradiente de polímero, y se logra la carga del fármaco. El principio es similar al usado en el método del gradiente de sulfato de amonio. Este método tiene el fin de formar un complejo estrecho de polímero polianiónico con topotecán, y por tanto el fármaco se retiene bien. La desventaja de este método también es que los polímeros polianiónicos son fisiológicamente activos y difíciles de ser metabolizados in vivo, de modo que su seguridad se debe investigar más (Liposome-entrapped topoisomerase inhibitors. Documento US6465008B1). 40

Se sabe de lo anterior que las investigaciones de liposomas de fármacos alcalinos débiles, tal como vinorelbina y topotecán se enfocan en el método del gradiente de pH, método del gradiente de sulfato de amonio general y método del gradiente de complejación. Sin embargo, solo se ensayan en laboratorio y los materiales usados tienen riesgos de seguridad: (1) la sal polianiónica, tal como la sal de trietilamina de octasulfato de sacarosa y polímero sulfato, usada en las investigaciones anteriores son todas fisiológicamente activas, y no cumplen el requisito de que 45 un excipiente debe ser inactivo de fisiología y de farmacología; (2) el ion cobre, ion níquel, ion manganeso usados en el método del gradiente de complejación anterior son todos iones de metales pesados, y sus remanentes en la formulación son dañinos para los seres humanos. Además, puesto que el tumor es difícil de curar y la medicación en general es durante un tiempo largo, la acumulación in vivo de iones de metales pesados irá más allá de la tolerancia del paciente. 50

Otro documento del estado de la técnica es US 2009/0196918 A1.

De este modo todavía se requiere desarrollar un liposoma novedoso y un método correspondiente de carga de 55 fármaco.

Compendio de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un liposoma que comprende bicapa y fase acuosa interna, en donde la fase acuosa interna contiene sulfobutil éter ciclodextrina o su sal y un compuesto activo. 60

Según algunas formas de realización del liposoma en la presente invención, en donde el sulfobutil éter ciclodextrina es sulfobutil éter- α -ciclodextrina, sulfobutil éter- β -ciclodextrina o sulfobutil éter- γ -ciclodextrina. 65

Según algunas formas de realización del liposoma en la presente invención, en donde cada molécula de sulfobutil éter ciclodextrina tiene aproximadamente 6,5 grupos sulfuro de media.

Según algunas formas de realización del liposoma en la presente invención, en donde la sal de sulfobutil éter ciclodextrina está formada por sulfobutil éter ciclodextrina con uno o más de amina, ion metálico e ion amonio.

5 Según algunas formas de realización del liposoma en la presente invención, en donde la sal de sulfobutil éter ciclodextrina está formada por sulfobutil éter ciclodextrina con uno o más de amoniaco (NH₃), trietilamina (TA), trietanolamina (TEA), ion sodio, ion potasio o ion calcio.

10 Según algunas formas de realización del liposoma en la presente invención, en donde el compuesto activo es un compuesto alcalescente débil, preferiblemente uno o más seleccionados de vinorelbina, vincristina, topotecán e irinotecán.

Según algunas formas de realización del liposoma en la presente invención, en donde la bicapa comprende fosfolípido, colesterol y lípido modificado con polímero hidrofílico.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un proceso para preparar el liposoma de la presente invención descrito anteriormente, que comprende:

- 20 (1) hidratar el polvo de la fase lipídica con solución acuosa de sulfobutil éter ciclodextrina o su sal para formar un liposoma vacío que comprende la solución acuosa de sulfobutil éter ciclodextrina o su sal como fase acuosa interna,
- (2) eliminar la sal de sulfobutil éter ciclodextrina en la fase externa del liposoma vacío obtenido en la etapa (1) para formar un gradiente de anión,
- (3) opcionalmente, si la sal de sulfobutil éter ciclodextrina es una sal de ion metálico, añadir un ionóforo del ion metálico a la fase externa del liposoma vacío obtenido en la etapa (2) para formar un gradiente de pH, y
- 25 (4) incubar el liposoma vacío obtenido en la etapa (2) o (3) con el compuesto activo en solución acuosa para encapsular el compuesto activo en el liposoma.

30 Según una forma de realización del proceso para preparar el liposoma en la presente invención, en donde el ionóforo del ion metálico es el ionóforo A23187.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una preparación farmacéutica liposómica, que comprende el liposoma según cualquiera de la presente invención descrita anteriormente y un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Según algunas formas de realización de la preparación farmacéutica liposómica en la presente invención, en donde el portador y/o excipiente comprende un regulador osmótico y/o antioxidante.

40 En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso del liposoma según cualquiera de la presente invención descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor en un paciente, en donde el compuesto activo en el liposoma es uno o más de vinorelbina, vincristina, topotecán e irinotecán.

45 El desarrollo de métodos novedosos depende de la investigación del mecanismo de carga de fármaco tradicional. En primer lugar, se analiza el método del gradiente de sulfato de amonio que comprende el siguiente proceso: dirigido por diferencia de concentración y pH, la alta concentración de fármaco en la fase externa del liposoma supera la resistencia de la membrana lipídica (bicapa de fosfolípidos) y entra en la fase acuosa interna del liposoma. El fármaco que entra en la fase acuosa interna está protonado y precipita con SO₄²⁻, y se retiene establemente en el liposoma. Es necesario disociar del precipitado y difundir fuera del liposoma para la liberación del fármaco. Por tanto, la estructura microscópica y la solubilidad del precipitado determina la velocidad de liberación del fármaco del liposoma y además determina la seguridad y eficacia de la formulación.

50 La estructura microscópica y la complejidad del precipitado formado por el fármaco y SO₄²⁻ están relacionadas con la estructura espacial y alcalescencia débil del fármaco. Algunos fármacos, tal como clorhidrato de doxorrubicina, son aptos para formar precipitado con SO₄²⁻ debido a su fuerte alcalescencia. Además, las moléculas de fármaco pueden apilarse unas sobre otras debido a la estructura cuasi planar de la molécula, y se forma un precipitado elongado compacto en el liposoma como se muestra microscópicamente. Por tanto, el clorhidrato de doxorrubicina se puede retener bien en el liposoma y la semivida t_{1/2} de su formulación liposómica en ratones KM es más de 15 horas. Por el contrario, otros fármacos, tal como vinorelbina y topotecán, son alcalescentes débiles y por tanto tienen mala capacidad para precipitar con SO₄²⁻, y las moléculas de fármaco no se pueden apilar unas sobre otras debido a la estructura no planar de la molécula. Por tanto, la t_{1/2} en ratones KM es menor de 5 horas incluso si el liposoma se prepara usando la misma composición de lípidos y método que los del liposoma de clorhidrato de doxorrubicina anterior. La semivida es tan corta que la mayoría del fármaco se salió del liposoma a la circulación sanguínea y no puede alcanzar el área del tumor. Incluso una pequeña proporción del fármaco liposómico que alcanzó el área del tumor se liberará rápidamente. Es indeseado para un fármaco antitumoral con carácter específico del ciclo celular ejercer este efecto. Se concluye que uno de los factores críticos para la liberación del fármaco es la complejidad del precipitado formado entre el fármaco y el anión.

La alcalescencia débil del fármaco tal como vinorelbina y topotecán es incambiable, de modo que es crítico encontrar aniones que puedan asociarse y formar un precipitado compacto con el fármaco, y los compuestos polianiónicos que tienen estructura complicada pueden formar un complejo estable con ellos.

Se demuestra experimentalmente que la encapsulación eficaz de fármaco alcaescente débil, tal como vinorelbina o topotecán, se puede lograr en la presente invención. La prueba de liberación in vitro y la prueba farmacocinética confirman que, en comparación con la formulación de fase acuosa interna de sulfato de amonio, el índice de liberación del fármaco liposómico de la presente invención está marcadamente extendido. La presente invención también es adecuada para otros fármacos antitumorales, tal como vincristina e irinotecán, con alcalescencia débil similar de vinorelbina y topotecán.

Los presentes inventores rompen la idea convencional de usar la acción de inclusión de SBE- β -CD, pero emplean su carácter multianiónico para usarlo como fase acuosa interna del liposoma y cargar activamente el fármaco. El uso de sal de sulfobutil éter ciclodextrina como fase acuosa interna para cargar fármaco tiene un principio similar que ese en el uso de sulfato de amonio como fase acuosa interna, por lo cual el anión en la fase acuosa interna forma precipitado con la molécula de fármaco y por tanto extiende la liberación del fármaco. Sin embargo, cada molécula de sulfobutil éter tiene 6,5 SO_3^{2-} de media, y se puede unir a múltiples moléculas de fármaco simultáneamente y formar una estructura de precipitado más compleja. Se alcanza tan alto índice de encapsulación, y el tiempo de retención del fármaco está significativamente extendido en comparación con el liposoma con sulfato de amonio como fase acuosa interna.

El liposoma preparado con sulfobutil éter ciclodextrina en la presente invención es completamente diferente del liposoma de inclusión de ciclodextrina convencional. La presente invención no es para resolver el problema de solubilidad del fármaco insoluble, sino para extender el tiempo de retención en el liposoma del fármaco alcaescente débil, y para aumentar el índice de encapsulación del fármaco. Además, los ejemplos en la presente invención confirmaron que el índice de encapsulación era tan bajo cuando el liposoma se prepara solo usando la acción de inclusión de sulfobutil éter ciclodextrina, que no puede cumplir la necesidad de medicación clínica.

Para obtener preparaciones de liposomas con buenas propiedades, primero se debe preparar una sal de sulfobutil éter ciclodextrina, y después se debe preparar el liposoma usando un método apropiado. El método usado en la presente invención comprende:

(A) Preparación de sales de sulfobutil éter ciclodextrina: preparar una solución acuosa de sulfobutil éter ciclodextrina, y salificar con trietilamina, trietanolamina, amoniaco, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o hidróxido de calcio.

(B) Preparación de liposomas: disolver excipientes lipídicos en un solvente orgánico, eliminar el solvente orgánico por liofilización y después obtener un polvo de lípido suelto, hidratar el polvo de la fase lipídica con solución acuosa de la sal de sulfobutil éter ciclodextrina para formar un liposoma vacío. Después reducir el tamaño de partícula del liposoma vacío mediante un aparato de micro-chorro o un aparato de extrusión a alta presión, eliminar la sal de sulfobutil éter ciclodextrina en la fase externa del liposoma por diálisis o cromatografía en columna entre otros, para formar un gradiente transmembrana aniónico. Si la sal de sulfobutil éter ciclodextrina usada es una sal de ion metálico, se requiere la adición de ionóforo de metal. El ionóforo de metal se puede insertar en la membrana de fosfolípidos para intercambiar ion metálico interno e ion hidrógeno externo, y por tanto se forma un gradiente de pH. Después la preparación liposómica se obtiene por incubación de la solución de fármaco y la suspensión de liposomas.

El sulfobutil éter ciclodextrina usado en la presente invención se debe importar actualmente. Sin embargo, se puede producir a granel con buena calidad y cumplir la necesidad de producción a gran escala.

En resumen, en la presente invención, el uso de sales de sulfobutil éter ciclodextrina como fase acuosa interna del liposoma es completamente factible en consideración a la encapsulación de fármaco, efecto de retención y coste económico.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que solo es ejemplar y no se debe interpretar como una limitación al ámbito de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, la proporción fármaco/lípido se refiere a la proporción en peso de fármaco respecto a fosfolípido, y el "contenido de DSPE-mPEG" se refiere a su porcentaje molar en los componentes totales del fosfolípido en la bicapa del liposoma.

Ejemplo 1

Proceso general de preparación de liposomas con sulfobutil éter ciclodextrina (SBE-CD) como fase acuosa interna (con la formulación de SBE-CD)

5 Se mezclaron HSPC, colesterol y DSPE-mPEG2000 en una proporción en masa de 3:1:1 y se disolvieron en alcohol t-butílico al 95%. El solvente orgánico se eliminó por liofilización para obtener un polvo de lípido suelto. El polvo se hidrató con solución acuosa de sulfobutil éter β -ciclodextrina a 50-60°C y se incubó durante 1 hora para obtener un liposoma multivesicular heterogéneo. El tamaño de partícula del liposoma se redujo mediante un aparato de microchorro. Se eliminó el anión en la fase externa del liposoma vacío mediante un aparato de ultrafiltración para formar un gradiente transmembrana dinámico. Se añadió una solución acuosa del fármaco al liposoma vacío en una proporción fármaco/lípido apropiada y la carga del fármaco se alcanzó por incubación a 60°C durante 1 hora.

Ejemplo 2

15 Proceso general de preparación de liposomas con sal de trietilamina de sulfobutil éter ciclodextrina como fase acuosa interna (con la formulación de SBE-CD/TA)

20 Se mezclaron HSPC, colesterol y DSPE-mPEG2000 en una proporción en masa de 3:1:1 y se disolvieron en alcohol t-butílico al 95%. El solvente orgánico se eliminó por liofilización para obtener un polvo de lípido suelto. El polvo se hidrató con solución acuosa de sal de trietilamina de sulfobutil éter ciclodextrina a 50-60°C y se incubó durante 1 hora para obtener un liposoma multivesicular heterogéneo. El tamaño de partícula del liposoma se redujo mediante un aparato de extrusión a alta presión. Se eliminó el anión en la fase externa del liposoma vacío mediante un aparato de ultrafiltración para formar un gradiente transmembrana dinámico. Se añadió una solución acuosa del fármaco al liposoma vacío en una proporción fármaco/lípido apropiada y la carga del fármaco se alcanzó por incubación a 60°C durante 1 hora.

25

Ejemplo 3

30 Proceso general de preparación de liposomas con sal de sodio de sulfobutil éter ciclodextrina como fase acuosa interna (con la formulación de SBE-CD/Na)

35 Se mezclaron HSPC, colesterol y DSPE-mPEG2000 en una proporción en masa de 3:1:1 y se disolvieron en alcohol t-butílico al 95%. El solvente orgánico se eliminó por liofilización para obtener un polvo de lípido suelto. El polvo se hidrató con solución acuosa de sal de sodio de sulfobutil éter ciclodextrina a 50-60°C y se incubó durante 1 hora para obtener un liposoma multivesicular heterogéneo. El tamaño de partícula del liposoma se redujo mediante un aparato de extrusión a alta presión. Se eliminó el anión en la fase externa del liposoma vacío por cromatografía en columna, y después se añadió una solución en etanol de nicomicina en una cantidad apropiada (20 ng de nicomicina/1 mg de HSPC). La mezcla resultante se incubó a 60°C durante diez minutos, de modo que se intercambiara ion hidrógeno e ion sodio a través de la membrana del liposoma, de modo que se formara un gradiente de pH. Se añadió una solución acuosa del fármaco al liposoma vacío en una proporción fármaco/lípido apropiada y la carga del fármaco se alcanzó por incubación a 60°C durante 1 hora.

40

Ejemplo 4

45 Comparación del índice de encapsulación de liposomas que contienen varias fases acuosas internas

Se prepararon los liposomas de varios fármacos con 3 respectivas fases acuosas internas como se describe en el ejemplo 1, 2 y 3, en una proporción fármaco/lípido de 2:9,58 (véase la tabla 1).

Tabla 1: Efecto del agente de atrapamiento intraliposómico sobre la carga de fármaco

Fármaco	Índice de encapsulación de liposomas que tienen diferentes fases acuosas internas (%)		
	SBE-CD	SBE-CD/TA	SBE-CD/Na
Clorhidrato de mitoxatona	7,6	48,5	77,6
Clorhidrato de topotecán	4,8	63,6	74,6
Clorhidrato de irinotecán	5,3	64,1	96,1
Clorhidrato de doxorubicina	11,3	63,5	91,8
Bitartrato de vinorelbina	4,7	38,2	75,9
Sulfato de vincristina	3,8	47,8	79,7

50

55 Conclusión: como se puede ver del índice de encapsulación como se divulga, el liposoma que tiene SBE-CD como fase acuosa interna tiene un mal índice de encapsulación, mientras que se lograron altos índices de encapsulación con SBE-CD/TA y SBE-CD/Na, lo que ilustra que no se puede lograr una buena encapsulación a menos que se forme un gradiente de pH mediante transporte de iones. El fármaco se protona primero después de entrar en la fase acuosa interna del liposoma, y después se asocia con SBE-CD, mientras la carga del fármaco apenas se alcanza dependiendo exclusivamente en el efecto de inclusión de SBE-CD.

Ejemplo 5

Liberación *in vitro* de formulaciones de vincristina liposómicas que contienen diferente fase acuosa interna (SBE-CD/TA frente a sulfato de amonio).

1. Muestras

Se prepararon los liposomas de vincristina en una proporción fármaco/lípido de 3:9,58, como se describe en el ejemplo 2 para el liposoma que tiene SBE-CD/TA como fase acuosa interna, y como se describe en el ejemplo 2, con la excepción de la sustitución de la sal de trietilamina de sulfobutil éter-β-ciclodextrina con sulfato de amonio, para el liposoma que tiene sulfato de amonio como fase acuosa interna.

2. Condiciones de liberación

Las muestras de formulaciones de vincristina liposómicas se diluyeron 10 veces en tampón de liberación (NH₄Cl 5 mM/histidina 10 mM/glucosa 260 mM, pH 7,0) y se transfirieron a bolsas de diálisis. La diálisis se realizó frente a un volumen de 200 veces de tampón de diálisis en matraces de disolución. La prueba de liberación se realizó a 37°C, 75 rpm. En varios puntos de tiempo (1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h) se retiraron alícuotas para análisis.

3. Resultados

Tabla 2: Liberación de liposomas de vincristina con diferentes fases acuosas internas

Fase acuosa interna	Índice de liberación de fármaco a diferentes tiempos (%)						t _{1/2} (h)
	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h	
SBE-CD/TA	22	31	44	52	61	94	7,2
sulfato de amonio	26	62	91	97	98	99	1,1

Conclusión: En comparación al liposoma que tiene sulfato de amonio como fase acuosa interna, el liposoma que tiene SBE-CD/TA como fase acuosa interna extendió significativamente la retención del fármaco en la fase acuosa interna.

Ejemplo 6

Liberación *in vitro* de formulaciones de vinorelbina liposómicas que contienen SBE-CD/NH₃ y sulfato de amonio como una fase acuosa interna mezcla

1. Muestras

Se prepararon los liposomas de vinorelbina en una proporción fármaco/lípido de 3:9,58, como se describe en el ejemplo 2 con la excepción de la sustitución de la sal de trietilamina de sulfobutil éter-β-ciclodextrina con la solución mezcla de SBE-CD/NH₃ y sulfato de amonio, como se describe en A-F de la tabla 3.

Tabla 3: Formulaciones para vinorelbina liposómica que tienen SBE-CD/NH₃ y sulfato de amonio como una fase acuosa interna mezcla

Número	Concentración (mM)	
	[H ⁺] de SBE-CD	Sulfato de amonio
A	280,8	86,4
B	236,7	108,9
C	204,3	126,0
D	180,0	138,6
E	160,2	148,5
F	0	225,0

2. Condiciones de liberación

Las muestras de formulaciones liposómicas se diluyeron 10 veces en tampón de liberación (NH₄Cl 2 mM/histidina 10 mM/glucosa 250 mM, pH 7,5) y se transfirieron a bolsas de diálisis. La diálisis se realizó frente a un volumen de 200 veces de tampón de diálisis en matraces de disolución. La prueba de liberación se realizó a 37°C, 75 rpm. En varios puntos de tiempo (1 h, 2 h, 4 h, 8 h) se retiraron alícuotas para análisis.

3. Resultados

Tabla 4: Liberación *in vitro* formulaciones de vinorelbina liposómicas que tienen diferente fase acuosa interna

Tiempo de muestreo (h)	Índice de liberación para diferente fase acuosa interna (%)					
	A	B	C	D	E	F

1	34,9	25,1	33,2	36,0	39,1	68,3
2	56,6	51,8	59,0	63,1	67,7	91,5
4	83,6	83,5	89,3	90,2	93,4	98,6
8	97,4	97,2	98,0	98,5	98,6	99,3

Conclusión: Los liposomas que tiene alta proporción de SBE-CD/NH₃ en la fase acuosa interna mezcla mostraron liberación de fármaco relativamente lenta, lo que indica que la sal de amonio de SBE-CD podría extender la liberación del fármaco.

5

Ejemplo 7

Farmacocinética para los liposomas que tienen sulfato de amonio, diferentes sales de amonio de SBE-CD como fase acuosa interna

10

1. Muestras

Se prepararon liposomas de vinorelbina, vincristina e irinotecán en una proporción fármaco/lípido de 2:9,58, como se describe en el ejemplo 2 con la excepción de la sustitución de SBE-β-CD/TA con (NH₄)₂SO₂ para (NH₄)₂SO₂ como fase acuosa interna, como se describe en el ejemplo 2 para SBE-CD/TA como fase acuosa interna, y como se describe en el ejemplo 2 con la excepción de la sustitución de SBE-β-CD/TA con SBE-β-CD/NH₃ para SBE-β-CD/NH₃ como fase acuosa interna.

15

2. Animales y dosis

20

Este ejemplo se realizó en ratones DBA/2 macho, y la dosis fue 10 mg/kg.

3. Resultados

25 Tabla 5: Farmacocinética en plasma de formulaciones de liposomas que tienen diferente fase acuosa interna

Fase acuosa interna	Semivida para diferentes liposomas de fármacos (h)		
	Vinorelbina	Vincristina	Irinotecán
SBE-CD/TA	4,4	67,3	8,6
SBE-CD/NH ₃	5,4	46,2	11,3
(NH ₄) ₂ SO ₂	3,1	27,6	4,1

Conclusión: Como se muestra en los resultados farmacocinéticos, en comparación con el liposoma que tiene sulfato de amonio como fase acuosa interna, los liposomas que tienen SBE-CD/NH₃ como fase acuosa interna muestran semivida significativamente extendida.

30

Ejemplo 8

Eficacias de liposomas de vinorelbina que tienen diferente fase acuosa interna en un modelo de tumor LLC

35 1. Formulaciones

Formulación 1: SBE-CD/TA como fase acuosa interna, preparada como se describe en el ejemplo 2.

Formulación 2: Sulfato de amonio como fase acuosa interna, preparada como se describe en el ejemplo 2 con la excepción de la sustitución de SBE-β-CD/TA con sulfato de amonio.

40

En ambas formulaciones, la proporción fármaco/lípido es 3:9,58, y el contenido de DSPE-mPEG200 es del 0,5%.

2. Experimentos

45

Se recogieron células de cáncer de pulmón LLC, y se diluyeron con medio DMEM. Después de la dilución, el número de células tumorales se moduló a 2,0×10⁶ células/ml. Se inocularon 0,2 ml de la suspensión de células tumorales que contenían aproximadamente 4×10⁵ células tumorales en el tejido subcutáneo de la axila de la pata delantera de ratones C57 hembra en condiciones asépticas. Catorce días después de la inoculación, los ratones se aleatorizaron por volumen tumoral en tres grupos y se les administró una única inyección i.v. a una dosis de 10 mg/kg.

50

Los ratones se criaron normalmente después de la administración. Se midieron los diámetros tumorales para evaluar dinámicamente eficacias antitumorales de las diferentes formulaciones. Se calculó el volumen tumoral (VT) con la siguiente fórmula:

55

$VT = 1/2 \times a \times b^2$, en la que a y b representan la longitud y anchura, respectivamente.

Los volúmenes tumorales se calcularon usando los resultados de medida. Los datos del experimento se analizaron usando el software de estadística SPSS 11.5.

5 3. Resultados

Tabla 6: Eficacias antitumorales de liposomas de vinorelbina que tienen diferente fase acuosa interna en el modelo tumoral de LLC (n=10, $\bar{x} \pm de$)

Día después de la administración	Volumen tumoral (mm ³)		
	SBE-CD/TA	Sulfato de amonio	Solución de glucosa al 5%
0	785,0±343,0	692,2±259,3	780,8±353,3
1	1214,5±732,4	979,7±507,3	1154,8±618,0
2	1179,6±730,0	940,7±415,1	1378,2±753,2
3	1420,5±716,3	1116,8±503,5	1964,3±1004,2
4	1591,6±1056,1	1091,6±562,3**	2456,5±1170,1
6	1665,2±1121,3*	1353,7±631,6**	3173,9±1591,2
7	2034,7±1233,8*	1846,7±1051,5**	4117,7±2022,8
9	1939,0±1171,0**	2086,5±1446,8**	4715,0±2203,6
11	2605,2±1683,3**	3142,4±1643,0*	6307,6±3194,9
12	2893,5±1656,5**	3650,4±1931,8**	7562,9±3819,7
14	3793,5±2671,7**	5106,1±2465,1**	9464,8±4151,7

**P<0,01, *P<0,05, en comparación con el control de glucosa al 5%.

10 En comparación con glucosa al 5%, el crecimiento del tumor se suprimió significativamente desde el día 4 para los liposomas que tienen sulfato de amonio como fase acuosa interna y desde el día 6 para los liposomas que tienen SBE-CD como fase acuosa interna.

15 El índice de proliferación tumoral relativo T/C (%) se calculó con la siguiente fórmula: $T/C \% = TRTV/CRTV \times 100\%$, en la que TRTV y CRTV representan el volumen tumoral relativo (RTV) del grupo de tratamiento y del grupo control negativo, respectivamente. $RTV = Vt/Vo$. Vo significa el volumen tumoral del día 0 (dosis inicial), y Vt significa el volumen tumoral en cada día de medida. Respecto al índice de proliferación del volumen tumoral relativo del grupo SBE-CD y grupo de sulfato de amonio, los menores T/C % fueron el 51,8% y el 31,1%, respectivamente. Es decir, la
 20 eficacia antitumoral del grupo SBE-CD sobre cáncer de pulmón LLC era superior que la del grupo de sulfato de amonio.

Ejemplo 9

25 Eficacias antitumorales de liposomas de topotecán que tienen diferente fase acuosa interna en un modelo de tumor RM-1 de próstata

1. Formulaciones

30 Formulación 1: SBE-CD/TA como fase acuosa interna, preparada como se describe en el ejemplo 2.

Formulación 2: Octasulfato de sacarosa como fase acuosa interna, preparada como se describe en el ejemplo 2 con la excepción de la sustitución de SBE-β-CD/TA con octasulfato de sacarosa.

35 En ambas formulaciones, la proporción fármaco/lípido es 3:9,58, y el contenido de DSPE-mPEG200 es del 0,5%.

2. Experimentos

40 Se recogieron células de cáncer de pulmón RM-1, y se diluyeron con medio 1640. Después de la dilución, el número de células tumorales se moduló a $2,0 \times 10^6$ células/ml. Se inocularon 0,2 ml de la suspensión de células tumorales que contenían aproximadamente 4×10^5 células tumorales en el tejido subcutáneo de la axila de la pata delantera de ratones C57 hembra en condiciones asépticas. Doce días después de la inoculación, los ratones se aleatorizaron por volumen tumoral en tres grupos y se les administró una única inyección i.v. a una dosis de 10 mg/kg.

45 Los ratones se criaron normalmente después de la administración. Se midieron los diámetros tumorales para evaluar dinámicamente eficacias antitumorales de las diferentes formulaciones. Se calculó el volumen tumoral (VT) con la siguiente fórmula:

50 $VT = 1/2 \times a \times b^2$, en la que a y b representan la longitud y anchura, respectivamente.

Los volúmenes tumorales se calcularon usando los resultados de medida. Los datos del experimento se analizaron usando el software de estadística SPSS 11.5.

3. Resultados

Tabla 7: Los efectos antineoplásicos de liposomas de topotecán en modelo de tumor RM-1 (n=10, $\bar{x} \pm de$)

Día después de la administración	Volumen tumoral (mm ³)			
	SBE-CD/TA	Octasulfato de sacarosa	Topotecán libre	Control de glucosa al 5%
0	220,1±70,1	218,8±67,3	223,0±65,7	219,6±60,2
2	339,2±145,0*	336,8±96,3*	484,0±154,7	468,9±137,7
4	397,3±234,4*	347,0±117,8**	606,0±183,1	765,3±415,2
6	483,1±253,6**	500,3±165,5**	1060,7±393,0	1376,9±689,3
8	690,2±656,7*	640,7±280,7**	1301,8±563,7	2082,9±1508,7
9	914,0±691,4*	734,2±343,6*	1628,5±835,4	2598,7±2148,2
13	1876,2±1931,9*	1247,8±858,7**	3592,9±1523,5	4499,4±2946,5
15	2833,9±3016,7*	2571,1±2844,9**	6639,3±2388,2	7504,9±4335,9

**P<0,01, *P<0,05, en comparación con el control de glucosa al 5%.

5 En comparación con glucosa al 5% para inyección como control, el topotecán libre no suprimió significativamente el crecimiento del tumor ($p > 0,05$), mientras que el crecimiento del tumor fue suprimido significativamente en los dos grupos de los liposomas que tienen diferente fase acuosa interna. Se observaron diferencias significativas en comparación con los grupos de topotecán libre con dosis iguales, mientras que no se observó diferencia significativa de la supresión en el tumor RM-1 entre las dos formulaciones liposómicas.

Ejemplo 10

15 Toxicidad de diferentes formulaciones de topotecán liposómicas en ratones KM.

1. Formulaciones

Formulación 1: SBE-CD/TA como fase acuosa interna, preparada como se describe en el ejemplo 2.

20 Formulación 2: Octasulfato de sacarosa como fase acuosa interna, preparada como se describe en el ejemplo 2 con la excepción de la sustitución de SBE-β-CD/TA con octasulfato de sacarosa.

En ambas formulaciones, la proporción fármaco/lípido es 3:9,58, y el contenido de DSPE-mPEG200 es del 0,5%.

25 2. Experimentos

Respecto a los tres fármacos liposómicos y fármaco libre, cada grupo de dosis tiene dos ratones KM hembra, empezando con una dosis máxima de 40,6 mg/kg de topotecán y siguiendo con un factor de dosis descendente de 1,25 (es decir, dosis: 40,6, 32,5, 26,0, 20,8, 16,6, 13,3 y 10,6 mg/kg). Los ratones se observaron en términos de salud general y se pesaron cada día durante un periodo de 14 días.

Tabla 8. Toxicidad de formulaciones de topotecán liposómicas que tienen diferente fase acuosa interna

Nivel de dosis (mg/kg)	número de animales muertos			Número de animales con pérdida de peso >15%		
	SBE-CD/TA	Octasulfato de sacarosa	Topotecán libre	SBE-CD/TA	Octasulfato de sacarosa	Topotecán libre
40,6	1	2	1	2	2	2
32,5	1	2	-	2	2	1
26,0	-	2	-	2	2	-
20,8	-	2	-	2	2	-
16,6	-	2	-	2	2	-
13,3	-	1	-	2	1	-
10,6	-	1	-	2	1	-

35 Como se muestra en la tabla 8, el orden de toxicidad fue: topotecán libre < liposoma que tiene SBE-CD/TA como fase acuosa interna < liposoma que tiene octasulfato de sacarosa como fase acuosa interna. El liposoma de octasulfato de sacarosa produjo la muerte del animal a una dosis relativa baja.

40 Los presentes inventores prepararon además los liposomas de vinorelbina, vincristina e irinotecán, y similarmente evaluaron sus toxicidades en ratones KM. Se obtuvieron los mismos resultados que los de topotecán. El orden de toxicidad fue: fármaco libre < liposoma que tiene SBE-CD/TA como fase acuosa interna < liposoma que tiene octasulfato de sacarosa como fase acuosa interna. El liposoma de octasulfato de sacarosa produjo la muerte del animal a una dosis relativa baja.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un liposoma que comprende una bicapa y una fase acuosa interna, en donde la fase acuosa interna comprende una sal de sulfobutil éter ciclodextrina y un compuesto activo alcalescente débil, en donde la sal de sulfobutil éter ciclodextrina empleando su carácter multianiónico forma un precipitado con el compuesto activo alcalescente débil.
- 10 2. El liposoma según la reivindicación 1, en donde el sulfobutil éter ciclodextrina es sulfobutil éter- α -ciclodextrina, sulfobutil éter- β -ciclodextrina o sulfobutil éter- γ -ciclodextrina.
- 15 3. El liposoma según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sulfobutil éter ciclodextrina tiene aproximadamente 6,5 grupos sulfo de media por molécula.
- 20 4. El liposoma según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la sal de sulfobutil éter ciclodextrina está formada por sulfobutil éter ciclodextrina con uno o más de amina, ion metálico o ion amonio.
- 25 5. El liposoma según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la sal de sulfobutil éter ciclodextrina está formada por sulfobutil éter ciclodextrina con uno o más de hidróxido de amonio, trietilamina, trietanolamina, ion sodio, ion potasio e ion calcio.
- 30 6. El liposoma según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto activo es uno o más de vinorelbina, vincristina, topotecán e irinotecán.
- 35 7. El liposoma según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la bicapa comprende fosfolípido, colesterol y lípido modificado con polímero hidrofílico.
- 40 8. Un proceso para preparar el liposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende:
 - 30 (1) hidratar polvos de fase lipídica con solución acuosa de sulfobutil éter ciclodextrina o su sal, para formar un liposoma vacío que comprende la solución acuosa de sulfobutil éter ciclodextrina o su sal como fase acuosa interna,
 - (2) eliminar la sal de sulfobutil éter ciclodextrina en la fase externa del liposoma vacío obtenido en la etapa (1), para formar un gradiente aniónico,
 - 35 (3) opcionalmente, si la sal de sulfobutil éter ciclodextrina es una sal de ion metálico, añadir un ionóforo del ion metálico a la fase externa del liposoma vacío obtenido en la etapa (2) para formar un gradiente de pH, e
 - (4) incubar el liposoma vacío obtenido en la etapa (2) o (3) con el compuesto activo en solución acuosa, para encapsular el compuesto activo en el liposoma.
- 45 9. Una preparación farmacéutica liposómica, que comprende el liposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. Una preparación farmacéutica liposómica según la reivindicación 9, en donde el portador y/o excipiente comprende regulador osmótico y/o antioxidante.
11. Uso del liposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor en un paciente, en donde el compuesto activo en el liposoma es uno o más de vinorelbina, vincristina, topotecán e irinotecán.