

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 649**

51 Int. Cl.:

A61K 31/28 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2009 PCT/US2009/033389**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2009 WO09100330**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2009 E 09708680 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2252304**

54 Título: **Agregados de platino y proceso para producirlos**

30 Prioridad:

07.02.2008 US 27752

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

28.11.2018

73 Titular/es:

**TRANSAVE, INC. (100.0%)
Princeton Corporate Plaza 11 Deer Park Drive,
Suite 117
Monmouth Junction, NJ 08852-1923, US**

72 Inventor/es:

**LEE, JIN, K.;
MILLER, BRIAN, S.;
WU, FANGJUN;
BONI, LAWRENCE, T. y
MALININ, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 691 649 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

Agregados de platino y proceso para producirlos

Antecedentes de la invención

5 Los liposomas y los complejos lipídicos han sido reconocidos durante mucho tiempo como sistemas de administración de fármacos que pueden mejorar la efectividad terapéutica y diagnóstica de muchos agentes bioactivos y agentes de contraste. Los experimentos con diversos antibióticos y agentes de contraste de rayos X han demostrado que se puede lograr una mejor actividad terapéutica o un mejor contraste con un mayor nivel de seguridad encapsulando agentes bioactivos y agentes de contraste con liposomas o complejos lipídicos. La investigación sobre liposomas y complejos lipídicos como sistemas encapsulantes para agentes bioactivos ha
10 mostrado que un desarrollo y comercialización exitosos de dichos productos requiere métodos reproducibles de producción a gran escala de vesículas lipídicas con características adecuadas. En consecuencia, los investigadores han buscado métodos que produzcan de forma consistente liposomas o complejos lipídicos del tamaño y la concentración requeridos, la distribución del tamaño y, lo que es más importante, la capacidad de atrapamiento, con requisitos de composición lipídica flexible. Dichos métodos buscan proporcionar liposomas o complejos lipídicos con una relación de sustancia activa a lípido consistente, respetando las buenas prácticas de fabricación actualmente aceptadas para los productos farmacéuticos.

Los métodos convencionales de preparación de complejos lipídicos y liposomas incluyen una serie de pasos en los que los componentes formadores de bicapa (por ejemplo, fosfolípidos o mezclas de fosfolípidos con otros lípidos, por ejemplo, colesterol) se disuelven en un disolvente orgánico volátil o una mezcla de disolventes en un matraz de fondo redondo seguido de la evaporación del disolvente bajo condiciones, como la temperatura y la presión, que evitarán la separación de fases. Tras la eliminación del disolvente, una mezcla lipídica seca, generalmente en forma de un depósito de película en las paredes del reactor, se hidrata con un medio acuoso que puede contener tampones disueltos, sales, agentes acondicionadores y una sustancia activa a atrapar. Los liposomas o los complejos lipídicos se forman en la etapa de hidratación de tal manera que una proporción del medio acuoso se
20 encapsula en los liposomas. La hidratación se puede realizar con o sin energizar la solución mediante agitación, sonicación o microfluidización o con la posterior extrusión a través de uno o más filtros, como los filtros de policarbonato. La sustancia activa libre no encapsulada puede separarse para su recuperación y el producto se filtra, se esteriliza, se liofiliza opcionalmente y se envasa.

Otros métodos de preparación de liposomas o complejos lipídicos que involucran la inyección de soluciones orgánicas de lípidos en un medio acuoso con eliminación continua de disolventes, el uso del secado por aspersión, liofilización, microemulsificación y microfluidización, y similares, han sido propuestos en varias publicaciones o patentes. Tales patentes incluyen, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.529.561 y la patente de EE.UU. N° 4.572.425.

El cisplatino-cis-diamina-dicloroplatino (II) es uno de los agentes antitumorales más efectivos utilizados en el tratamiento sistémico de los cánceres. Este fármaco quimioterapéutico es altamente eficaz en el tratamiento de modelos de tumores en animales de laboratorio y en tumores humanos, como neoplasias endometriales, vesicales, ováricas y testiculares, así como carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Sur, et al., 1983 Oncology 40 (5): 372-376; Steerenberg, et al., 1988 Cancer Chemother Pharmacol. 21(4): 299-307). El cisplatino también se usa ampliamente en el tratamiento del carcinoma de pulmón, tanto el carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP) como el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) (Schiller et al., 2001 Oncology 61 (Suppl 1): 3-13). Otros compuestos activos de platino (definidos a continuación) son útiles en el tratamiento del cáncer.

Al igual que otros agentes quimioterapéuticos para el cáncer, los compuestos de platino activos, como el cisplatino, suelen ser altamente tóxicos. Las principales desventajas del cisplatino son su extrema nefrotoxicidad, que es el principal factor limitante de la dosis, su rápida excreción a través de los riñones, con una vida media de circulación de solo unos minutos, y su fuerte afinidad con las proteínas plasmáticas (Freise, et al., 1982 Arch Int Pharmacodyn Ther. 258(2): 180-192).

Los intentos de minimizar la toxicidad de los compuestos de platino activos han incluido la quimioterapia de combinación, la síntesis de análogos (Prestayko et al., 1979 Cancer Treat Rev. 6(1): 17-39; Weiss, et al., 1993 Drugs. 46 (3): 360-377), inmunoterapia y atrapamiento en liposomas (Sur, et al., 1983; Weiss, et al., 1993). Se ha
50 mostrado que los agentes antineoplásicos, incluido el cisplatino, atrapados en liposomas, tienen una menor toxicidad, en relación con el agente en forma libre, al tiempo que retienen la actividad antitumoral (Steerenberg, et al., 1987; Weiss, et al., 1993).

Sin embargo, el cisplatino es difícil de atrapar de manera eficiente en los liposomas o en los complejos lipídicos debido a su baja solubilidad acuosa, aproximadamente 1,0 mg/ml a temperatura ambiente y baja lipofilia, cuyas propiedades contribuyen a una baja relación cisplatino/lípido.

Los liposomas y los complejos lipídicos que contienen cisplatino presentan otro problema de estabilidad de la composición. En particular, el mantenimiento de la potencia del agente bioactivo y la retención del agente bioactivo en el liposoma durante el almacenamiento son problemas reconocidos (Freise, et al., 1982; Gondal, et al., 1993;

Potkul, et al., 1991 Am J Obstet Gynecol. 164(2): 652-658; Steerenberg, et al., 1988; Weiss, et al., 1993) y se ha demostrado que la vida útil de los liposomas que contienen cisplatino está limitada al orden de varias semanas a 4°C (Gondal, et al., 1993, J. J. Cancer. 29A (11): 1536-1542; Potkul, et al., 1991).

5 El documento WO2007/099377 se refiere a liposomas que comprenden oxaliplatino encapsulado y métodos para preparar oxaliplatino encapsulado. También describe liposomas que comprenden oxaliplatino y otro fármaco anticanceroso. El documento US2004/101553 describe una composición y el procedimiento para elaborar la composición, comprendiendo la composición un liposoma y un compuesto de platino activo, conteniendo el liposoma uno o más lípidos. El documento WO2005/112957 se refiere a un método para tratar enfermedades pulmonares y afecciones de enfermedades pre-pulmonares tales como lesiones precancerosas, que comprenden administrar a un
10 paciente en necesidad de un agente terapéutico que comprenda una composición lipídica. También describe un método para preparar liposomas mediante un método de infusión.

Sumario de la invención

15 La presente invención es como se describe en las reivindicaciones 1-16. Se proporciona, entre otras cosas, una nueva forma de compuesto de platino activo complejado con lípidos, que permite obtener altas concentraciones del compuesto de platino en una composición. Por ejemplo, la concentración del cisplatino en la composición es mayor a temperatura ambiente, por ejemplo, aproximadamente más de 1,2 mg/ml, en comparación con 1 mg/ml en solución acuosa. El compuesto de platino activo complejado con lípidos es estable durante largos períodos de tiempo. Por ejemplo, el compuesto activo de platino complejado con lípidos es estable durante más de un año.

20 Se describe en este documento una composición que comprende un compuesto de platino activo complejado con lípidos, en el que el complejo tiene una relación de lípido a fármaco (L/D) de menos de aproximadamente 1 en peso, por ejemplo, aproximadamente de 0,10 a 1, en el que el compuesto de platino activo complejado con lípidos comprende al menos un lípido y al menos un compuesto de platino activo.

En algunas realizaciones, el compuesto de platino activo complejado con lípidos tiene un diámetro ponderado en volumen promedio de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 micrómetros.

25 En algunas realizaciones, la composición comprende además un liposoma. El liposoma puede comprender al menos un lípido, y puede comprender además al menos un compuesto de platino activo.

En algunas realizaciones, la presente descripción se refiere a una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de platino activo complejado con lípidos y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La formulación farmacéutica puede formularse para inhalación o inyección.

30 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1(A) representa un gráfico de la temperatura de transición para la disolución y precipitación de cisplatino en solución acuosa en función de la concentración de cisplatino durante el calentamiento. La FIG. 1(B) representa un gráfico similar de transplatino. Las figuras 1(C) y 1(D) representan gráficas de la temperatura de transición de cisplatino precipitado disuelto en solución acuosa en función de la concentración durante el enfriamiento de
35 cisplatino y transplatino, respectivamente.

La FIG. 2 muestra la estabilidad de lotes de un litro de cisplatino complejado con lípidos de acuerdo con la invención.

40 Figuras 3(A) y 3(B). Partículas lipídicas ricas en cisplatino en la fracción densa y sedimentada de una composición de la presente invención. Se muestran dos imágenes TEM representativas (A y B). Las muestras se prepararon como se describe en los ejemplos. Los grandes círculos tenues en el fondo son parte de la estructura de la placa de cobre.

Las figuras 4(A) y (B) representan imágenes TEM de cristales de cisplatino tomadas con un aumento de 2000x.

Las figuras 5(A) y 5(B) son imágenes TEM representativas de las partículas de fracción densa del gradiente de densidad de una formulación del complejo lipídico de cisplatino nebulizado. Las imágenes se tomaron con una ampliación de 6300x (A) y 8000x (B).

45 Las figuras 6(A) y (B) son imágenes TEM representativas de las partículas de fracción densa del gradiente de densidad de una formulación del complejo lipídico de cisplatino nebulizado. Las imágenes se tomaron con una ampliación de 8000x (A) y 4000x (B).

La FIG. 7 representa un gráfico de barras que muestra el efecto de la nebulización en la distribución del cisplatino en las fracciones ligeras y densas de una composición de la presente invención.

50 Las figuras 8(A) - (D) son micrografías ópticas representativas de una composición de la presente invención.

Las figuras 9(A) y (B) son micrografías electrónicas de fractura por congelación representativas de una composición de la presente invención.

Las figuras 10(A) - (D) son gráficos que representan el análisis del tamaño de partícula de varios lotes de una composición de la presente invención.

Las figuras 11(A) y (B) son gráficos que representan el análisis del tamaño de partícula de dos lotes de una composición de la presente invención después de la nebulización.

5 Descripción detallada de la invención

Por conveniencia, antes de una descripción adicional de la presente invención, se recogen en este documento algunos términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. Estas definiciones deben leerse a la luz del resto de la descripción y entenderse desde la perspectiva de un experto en la técnica. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente cualquier persona con experiencia ordinaria en la técnica.

Los artículos "un" y "uno/a" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos a uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El término "biodisponible" está reconocido en la técnica y se refiere a una forma de la presente invención que permite que una porción de la cantidad administrada sea absorbida, incorporada o esté fisiológicamente disponible para el sujeto o paciente a quien se le administra.

Los términos "comprende" y "que comprende" se usan en sentido abierto e inclusivo, lo que significa que se pueden incluir elementos adicionales.

La expresión "que incluye" se usa en este documento para significar "que incluye, pero sin limitar".

"Que incluye" y "que incluye, pero sin limitar" se usan indistintamente.

El término "mamífero" es conocido en la técnica, y los mamíferos ejemplares incluyen seres humanos, primates, bovinos, porcinos, caninos, felinos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas).

Un "paciente", "sujeto" o "huésped" a ser tratado por el método objeto puede significar un animal humano o no humano.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" está reconocida en la técnica y se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos, relativamente no tóxicas, de compuestos que incluyen, por ejemplo, los contenidos en las composiciones de la presente invención.

El término "tratar" está reconocido en la técnica y se refiere a curar, así como a mejorar, al menos un síntoma de cualquier condición o trastorno.

La "infusión de disolvente" es un proceso que incluye disolver uno o más lípidos en una cantidad pequeña, preferiblemente mínima, de un disolvente compatible con el proceso para formar una suspensión o solución de lípidos (preferiblemente una solución) y luego inyectar la solución en un medio acuoso que contiene agentes bioactivos. Típicamente, un disolvente compatible con el proceso es aquel que se puede lavar en un proceso acuoso, como la diálisis. La composición que tiene un ciclo de frío/calor se forma preferiblemente mediante infusión de disolvente, prefiriéndose la infusión de etanol. Los alcoholes son preferidos como disolventes. La "infusión de etanol", un tipo de infusión de disolvente, es un proceso que incluye disolver uno o más lípidos en una cantidad pequeña, preferiblemente mínima, de etanol para formar una solución lipídica y luego inyectar la solución en un medio acuoso que contiene agentes bioactivos. Una "pequeña" cantidad de disolvente es una cantidad compatible con la formación de liposomas o complejos lipídicos en el proceso de infusión.

Un "sistema de transporte de matriz hidrófoba" es la mezcla de lípido/disolvente producida por el proceso de infusión de disolvente descrito anteriormente.

Se describe en este documento una nueva forma de compuesto de platino activo complejo con lípidos, que permite altas concentraciones del compuesto de platino en la composición. Por ejemplo, la concentración a temperatura ambiente de cisplatino en la composición es más alta, por ejemplo, más de 1,2 mg/mL, en comparación con 1 mg/mL de la solución acuosa del compuesto de platino activo. En algunas realizaciones, el compuesto de platino activo complejo con lípidos comprende una bicapa lipídica, en la que la bicapa lipídica encapsula o atrapa al compuesto de platino.

En algunas realizaciones, la composición comprende un compuesto de platino activo complejo con lípidos, en el que el complejo tiene una relación de lípido a fármaco de menos de aproximadamente 1 en peso. Por ejemplo, la relación L/D puede ser de aproximadamente 0,10 a 1 en peso, en donde el compuesto de platino activo complejo con lípidos comprende al menos un lípido y al menos un compuesto de platino activo. En algunas realizaciones, la relación de lípido a fármaco es de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,50 en peso. En algunas realizaciones, la relación de lípido a fármaco es de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,45 en peso, y en

otras realizaciones, la relación de lípido a fármaco es de aproximadamente 0,20 a 0,40 en peso. En algunas realizaciones, la relación de lípido a fármaco es de aproximadamente 0,2 en peso.

5 El compuesto de platino activo complejoado con lípidos puede tener un diámetro ponderado en volumen promedio de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 micrómetros. En algunas realizaciones, el diámetro ponderado en volumen promedio es de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 micrómetros, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 micrómetros. En otras realizaciones, el diámetro ponderado en volumen promedio es de aproximadamente 3, 4, 5 ó 6 micrómetros.

10 En algunas realizaciones, la concentración del compuesto de platino activo en la composición es mayor que aproximadamente 1,2 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente de 1,2 a aproximadamente 20 mg/ml. En otras realizaciones, la concentración del compuesto de platino activo es de aproximadamente 1,2 a 10 mg/ml, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4 mg/ml, o de aproximadamente 3,0 a 2,5 mg/ml. En otras realizaciones, la concentración es aproximadamente 2, aproximadamente 3 o aproximadamente 5 mg/ml.

15 En algunas realizaciones, la composición que comprende el compuesto de platino activo complejoado con lípidos comprende además un liposoma. Como se explica con mayor detalle en los ejemplos a continuación, el liposoma comprende al menos un lípido. El lípido puede ser igual o diferente al lípido en el compuesto de platino activo complejoado con lípidos. En algunas realizaciones, el liposoma comprende además un compuesto de platino activo, en el que el compuesto de platino activo puede ser igual o diferente del compuesto de platino activo del compuesto de platino activo complejoado con lípidos. El compuesto de platino activo puede estar atrapado en el liposoma.

20 En algunas realizaciones, los liposomas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 micrómetro, de 0,1 a aproximadamente 0,5 micrómetros, de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5 micrómetros, o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,3 micrómetros.

25 Cuando la composición lipídica comprende además un liposoma, el compuesto de platino activo complejoado con lípidos puede contener aproximadamente del 70 a aproximadamente el 100% del compuesto de platino activo total en la composición. En otras realizaciones, el compuesto de platino activo complejoado con lípidos contiene de aproximadamente 75 a aproximadamente 99%, de aproximadamente 75 a aproximadamente 95%, o de aproximadamente 80 a aproximadamente 90% del compuesto de platino activo total en la composición. En algunas realizaciones, el liposoma contiene de aproximadamente 0 a aproximadamente 30% del total del compuesto de platino activo en la composición. En otras realizaciones, el liposoma puede contener de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 25%, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20%, o de aproximadamente 5 a 10% del total del compuesto de platino activo.

30 Cuando la composición comprende además un liposoma, el compuesto de platino activo complejoado con lípidos puede contener de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5% del lípido total en la composición. En algunas realizaciones, el compuesto de platino activo complejoado con lípidos contiene de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 3%, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2% del lípido total. En algunas realizaciones, el liposoma contiene de aproximadamente 75 a aproximadamente 99,5%, de aproximadamente 80 a aproximadamente 95%, o de aproximadamente 85 a aproximadamente 95% del lípido total en la composición.

35 Cuando está presente en la composición, el liposoma puede tener una relación de lípido a compuesto de platino activo de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 400:1 en peso. En otras realizaciones, la relación de lípido a compuesto de platino activo del liposoma es de aproximadamente 200:1 a aproximadamente 400:1, de aproximadamente 200: a 300:1, de aproximadamente 250:1 a 300:1 o de aproximadamente 250:1 en peso.

40 En algunas realizaciones, la composición que comprende un compuesto de platino activo complejoado de lípidos y un liposoma tiene una concentración de compuesto de platino activo superior a aproximadamente 1,2 mg/ml, por ejemplo, la concentración puede ser de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4 mg/ml, o de aproximadamente 3,0 a 2,5 mg/ml. En otras realizaciones, la concentración es aproximadamente 2, aproximadamente 3 o aproximadamente 5 mg/ml.

45 Un compuesto de "platino activo" es un compuesto que contiene platino coordinado y que tiene actividad antineoplásica. Los compuestos de platino activos adicionales incluyen, por ejemplo, carboplatino y compuestos de platino DACH tales como oxaliplatino. En ciertas realizaciones, los compuestos de platino activos en la composición se seleccionan del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, iproplatino, tetraplatino, transplatino, JM118 (cis-aminodicloro(ciclohexilamina)platino (II)), JM149 (cisaminodicloro(ciclohexilamina)-trans-dihidroxiplatino (IV)), JM216 (bis-acetato-cis-aminodicloro(ciclohexilamina)platino (IV)) y JM335 (trans-aminodicloro(ciclohexilamina)dihidroxiplatino(IV)). En algunas realizaciones, el compuesto de platino activo es cisplatino, transplatino, carboplatino u oxaliplatino, mientras que, en otras realizaciones, el compuesto de platino activo es cisplatino.

55 En ciertas realizaciones, el compuesto de platino activo se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, iproplatino, tetraplatino, transplatino, JM118 (cis-aminodicloro(ciclohexilamina)platino(II)),

JM149 (cis-aminodicloro(ciclohexilamina)-trans-dihidroxiplatino(IV)), JM216 (bis-acetato-cis-aminodicloro(ciclohexilamina)platino(IV)) y JM335 (trans-aminodicloro(ciclohexilamina)dihidroxiplatino(IV)). En algunas realizaciones, el compuesto de platino activo es cisplatino, transplatino, carboplatino u oxaliplatino, mientras que en otras realizaciones, el compuesto de platino activo es cisplatino.

5 Los lípidos utilizados en la presente descripción pueden ser lípidos sintéticos, semisintéticos o naturales, incluyendo fosfolípidos, tocoferoles, esteroides, ácidos grasos, glicolípidos, lípidos cargados negativamente, lípidos catiónicos. En términos de fosfolípidos, pueden incluir lípidos tales como fosfatidilcolina de huevo (EPC), fosfatidilglicerol de huevo (EPG), fosfatidilinositol de huevo (EPI), fosfatidilserina de huevo (EPS), fosfatidiletanolamina (EPE) y ácido fosfatídico (EPA); las contrapartes de soja, fosfatidilcolina de soja (SPC); SPG, SPS, SPI, SPE y SPA; los homólogos de huevo y soja hidrogenados (p. ej., HEPC, HSPC), fosfatidiletanolaminas estéricamente modificados, derivados del colesterol, carotinoides, otros fosfolípidos formados por enlaces éster de los ácidos grasos en las posiciones 2 y 3 de glicerol que contienen cadenas de 12 a 26 átomos de carbono y diferentes grupos de cabeza en la posición 1 del glicerol que incluyen colina, glicerol, inositol, serina, etanolamina, así como los ácidos fosfatídicos correspondientes. Las cadenas en estos ácidos grasos pueden ser saturadas o insaturadas, y el fosfolípido puede estar compuesto de ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena y diferentes grados de insaturación. En particular, las composiciones de las formulaciones pueden incluir DPPC, un constituyente principal del surfactante de pulmón natural. Otros ejemplos incluyen dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) y diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), dioleilfosfatidil-etanolamina (DOPE) y fosfolípidos mixtas como palmitoilestearoilfosfatidil-colina (PSPC) y palmitoilestearoilfosfatidilglicerol (PSPG), triacilglicerol, diacilglicerol, seranida, esfingosina, esfingomielina y fosfolípidos simples acilados como mono-oleoil-fosfatidiletanolamina (MOPE).

En algunas realizaciones, el compuesto de platino activo complejado con lípidos comprende un fosfolípido neutro, tal como una fosfatidilcolina. En otras realizaciones, la fosfatidilcolina es DPPC.

En algunas realizaciones, el compuesto de platino activo complejado con lípidos comprende además un esteroil. En algunas realizaciones, el esteroil es el colesterol.

Los lípidos cargados negativamente incluyen PGs, PAs, PSs y Pls. En algunas realizaciones, el compuesto de platino activo complejado con lípidos no comprende una fosfatidil serina (PS). En algunas realizaciones, el compuesto de platino activo complejado con lípidos no comprende un PG, PA, PS o Pl. En otras realizaciones, el compuesto de platino activo complejado con lípidos está sustancialmente libre de fosfolípidos cargados negativamente. En algunas realizaciones, el compuesto de platino activo complejado con lípidos no comprende ningún fosfolípido cargado negativamente.

En algunas realizaciones, el compuesto de platino activo complejado con lípidos comprende DPPC y colesterol en una relación de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1 en peso. En otras realizaciones, el compuesto de platino activo complejado con lípidos comprende DPPC y colesterol en una relación de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 4:1 en peso. En algunas realizaciones, el compuesto de platino activo complejado con lípidos comprende DPPC y colesterol en una proporción de aproximadamente 2,25:1 en peso.

Otro aspecto de la invención se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden una cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La formulación farmacéutica del compuesto de platino activo complejado con lípidos puede comprender una dispersión acuosa de liposomas. La formulación puede contener excipientes lipídicos que forman los liposomas, y sales/tampones para proporcionar la osmolaridad y el pH apropiados. El excipiente farmacéutico puede ser un líquido, diluyente, disolvente o material de encapsulación, involucrado en llevar o transportar cualquier composición del sujeto o componente de ésta desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada excipiente debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con la composición objeto y sus componentes y no ser perjudicial para el paciente. Los excipientes adecuados incluyen trehalosa, rafinosa, manitol, sacarosa, leucina, trileucina y cloruro de calcio. Ejemplos de otros excipientes adecuados incluyen (1) azúcares, tales como lactosa y glucosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica está adaptada para la inhalación o inyección en un paciente.

El procedimiento para producir esta formulación de compuesto de platino activo puede comprender mezclar un compuesto de platino activo con una matriz hidrófoba apropiada y someter la mezcla a uno o más ciclos para establecer dos temperaturas separadas. Por ejemplo, el procedimiento comprende los pasos de: (a) combinar un compuesto de platino activo y un sistema de transporte de matriz hidrófoba; (b) establecer la mezcla a una primera

temperatura; y (c) posteriormente, establecer la mezcla a una segunda temperatura, cuya segunda temperatura es más fría que la primera temperatura. La etapa (b) se efectúa típicamente con calentamiento, mientras que la etapa (c) se efectúa típicamente con enfriamiento. En realizaciones alternativas, los ciclos se cuentan comenzando con el paso más frío, pasando al paso más caliente y cerrando los dos pasos. El proceso puede comprender la repetición secuencial de los pasos (b) y (c) para un total de dos o tres o más ciclos. La solución de compuesto de platino activo se puede producir disolviendo el compuesto de platino activo en una solución salina para formar una solución de platino. El sistema de transporte de matriz hidrófoba comprende favorablemente liposomas o lípidos formadores de complejos lipídicos. El procedimiento para preparar un agregado de platino puede comprender, además, después de que se hayan completado todas las etapas (b) y (c): (d) eliminar el compuesto de platino activo no atrapado filtrando a través de una membrana con un corte de peso molecular seleccionado para retener los liposomas o complejos lipídicos deseados y agregar un líquido compatible con liposomas o complejos lipídicos para lavar el compuesto de platino activo no atrapado.

El cisplatino, por ejemplo, forma grandes agregados cristalinos en solución acuosa con un diámetro de cristal mayor que unos pocos micrómetros. En presencia de un sistema de matriz anfipática, como una bicapa lipídica, se forman pequeños agregados de cisplatino. Por ejemplo, los agregados pueden formarse en la región del núcleo de hidrocarburo de una bicapa lipídica o formarse de tal manera que una bicapa lipídica rodee el agregado. Durante el ciclo de calentamiento del proceso, se cree que el cisplatino se devuelve a la solución a una mayor velocidad en las regiones acuosas de la mezcla del proceso que en las bicapas. Como resultado de la aplicación de más de un ciclo de frío/calor, el cisplatino se acumula aún más en la región central de las bicapas lipídicas o dentro de la bicapa lipídica. Sin limitar la invención a la teoría propuesta, la experimentación indica que los agregados de cisplatino hacen que el entorno inmediato de la región de bicapa interfacial sea más hidrófobo y compacto. Esto da como resultado un alto nivel de atrapamiento del compuesto de platino activo a medida que se repiten los ciclos de enfriamiento y calentamiento.

La formulación resultante tiene un porcentaje de atrapamiento marcadamente alto. Se ha demostrado que el atrapamiento, en algunos casos, alcanza casi el 92%. Esta cantidad es mucho más alta que el atrapamiento más eficiente que se espera de un atrapamiento acuoso convencional que es aproximadamente de 2 a 10% de atrapamiento. Esta eficiencia de la presente invención se demuestra en el ejemplo 3.

En una realización, el procedimiento comprende combinar el agente bioactivo con un sistema de transporte de matriz hidrófoba y ciclar la solución entre una temperatura más cálida y una más fría. Preferiblemente, el ciclado se realiza más de una vez. Más preferiblemente, el paso se realiza dos o más veces, o tres o más veces. La porción de temperatura más fría del ciclo puede, por ejemplo, usar una temperatura de aproximadamente 35°C o menos, 25°C o menos, 20°C o menos, 15°C o menos, 10°C o menos, o 5°C o menos. En algunas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente -25°C a aproximadamente 35°C, de aproximadamente -5 a aproximadamente 25°C, de aproximadamente -5 a aproximadamente 20°C, de aproximadamente -5 a aproximadamente 10°C, de aproximadamente -5 a aproximadamente 5°C, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5°C.

En algunas realizaciones, la temperatura de la etapa de calentamiento es de 50°C o superior. Las temperaturas también se pueden seleccionar para que estén por debajo y por encima de la temperatura de transición para un lípido en la composición lipídica. En algunas realizaciones, la etapa de calentamiento comprende calentar el recipiente de reacción entre aproximadamente 4 y aproximadamente 70°C, entre aproximadamente 45 y aproximadamente 55°C. Los intervalos de temperatura anteriores son particularmente preferidos para su uso con composiciones lipídicas que comprenden predominantemente difosfatidicolina (DPPC) y colesterol.

Para una mejor fabricación, y para asegurarse de que se establece la temperatura deseada, los pasos más fríos y más cálidos se pueden mantener durante un período de tiempo, por ejemplo, de aproximadamente 5 a 300 minutos o de 30 a 60 minutos.

Otra forma de considerar el ciclo de temperaturas es en términos del diferencial de temperaturas entre los pasos de calentamiento y enfriamiento del ciclo. Este diferencial de temperaturas puede ser, por ejemplo, aproximadamente 25°C o más, como un diferencial de aproximadamente 25 a aproximadamente 70°C, o un diferencial de aproximadamente 40 a aproximadamente 55°C.

Las temperaturas de los pasos de calentamiento y enfriamiento se seleccionan sobre la base del aumento del atrapamiento del compuesto de platino activo. Sin estar limitado por ninguna teoría particular, se cree que es útil seleccionar una temperatura superior efectiva que aumente sustancialmente la solubilidad del compuesto de platino activo en la mezcla del proceso. Durante el enfriamiento/calentamiento repetitivo, los agentes bioactivos se solubilizan y se cristalizan repetitivamente. A medida que se enfría el fármaco soluble, alguna porción entra en los complejos con el lípido, mientras que el resto precipita. En el calentamiento posterior, el agente bioactivo no encapsulado que se cristaliza vuelve a ser soluble. Es importante destacar que el compuesto de platino activo que se ha encapsulado en el complejo lipídico permanece sustancialmente en el complejo lipídico durante el ciclo de calentamiento y enfriamiento (por ejemplo, se fuga a una velocidad tan lenta que no abandona el complejo lipídico durante la fase de calentamiento de este proceso).

Por ejemplo, a medida que aumenta la temperatura durante la etapa de calentamiento del ciclo, el compuesto de platino activo, como el cisplatino, se disuelve. Durante la etapa de enfriamiento, el cisplatino en la fase acuosa precipita de la solución en mayor medida que el cisplatino asociado con las bicapas lipídicas, lo que aumenta la cantidad de cisplatino asociado con lípidos con cada ciclo de calentamiento y enfriamiento. Además, la solubilidad del cisplatino es altamente dependiente de la temperatura. Por ejemplo, la Fig. 1A representa un gráfico de la temperatura de transición del cisplatino precipitado disuelto en solución acuosa en función de la concentración de cisplatino durante el calentamiento (donde el cisplatino está inicialmente precipitado). La Fig. 1C representa un gráfico de la temperatura de transición a la cual precipita el cisplatino acuoso durante el enfriamiento (donde el cisplatino se disuelve inicialmente). La reducción de 15°C en la temperatura de una solución de cisplatino disminuye la concentración soluble en aproximadamente un 50%. En otras palabras, la concentración que limita la solubilidad aumenta al aumentar la temperatura en aproximadamente un 3% por grado de aumento de la temperatura del cisplatino acuoso. Además, la temperatura de transición del agregado (cristal) al monómero (temperatura de solubilización) es más alta que la temperatura de transición del monómero al agregado (cristal) (temperatura de cristalización) entre aproximadamente 15 y 20°C.

Gráficos similares para otro compuesto de platino activo, transplatino, se representan en las Figs. 1B y 1D, que muestran propiedades de solubilidad similares a las del cisplatino. La solubilidad del transplatino es más pobre que el cisplatino, pero también es dependiente de la temperatura. Al disminuir la temperatura en aproximadamente 15°C, se reduce la concentración soluble del transplatino en aproximadamente un 50%. La temperatura de transición del agregado (cristal) al monómero (temperatura de solubilización) es más alta que la temperatura de transición del monómero al agregado (cristal) (temperatura de cristalización) de aproximadamente 20 a 30°C.

Los resultados experimentales indican claramente que el estado físico del cisplatino es sólido (agregados) o unido a lípidos, ya que la concentración del cisplatino es mucho mayor que el límite de solubilidad. Los resultados indican además que el procedimiento no requiere la congelación de las composiciones, pero que el enfriamiento a una temperatura más alta que el punto de congelación del agua es efectivo. Los resultados indicaron además que la eficiencia de atrapamiento lograda por 3 ciclos era similar a la lograda por los ciclos de enfriamiento y calentamiento de 6 ciclos, lo que indicaba que 3 ciclos de tratamiento térmico eran suficientes para lograr altos niveles de atrapamiento del compuesto de platino activo.

Los resultados indican además que el procedimiento se puede ampliar a la vez que aumenta la eficiencia del proceso para atrapar al cisplatino. Por lo tanto, la descripción proporciona además procedimientos que se llevan a cabo para proporcionar una cantidad adaptada para la administración total (en incrementos de volumen más apropiados) de 200 o más mL, 400 o más mL, o 800 o más mL. Todo lo demás es lo mismo, se cree que los volúmenes de producción más grandes generalmente logran una mayor eficiencia respecto a los procesos de menor escala. Si bien ese volumen es el apropiado para la administración, se reconocerá que el volumen puede reducirse para el almacenamiento.

Los resultados indican además que el cisplatino complejado con lípidos producido por el método de la invención puede retener el cisplatino atrapado con una fuga mínima durante más de un año. Esta es una demostración adicional de la singularidad en la formulación, que indica que el cisplatino está unido dentro de la estructura del liposoma y no está libre para filtrarse fácilmente.

El procedimiento de la presente descripción puede comprender además separar los componentes del producto del procedimiento mencionado anteriormente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el procedimiento proporciona tanto el compuesto de platino activo complejado con lípidos mencionado anteriormente como el liposoma mencionado anteriormente. En ciertas realizaciones, la porción del producto que comprende el compuesto de platino activo complejado con lípidos, referida en este documento como "la fracción pesada" puede separarse de la porción que comprende el liposoma, referida en este documento como "la fracción ligera". Los métodos de separación incluyen permitir que el producto pesado se asiente durante un período de tiempo, o centrifugar el producto.

Ejemplo 1

Se disolvieron 70 mg de DPPC y 28 mg de colesterol en 1 ml de etanol y se agregaron a 10 ml de 4 mg/ml de cisplatino en una solución salina al 0,9%.

(i) Una alícuota (50%) de la muestra se trató con 3 ciclos de enfriamiento a 4°C y calentamiento a 50°C. La parte alícuota, en un tubo de ensayo, se enfrió mediante refrigeración y se calentó en un baño de agua. El cisplatino no atrapado resultante (cisplatino libre) se lavó mediante diálisis.

(ii) El resto de la muestra no se trató mediante ciclos de temperaturas y se lavó directamente mediante diálisis.

Tabla 1: Porcentaje de atrapamiento del cisplatino con y sin enfriamiento y ciclos de calentamiento.

| | Concentración final de cisplatino, µg/mL | % de atrapamiento |
|--|--|-------------------|
| Cisplatino complejo de lípidos sin ciclos de enfriamiento y calentamiento | 56 | 1,4 |
| Cisplatino complejo de lípidos después de los ciclos de enfriamiento y calentamiento | 360 | 9,0 |

Ejemplo 2

La rigidez de una bicapa lipídica en el cisplatino complejo de lípidos preparado con ciclos de frío/calor (cisplatino "HLL" o cisplatino "liposómico de carga alta") como se describe en el Ejemplo 1 se midió por anisotropía de fluorescencia de difenilhexatrieno (sonda de membrana) insertado en la región central hidrófoba de la bicapa. [Ref. Jahng, F., 1979 Proc. Natl Acad Sci. USA 76 (12): 6361]. La hidratación de las bicapas se midió por el efecto de intercambio de isótopos de deuterio sobre la intensidad de fluorescencia de TMA-DPH (trimetilamina-difenilhexatrieno). [Ref. Ho, C., Slater, SJ y Stubbs, C.D., 1995 Biochemistry 34: 6188.]

Tabla 2: Grado de hidratación y rigidez de los liposomas, cisplatino complejo con lípidos sin ciclos de frío/calor y HLL cisplatino.

| | Placebo (liposomas sin cisplatino) | Cisplatino complejo con lípidos sin ciclos de enfriamiento y calentamiento | HLL cisplatino |
|-------------------------------|------------------------------------|--|----------------|
| Grado de rigidez de la bicapa | 0,29 | 0,29 | 0,36 |
| Grado de hidratación bicapa | 1,13 | 1,15 | 1,02 |

Ejemplo 3

Se disolvió 1,0 g DPPC y 0,4 g de colesterol en 6 ml de etanol. Se disolvieron 60 mg de cisplatino en 10 ml de solución salina al 0,9% a 65°C. Se añadió 1 ml de la solución de mezcla lipídica resultante a 10 ml de la solución de cisplatino resultante. La suspensión de lípido/cisplatino se enfrió a aproximadamente 4°C y se mantuvo a esa temperatura durante 20 min y se calentó a 50°C y se mantuvo a esa temperatura durante 20 min. El etanol se eliminó burbujando gas N₂ en la suspensión durante el período de calentamiento. Las etapas de enfriamiento y calentamiento se repitieron 5 veces más.

Tabla 3: Atrapamiento de cisplatino.

| | Concentración de cisplatino total (mg/ml) | % de cisplatino atrapado | Fármaco:lípido (en peso) |
|----------------|---|--------------------------|--------------------------|
| HLL Cisplatino | 5,8 | 91,6 | 1:26 |

Ejemplo 4

Se preparó una formulación lipídica de cisplatino usando fosfatidilcolina (PC) y colesterol (en una proporción de 57:43 mol). Se disolvieron 0,55 mmoles de PC y 0,41 mmoles de colesterol en 2 ml de etanol y se agregaron a 20 ml de 4 mg/ml de solución de cisplatino. Una parte alícuota (50%) de cada muestra se trató con 3 ciclos de enfriamiento y calentamiento y luego se lavó mediante diálisis. Otra parte de cada muestra fue lavada directamente por diálisis. El atrapamiento se estimó a partir de la relación entre la concentración final y la concentración inicial.

Tabla 4: Atrapamiento y relación de fármaco a lípido para cisplatino con varias fosfatidilcolinas.

| PC | Sin enfriamiento ni calentamiento | | | Enfriamiento y calentamiento | | |
|-------|-----------------------------------|-------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------|--------------------------|
| | Cisplatino (mg/mL) | % de atrapamiento | Fármaco:lípido (en peso) | Cisplatino (mg/mL) | % de atrapamiento | Fármaco:lípido (en peso) |
| DOPC | 0,16 | 4,0 | 1:142 | 0,21 | 5,3 | 1:108 |
| EggPC | 0,09 | 2,3 | 1:247 | 0,12 | 3,0 | 1:185 |

| | | | | | | |
|------|------|-----|-------|------|------|------|
| DMPC | 0,15 | 3,8 | 1:123 | 0,24 | 6,0 | 1:77 |
| DPPC | 0,17 | 4,3 | 1:115 | 0,85 | 21,3 | 1:23 |
| HSPC | 0,11 | 2,8 | 1:202 | 0,23 | 5,8 | 1:97 |
| DSPC | 0,10 | 2,5 | 1:184 | 0,58 | 14,5 | 1:32 |

Ejemplo 5

5 Se disolvió una formulación lipídica (DPPC:colesterol en una proporción de 5:2 p/p) en etanol y se añadió a una solución de cisplatino. Parte de la formulación fue tratada por ciclos de enfriamiento a 4°C y ciclos de calentamiento a 55°C, mientras que una parte no fue tratada así. La suspensión de lípido/cisplatino se lavó luego por diálisis.

Tabla 5: Concentración de cisplatino con y sin ciclos de enfriamiento y calentamiento.

| Concentración de cisplatino de partida | Concentración de lípidos | Ciclos de enfriamiento y calentamiento | Concentración total de cisplatino |
|--|--------------------------|--|-----------------------------------|
| 0,2 mg/mL | 1,4 mg/mL | No | No Detectable |
| 0,2 mg/mL | 1,4 mg/mL | Sí | No Detectable |
| 4,0 mg/mL | 28 mg/mL | No | 0,22 mg/mL |
| 4,0 mg/mL | 28 mg/mL | Sí | 0,46 mg/mL |

Ejemplo 6: Determinación del volumen capturado de las vesículas de cisplatino de la invención

10 El objetivo era determinar la naturaleza del cisplatino atrapado en los liposomas (cisplatino HLL) mediante la determinación de la concentración del cisplatino atrapado dentro del liposoma.

$$V_{total} = V_{liposoma} + V_{externo}$$

Tabla 6: [Medición del $V_{liposoma}$]

| | Abs a 450nm | [dicromato] | $V_{externo}$ | $V_{liposoma}$ |
|----------------------|-------------|-------------|---------------|----------------|
| Cisplatino HLL | 0,874 | 0,67 mg/mL | 1,88 mL | 0,12 mL |
| Solo solución salina | 0,822 | 0,60 mg/mL | 2 mL | 0 mL |

15 Método: 1) 2 mL de cisplatino HLL preparado como se describe en el Ejemplo 4 se concentraron mediante un kit de filtro de centrifugación. 2) Se recuperaron 0,8 ml de la muestra concentrada y se agregaron 1,2 ml de dicromato de 1 mg/ml para recuperar el volumen original. También se prepararon 0,8 ml de solución salina normal + 1,2 ml de dicromato como control. 3) La Abs se midió a 450 nm para detectar la diferencia en la concentración de dicromato. Para evitar la turbidez de la muestra de liposomas, ambas muestras se filtraron por filtración centrífuga. Resultado: el 6% del volumen total estuvo ocupado por liposomas.

20 $V_{liposoma} = 1,53 \mu\text{l}/\mu\text{moles}$ de lípidos (lípido total 39,3 mM)

A continuación, $V_{liposoma} = V_{capturado} + V_{bicapa}$

Para estimar el V_{bicapa} , se determinó la laminaridad de las vesículas de cisplatino HLL.

Medición de la laminaridad de las vesículas de cisplatino HLL:

| | F_{total} | $F_{interior}$ | % lípido sonda en la capa más externa* |
|---|-------------|----------------|--|
| Intensidad de fluorescencia | 14193 | 11349 | 20 |
| *% lípido sonda en la capa más externa = $(F_{total} - F_{interior}) \times 100 \div F_{total}$ | | | |

25 Método: las vesículas de cisplatino se prepararon con el método del Ejemplo 9, que se describe a continuación (1 litro de lote) modificado para agregar 0,5% en peso de lípido de la sonda de fluorescencia (NBD-PE). Esta sonda lipídica se distribuye uniformemente en la membrana interior y exterior. La proporción de la cantidad de sondas ubicadas en la capa más externa de la membrana (superficie del liposoma) en comparación con el resto de las

sondas se determina para estimar cuántas capas de lípidos existen en el cisplatino HLL. La relación entre las sondas ubicadas en la superficie del liposoma y las sondas ubicadas dentro del liposoma se determinó agregando un agente reductor ditionito para apagar solo las sondas de superficie. Luego, la extinción total se logró mediante la ruptura del liposoma con detergente.

5 Resultado: la capa exterior de la bicapa contiene el 40% del total de lípidos.

Según el cálculo geométrico, el % de lípidos en la capa más externa de la bicapa sería del 52% y del 36% para las vesículas bi-lamelares y tri-lamelares, respectivamente. Por lo tanto, se concluyó que la laminaridad promedio del HLL Cisplatino era tres.

10 Suponiendo a las vesículas tri-lamelares, la proporción de $V_{liposoma}/V_{capturado}$ se calculó que era 1,2635. Por lo tanto, el volumen capturado fue:

$$V_{capturado} = V_{liposoma} \div 1,2635 = 1,53 \mu\text{L}/\mu\text{moles de lípidos} \div 1,2635 = 1,21 \mu\text{L}/\mu\text{moles de lípido} = 1,21 \mu\text{L}/\mu\text{moles de lípidos} \times 39,3 \text{ mM (concentración total de lípidos)} = 47,6 \mu\text{L}/\text{ml}$$

15 El volumen capturado fue de 47,6 μl por cada ml de cisplatino HLL y 4,76% del volumen total. Si se supone que el cisplatino atrapado está en un compartimento acuoso de liposomas, se estimará que su concentración local de cisplatino es de 21,0 mg/ml. Esta concentración no solo fue más alta que el límite de solubilidad del cisplatino a temperatura ambiente, sino que fue mucho más alta que la concentración de carga inicial (4 mg/ml).

Ejemplo 7: Efecto de la temperatura de enfriamiento en la eficiencia de atrapamiento del cisplatino HLL

20 El objetivo fue encontrar una temperatura de enfriamiento óptima para el atrapamiento más alto de cisplatino y evitar la congelación y descongelación. Se prepararon 20 mg/ml de DPPC, 8 mg/ml de colesterol y 4 mg/ml de suspensión de cisplatino mediante infusión de etanol. La muestra se dividió en tres partes alícuotas iguales que se trataron mediante 6 ciclos de enfriamiento y calentamiento utilizando tres temperaturas de enfriamiento diferentes. Después de un tratamiento de ciclos de temperatura, las muestras se dializaron para eliminar el cisplatino libre. Los datos resultantes (Tabla 7) ayudan a optimizar el procedimiento de fabricación.

Tabla 7: Efecto de la temperatura de enfriamiento.

| Tratamiento térmico posterior a la infusión | Temperatura real de la muestra | Ciclos de enfriamiento y calentamiento | [Cisplatino] mg/mL | % Atrapamiento |
|---|--------------------------------|---|--------------------|----------------|
| Baño de hielo seco (-70°C) | Congelada | 6 ciclos de enfriamiento de 15 min frío y calentamiento de 15 min | 0,34 | 8,5 |
| Congelador (-20°C) | 0°C | 6 ciclos de enfriamiento de 15 min frío y calentamiento de 15 min | 0,98 | 24,5 |
| Baño de hielo (1°C) | 4°C | 6 ciclos de enfriamiento de 15 min frío y calentamiento de 15 min | 0,63 | 15,8 |

25

Ejemplo 8: Efecto del número de ciclos de temperatura en la eficiencia de atrapamiento

30 Para determinar un número óptimo de ciclos de temperatura para el atrapamiento más eficiente de cisplatino (Tabla 8). Las muestras se prepararon como en el ejemplo anterior. Al enfriar, la temperatura de las muestras fue de 0°C. El ciclo de temperatura se realizó mediante un enfriamiento de 15 minutos y un calentamiento de 15 minutos. La concentración inicial de cisplatino fue de 4 mg/ml y el cisplatino libre se eliminó mediante diálisis.

Tabla 8: Efecto del número de ciclos de temperatura.

| Cantidad de ciclos | Pocos lípidos (7,5 mg/ml de DPPC y 3 mg/ml de colesterol) | | Muchos Lípidos (12,5 mg/ml de DPPC y 5 mg/ml de colesterol) | |
|--------------------|---|----------------|---|----------------|
| | [cisplatino] | % Atrapamiento | [cisplatino] | % Atrapamiento |
| 0 | 0,05 mg/mL | 1,3 | 0,21 mg/mL | 5,3 |
| 1 | 0,11 mg/mL | 2,8 | 0,23 mg/mL | 5,8 |
| 3 | 0,39 mg/mL | 9,8 | 0,88 mg/mL | 22 |

Ejemplo 9

Escala de lotes y eficiencia del procedimiento

Para determinar si la eficiencia del atrapamiento cambiaba al cambiar el tamaño del lote. Un lote de 20 ml se preparó como se describe en el ejemplo 4. Un lote de 1 L se preparó como se indica en los siguientes pasos:

- 5 1. Se disolvieron cuatro gramos de cisplatino en 1 litro de cloruro de sodio al 0,9% de grado de inyección a 65°C.
2. Se disolvieron 20 gramos de DPPC y 8 gramos de colesterol en 120 ml de etanol absoluto a 65°C.
3. Mientras se mezclaba la solución de cisplatino a 300 rpm (65°C), la solución de lípidos se dosificó (infundió) en la solución de cisplatino a un caudal de 20 ml/min.
- 10 4. Después de la infusión, la dispersión de cisplatino/lípido se enfrió de -5°C a 0°C utilizando un baño de propilenglicol/agua y se mantuvo durante 45 minutos (enfriamiento).
5. La dispersión se calentó hasta 50°C y se mantuvo durante 15 minutos (calentamiento).
6. El ciclo de enfriamiento/calentamiento descrito en los pasos 4 y 5 se realizó dos veces más (total de tres ciclos).
7. La dispersión se lavó para eliminar el cisplatino libre mediante diafiltración. La velocidad de eliminación del permeado fue de 17-22 ml/min. El volumen de dispersión (1 l) se mantuvo constante compensando el permeado con una alimentación de solución de cloruro de sodio al 0,9% recién esterilizada.
- 15

El lote de 200 ml se hizo de la misma manera, pero se empleó un 20% de los componentes. La eficiencia del procedimiento se definió como la proporción de lípido/fármaco (peso/peso) de los ingredientes iniciales dividida por la proporción de lípido/fármaco para el producto final (Tabla 9).

Tabla 9: Eficacia del procedimiento.

| Lote | Tamaño de lote | Preformación lípido/medicamento | Producto final lípido/medicamento | Eficiencia de proceso |
|------|----------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 1 | 20 mL | 4,4 | 54,5 | 0,08 |
| 2 | 200 mL | 5,85 | 27,3 | 0,21 |
| 3 | 200 mL | 5,85 | 37,2 | 0,16 |
| 4 | 200 mL | 5,85 | 36,9 | 0,16 |
| 5 | 1 L | 5,85 | 14,4 | 0,41 |
| 6 | 1L | 7,0 | 19,2 | 0,36 |
| 7 | 1L | 7,0 | 21,2 | 0,33 |

20

Ejemplo 10: Estabilidad del cisplatino complejo de lípidos atrapados

La estabilidad de los lotes de un litro de cisplatino HLL se controló a tiempo para detectar fugas de los contenidos internos. Los datos resultantes se presentan en la FIG. 2.

Ejemplo 11: Caracterización de la densidad de fracciones ligeras y pesadas.

- 25 Las muestras se prepararon como en el ejemplo anterior. Al enfriar, la temperatura de las muestras fue de 0°C. El ciclo de temperaturas se realizó mediante un enfriamiento de 15 minutos y un calentamiento de 15 minutos. La concentración inicial de cisplatino fue de 4 mg/ml y el cisplatino libre se eliminó mediante diálisis.

Análisis del gradiente de densidades

- 30 Se utilizaron siete lotes diferentes de complejo lipídico de cisplatino para estos experimentos. Los gradientes de densidad se formaron utilizando Iodixanol (SIGMA (D1556, lote no. 025K1414)) como medio denso y una solución salina al 0,9% de NaCl para mantener la osmolalidad cerca de los 300 mOsM normales. Primero, se agregaron aproximadamente 5,5 ml de solución salina al tubo de centrifuga, y luego se colocó el mismo volumen de medio pesado (mezcla 1:1 de Iodixanol al 60% y solución salina) en el fondo del tubo con una jeringa con una aguja larga.
- 35 Los gradientes se formaron usando un BioComp 107ip Gradient Master en las configuraciones: tiempo = 2:14 min, ángulo = 79,0, velocidad = 17 rpm y usando la tapa del tubo largo. Se colocó una parte alícuota de muestras del complejo de lípidos de cisplatino (1 ml) en la parte superior del gradiente y se centrifugó durante 30 minutos a 30.000 rpm a 20°C. Después de la centrifugación, se descartó el volumen superior de 0,8-1,0 ml de líquido

transparente, y se recogieron los siguientes 2 ml que representan la fracción ligera. Se cree que la fracción ligera contiene liposomas, en donde al menos algunos de los liposomas están asociados con cisplatino. Hubo una cantidad detectable de cisplatino libre en la fracción ligera de muestras nebulizadas, que se determinó filtrando a través de los dispositivos de filtrado Centricon-30 y se restó del total de cisplatino.

- 5 El resto del medio se eliminó, dejando solo un pequeño gránulo amarillo en el fondo que representaba la fracción densa (pesada), que posteriormente se dispersó en una solución de 2 ml de n-Propanol al 75%, solución salina al 5% y agua al 20%. El cisplatino en la fracción pesada no era completamente soluble en este punto. Se tomó una alícuota de esta dispersión para la determinación del cisplatino. Otra parte de la dispersión (1 ml) se mezcló con un volumen igual al 60% de n-propanol y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm en una centrífuga Eppendorf
10 5810R para sedimentar el cisplatino no disuelto, y luego se utilizó 1 ml de sobrenadante transparente para la determinación de lípidos por HPLC.

Concentración de cisplatino:

- 15 El cisplatino se midió por HPLC separando el cisplatino en la columna YMC-Pack NH2 utilizando una fase móvil de acetonitrilo al 90% y midiendo la absorbancia a 305 nm. Los estándares de cisplatino y las muestras se diluyeron en una solución de 75% de n-propanol, 5% de solución salina y 20% de agua. Los estándares se utilizaron con concentraciones de cisplatino de 75, 50, 25 y 10 µg/ml. El tiempo máximo de retención de cisplatino fue generalmente alrededor de 6,4 min.

Análisis de lípidos por HPLC:

- 20 Los lípidos se analizaron por HPLC de la siguiente manera: los lípidos se separaron en una columna Phenomenex Luna C8 (2) utilizando el modo de gradiente binario. Fase móvil A: metanol 70%, acetonitrilo 20%, agua 10%, acetato de amonio 0,1%, fase móvil B: metanol 70%, acetonitrilo 30%, acetato de amonio 0,07%. Los estándares de lípidos y las muestras se diluyeron en una solución de 60% de n-propanol, 40% de agua. Los lípidos fueron detectados por el detector de dispersión de luz evaporativa Sedex 55. El tiempo de retención para el colesterol fue de aproximadamente 8 min, para DPPC aproximadamente 10 min.

- 25 Preparación de muestras en rejillas recubiertas de carbono para el análisis TEM

- Aproximadamente 50 ml de un lote de complejo lipídico de cisplatino se dejó sedimentar por gravedad durante al menos una semana a 4°C. La fracción blanca frente a la porción que contenía la mayoría de la fracción ligera se eliminó y la fracción marrón amarillenta en la parte inferior se usó para el análisis TEM. Se colocó una pequeña cantidad de muestra (menos de 10 microlitros) en la rejilla recubierta de carbono. La rejilla se colocó en la parte superior de un pedazo de papel de filtro y se hizo girar una centrífuga Eppendorf durante 1 minuto a 500 RPM para eliminar el exceso de agua. Las muestras se secaron al aire durante al menos una hora antes del análisis. Si la centrifugación se realizaba a una velocidad demasiado baja, el agua no se eliminaba lo suficiente y la muestra permanecía demasiado espesa, incluso después del secado, tendiendo a hervir cuando se exponía a alto vacío dentro del microscopio TEM. Las condiciones de centrifugación se ajustaron para que fueran lo suficientemente suaves como para evitar daños en la rejilla o la pérdida de la muestra. Experimentalmente, se encontró que una centrifugación suave a una velocidad de 200-500 x g durante 1 minuto producía muestras de buena calidad con una cantidad suficiente de partículas en la rejilla, pero con un volumen mínimo de agua.

- 40 Para su comparación, se prepararon muestras de cristales de cisplatino (no complejados con un lípido) mediante el siguiente procedimiento: se disolvieron 15 mg de cisplatino en 5 ml de solución salina calentando a 50°C para proporcionar una solución de 3 mg/ml de cisplatino. La solución de cisplatino se sonicó brevemente en un baño maría a temperatura ambiente. A los primeros signos de precipitación y turbidez del cisplatino, se tomó un pequeño volumen con una pipeta y se colocó inmediatamente en una rejilla recubierta de carbono como se describe en el párrafo anterior.

- 45 Las imágenes TEM se obtuvieron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 910 en el Centro de análisis e imágenes de Princeton, Princeton University, Princeton, NJ. Se usó un alto voltaje de aceleración de 100 kV, y las imágenes se capturaron en una cámara con dispositivo de par cargado (CCD) con ampliaciones de 2000 a 25.000 x. Las imágenes TEM del cisplatino complejado con lípidos de fracción pesada se muestran en las Figs. 3A-B. Las partículas ricas en cisplatino fueron lo suficientemente densas en electrones como para verse sin tinción.

- 50 Las imágenes TEM de los cristales de cisplatino que no estaban complejados con un lípido se muestran en las Figs. 4A-B. Los cristales de cisplatino sin complejar aparecen como partículas oscuras de forma rectangular de aproximadamente 2 micrómetros de ancho y de 10 a 20 micrómetros de largo. Se cree que las partículas de cisplatino en el cisplatino complejado de lípidos están rodeadas por una bicapa lipídica y, por lo tanto, no pueden crecer tanto como el cisplatino "libre". Además, el cisplatino en el cisplatino complejado de lípidos no se disuelve en solución salina tras la dilución, lo que sugiere además que el cisplatino está rodeado por una bicapa lipídica.

- 55 Resultados

- 5 Nueve lotes de complejo de lípido-cisplatino se fraccionaron en un gradiente de densidad de Iodixanol como se describe en la sección de Métodos. Las nueve muestras se separaron en una banda blanca de fracción ligera y un sedimento amarillo de fracción densa. Se recogieron 2 ml de la fracción ligera y se eliminó el resto del líquido. El sedimento restante se dispersó en 2 ml de n-propanol al 75%. Las concentraciones de cisplatino y lípidos en cada fracción se midieron por HPLC como se describe. La relación de lípido/cisplatino en la fracción densa fue muy alta, por lo que tanto el lípido como el cisplatino no pudieron solubilizarse en el mismo disolvente a una concentración suficientemente alta para el análisis de lípidos. Por esa razón, la mezcla de lípido-cisplatino en una solución de n-propanol al 75% se centrifugó para eliminar la porción insoluble del cisplatino, y el sobrenadante se usó como tal para el análisis de HPLC de lípidos, como se describe en Métodos.
- 10 Los resultados del análisis del gradiente de densidad se presentan en la Tabla 10. L/D representa la proporción de lípido a cisplatino en peso. Los porcentajes presentados son con respecto al cisplatino o al lípido total en la formulación. La sección inferior de la tabla muestra los promedios del contenido de lípidos y cisplatino en cada fracción derivada de las nueve muestras analizadas. Las desviaciones estándar (SD) se muestran para demostrar la consistencia. Estos datos demuestran que la mayoría de los lípidos (90,6% en promedio, +/- 3,1%) está en la fracción ligera, mientras que solo el 0,87 +/- 0,09% de lípidos está en la fracción densa. La mayoría del cisplatino (82,3 +/- 2,9%) está en la fracción densa, mientras que solo el 8,4 +/- 2,1% está en la fracción ligera. La relación de lípido a fármaco (L/D) calculada para la muestra total fue de un promedio de 22,7. La misma relación L/D en las fracciones separadas fue tan alta como 255 +/- 47 para la fracción ligera, y tan baja como 0,24 +/- 0,03 para la fracción densa.
- 15
- 20 Tabla 10. Distribución de cisplatino y lípidos en las fracciones ligeras y densas de las muestras del complejo de lípidos con cisplatino.

| Lote | Lípido mg/mL | Lípido % total | Cisplatino mg/mL | Cisplatino % total | L/D |
|--------------------|--------------|----------------|------------------|--------------------|------|
| 8 total | 62,2 | | 2,47 | | 25,2 |
| 8 Fracción ligera | 58,0 | 93,3 | 0,20 | 8,2 | 285 |
| 8 Fracción densa | 0,49 | 0,79 | 2,01 | 81,3 | 0,24 |
| 9 total | 51,5 | | 2,46 | | 20,9 |
| 9 Fracción ligera | 47,8 | 92,7 | 0,18 | 7,2 | 270 |
| 9 Fracción densa | 0,44 | 0,85 | 1,96 | 79,7 | 0,22 |
| 10 total | 55,2 | | 2,57 | | 21,5 |
| 10 Fracción ligera | 46,7 | 84,7 | 0,20 | 7,7 | 237 |
| 10 Fracción densa | 0,47 | 0,85 | 2,15 | 83,6 | 0,22 |
| 11 total | 57,3 | | 2,61 | | 22,0 |
| 11 Fracción ligera | 49,7 | 86,8 | 0,15 | 5,9 | 326 |
| 11 Fracción densa | 0,48 | 0,84 | 2,20 | 84,2 | 0,22 |
| 12 total | 57,9 | | 2,57 | | 22,5 |
| 12 Fracción ligera | 51,6 | 89,1 | 0,18 | 6,9 | 290 |
| 12 Fracción densa | 0,47 | 0,82 | 2,17 | 84,3 | 0,22 |
| 13 total | 80,46 | | 3,36 | | 24,0 |
| 13 Fracción ligera | 73,42 | 91,26 | 0,44 | 13,0 | 168 |

| | | | | | |
|--------------------|-------|-------|------|------|------|
| 13 Fracción densa | 0,82 | 1,01 | 2,58 | 76,7 | 0,32 |
| 14 total | 71,19 | | 3,41 | | 20,9 |
| 14 Fracción ligera | 64,82 | 91,06 | 0,29 | 8,7 | 220 |
| 14 Fracción densa | 0,65 | 0,92 | 2,76 | 81,1 | 0,24 |
| 15 total | 66,92 | | 2,83 | | 23,7 |
| 15 Fracción ligera | 62,35 | 93,17 | 0,23 | 8,0 | 275 |
| 15 Fracción densa | 0,66 | 0,99 | 2,45 | 86,5 | 0,27 |
| 16 total | 68,5 | | 2,86 | | 23,9 |
| 16 Fracción ligera | 64,0 | 93,48 | 0,28 | 9,8 | 228 |
| 16 Fracción densa | 0,51 | 0,75 | 2,40 | 83,8 | 0,21 |
| Promedio | | | | | 22,7 |
| Fracción ligera | | 90,6 | | 8,4 | 255 |
| +/-SD | | 3,1 | | 2,1 | 47 |
| Fracción densa | | 0,87 | | 82,3 | 0,24 |
| +/-SD | | 0,09 | | 2,9 | 0,03 |

Ejemplo 12. Estudio de Nebulización

Separación de las fracciones ligeras y densas

5 Se mezclaron 30 ml de complejo lipídico de cisplatino con 10 ml de iodixanol al 30% en solución salina. Esta mezcla estaba en la mitad y las porciones de 20 ml se colocaron en capas encima de otros 10 ml de iodixanol al 30% en solución salina utilizando dos tubos de centrifuga de 50 ml. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 4000 rpm a 5°C en una centrífuga Eppendorf 5810. Se desechó el sobrenadante, que contenía una mezcla de fracciones ligeras y pesadas. El sedimento, que contenía la fracción densa de la composición lipídica de cisplatino, se dispersó suavemente en 5 ml de solución salina. Después de determinar la concentración de cisplatino, la concentración se ajustó para hacer la concentración a 2,7 mg/ml de cisplatino.

10 Para obtener la fracción ligera, el lote del complejo lipídico de cisplatino se dejó sedimentar por gravedad a 5°C durante 1 semana. Se recogió la parte superior de la muestra, que contenía la fracción ligera.

Estudios de nebulización

Análisis TEM del cisplatino complejado con lípidos nebulizados:

15 Se nebulizaron 5 ml de muestra utilizando un nebulizador PARI-LC STAR, y el aerosol se recogió mediante un impactador enfriado (agua con hielo). A partir del impactador, se obtuvieron 2,5 ml de nebulizado para el análisis. Una parte alícuota del nebulizado se centrifugó por filtración utilizando un centricon-YM-30, cuando fue necesario, inmediatamente después de la nebulización para determinar el cisplatino no encapsulado (libre). La presión de aire de la nebulización fue de 30 PSI y el caudal del sistema de recolección de aerosoles provisto por la bomba fue de 8 L/min. 1 ml de aerosol, recogido en un impactador, se diluyó con 2 ml de solución salina y se dejó incubar a 4°C durante 20 horas. En paralelo, 1 ml de la formulación original (no nebulizada) se trató de la misma manera. Después de que la fracción pesada se asentara, la porción superior más blanca de cada muestra se retiró y la porción amarillenta se dispersó en una solución de iodixanol al 10% en solución salina. Las muestras se centrifugaron a 4000 RPM durante 20 minutos en una centrífuga Eppendorf 5810. Los sobrenadantes se descartaron y los gránulos que tenían partículas de fracción pesada se dispersaron en 200 microlitros de solución salina cada uno. La cantidad de gránulos de fracción pesada obtenidos de la formulación nebulizada fue menor que la cantidad de la formulación original. Las muestras para TEM se prepararon como se describió anteriormente. La FIG. 5 representa imágenes TEM de las partículas de fracción pesada nebulizadas y la FIG. 6A-B representa imágenes TEM de las partículas de fracción pesada no nebulizadas. En ambos casos, las partículas son oscuras y densas de forma rectangular y

romboidal de tamaño promedio entre 1 y 2 micrómetros. En algunos casos, había partículas más grandes y más largas de 3 micrómetros y de mayor tamaño en la muestra no nebulizada (Figura 8B) en comparación con la muestra nebulizada.

Análisis del gradiente de densidades de cisplatino complejado con lípidos nebulizados:

- 5 Se nebulizaron 5 ml de muestra como se describió anteriormente. Unas pocas horas después de la nebulización, se pasó una muestra de 1 ml en el sistema de gradiente de densidades. Visiblemente todos los gradientes parecían similares a los de las muestras originales (no nebulizadas). Cada fracción se recolectó como se describe anteriormente y se analizó el contenido de lípidos y cisplatino.

- 10 Los resultados del análisis de gradiente de densidad de las muestras después de la nebulización se presentan en la Tabla 11. Al igual que en las muestras no nebulizadas, la mayoría de los lípidos (85,2% en promedio, \pm 6,1%) se encontró en la fracción ligera, mientras que solo el 0,36% \pm 0,08% de los lípidos estaba en la fracción densa. La distribución de cisplatino fue 46,0 \pm 1,2% en la fracción densa, y 8,5 \pm 1,1% en la fracción ligera. La relación L/D fue similar a la de las muestras no nebulizadas, siendo 232 \pm 15 para la fracción ligera y 0,18 \pm 0,03 para la fracción densa.

- 15 Tabla 11. Análisis de gradiente de densidad después de la nebulización.

| Lote | Lípido mg/mL | Lípido % total | Cisplatino mg/mL | Cisplatino % total | L/D |
|--------------------|--------------|----------------|------------------|--------------------|--------|
| 11 total | 70,1 | | 3,22 | | 21,8 |
| 11 Fracción ligera | 55,8 | 79,7 | 0,25 | 7,7 | 225 |
| 11 Fracción densa | 0,28 | 0,40 | 1,50 | 46,5 | 0,19 |
| 12 total | 61,9 | | 2,80 | | 22,1 |
| 12 Fracción ligera | 56,8 | 91,7 | 0,23 | 8,1 | 249 |
| 12 Fracción densa | 0,25 | 0,4 | 1,25 | 44,6 | 0,20 |
| 13 total | 77,57 | | 2,80 | | 23,76 |
| 13 Fracción ligera | 60,98 | 78,61 | 0,23 | 9,6 | 195,15 |
| 13 Fracción densa | 0,33 | 0,43 | 1,25 | 44,6 | 0,23 |
| 14 total | 71,65 | | 3,17 | | 22,59 |
| 14 Fracción ligera | 63,46 | 88,56 | 0,28 | 8,9 | 225,85 |
| 14 Fracción densa | 0,26 | 0,37 | 1,40 | 44,2 | 0,19 |
| 16 total | 77,2 | | 3,00 | | 25,7 |
| 16 Fracción ligera | 64,9 | 84,1 | 0,29 | 9,8 | 221 |
| 16 Fracción densa | 0,21 | 0,27 | 1,40 | 46,8 | 0,15 |
| Promedio | | | | | 23,2 |
| Fracción ligera | | 84,5 | | 8,8 | 223 |
| +/-SD | | 5,6 | | 0,9 | 15 |
| Fracción densa | | 0,37 | | 45,3 | 0,19 |
| +/-SD | | 0,06 | | 1,2 | 0,03 |

En la Tabla 12 se muestra una comparación de los análisis de gradiente de densidad antes y después de la nebulización.

Tabla 12. Análisis de gradiente de nebulización anterior y posterior.

| Fracciones del complejo lipídico de cisplatino | % Cisplatino del total | | | Relación Lípido/Fármaco | | |
|--|------------------------|---------|--------|-------------------------|---------|--------|
| | PreNeb | PostNeb | Cambio | PreNeb | PostNeb | Cambio |
| Fracción ligera | 8,4 | 8,8 | 0,4 | 255 | 223 | -32 |
| SD | 2,1 | 0,9 | 3,0 | 47 | 15 | 52 |
| Fracción densa | 82,3 | 45,3 | -37,0 | 0,24 | 0,19 | -0,05 |
| SD | 2,9 | 1,2 | 4,1 | 0,03 | 0,03 | ,06 |

5 La FIG. 7 muestra un gráfico de barras del efecto de la nebulización en la distribución del cisplatino en las fracciones ligeras y densas del complejo lipídico de cisplatino. Si bien no está limitado por ninguna teoría en particular, los datos anteriores indican que una parte significativa del cisplatino se escapa de la fracción densa durante la nebulización, pero no se filtra de la fracción ligera en un grado significativo.

10 Las fracciones ligeras y densas separadas se nebulizaron como se describió anteriormente y luego se analizaron para determinar el cisplatino total y el libre. La Tabla 13 muestra los resultados, en comparación con la nebulización del complejo lipídico del cisplatino total. La muestra del complejo lipídico de cisplatino total perdió el 45,1% de cisplatino encapsulado durante la nebulización. La fracción ligera se mantuvo esencialmente sin cambios. La fracción densa perdió más del 70% de su cisplatino encapsulado original. Los resultados demuestran que la fracción densa se filtra, mientras que la fracción ligera esencialmente no lo hace. Además, la fracción densa se filtró en mayor medida cuando se nebulizó sola, en comparación con la muestra del complejo lipídico de cisplatino total. Si bien no está limitado por ningún particular, se cree que los liposomas contenidos en la fracción ligera "protegen" las partículas densas durante la nebulización, lo que reduce la fuga del cisplatino.

Tabla 13

| Fracciones del complejo lipídico de cisplatino | % Cisplatino libre | | % de liberación |
|--|--------------------|---------|-----------------|
| | preNeb | postNeb | |
| Total | 4,4 | 49,5 | 45,1 |
| Fracción ligera | 65,7 | 64,7 | -1,0 |
| Fracción densa | 3,1 | 74,7 | 71,6 |

20 La distribución del cisplatino en las fracciones ligeras y densas se muestra en la Figura 7.

Ejemplo 13: Comparación del atrapamiento de cisplatino y transplatino

El atrapamiento de cisplatino o transplatino en un complejo lipídico por enfriamiento/calentamiento repetitivo logra una alta relación fármaco/lípido como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14

| | Cisplatino | Transplatino |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|
| Concentración de fármaco de partida | 5 mg/mL | 1 mg/mL |
| Lípidos (DPPC:Coolesterol=7:3wt) | 25 mg/mL | 5 mg/mL |
| Ciclos de temperatura | 6 ciclos | 6 ciclos |
| Concentración final del fármaco | 1,4 mg/mL (1,4% libre) | 0,3 mg/mL (6,0% libre) |
| % Recuperación | 29% | 26% |
| Fármaco/Lípido | 0,056 | 0,06 |

25

Ejemplo 14: Microscopia óptica

Cuatro lotes de la formulación fueron estudiados por microscopía óptica. Los lotes 17-20 se muestran en las Figs. 8A-D, respectivamente. Las micrografías ópticas representan partículas redondas de aproximadamente 1 a 2 micrómetros de tamaño, o menos, y una serie de partículas en forma de varilla de aproximadamente 1-2 micrómetros de ancho y hasta aproximadamente 10 micrómetros de longitud.

5 Ejemplo 15: Congelar imágenes de fractura

Se colocó una parte alícuota de la muestra en una placa de cobre y luego se recubrió con otra placa de cobre. Esta forma de sándwich de la muestra se congeló rápidamente sumergiéndolo en propano líquido y se transfirió a un soporte de placa de cobre, que se sumergió en nitrógeno líquido. El soporte se transfirió a una cámara de congelación al vacío (sistema de liofilización Balzers BAF 400 T), que se encontraba a una temperatura de 170°C con un vacío de $2-5 \times 10^{-6}$ bar (2-5 Pa). La fracturación y el subsiguiente recubrimiento de Pt y carbono se llevaron a cabo a -115°C. La réplica se sacó de la cámara y se trató con ácido nítrico al 2% durante aproximadamente 4-5 horas, y luego se blanqueó durante la noche. La réplica lavada se colocó en una rejilla de cobre para la observación EM. Las imágenes representativas de la fractura por congelación se muestran en la Figura.

Ejemplo 16: Análisis del tamaño de partícula

15 Las muestras de la fracción pesada que comprendían cisplatino complejo con lípidos se diluyeron en solución salina filtrada (NaCl al 0,9%) en una proporción de 1:2000 y se analizaron con un AccuSizer Optical Particle Sizer 780 utilizando los siguientes ajustes: volumen de bucle de inyección 1 ml, tiempo de recolección de datos 60 s, modo de resumen del Detector LE 400-05SE, diámetro mínimo de 0,05 micrómetros. El detector utilizado solo cuenta partículas de 0,5 micrómetros y mayores. Se analizaron cuatro lotes (números de lote 17-20), como se muestra en las Figs. 10A-D. Los gráficos de distribución muestran volúmenes relativos ocupados por partículas de diferentes tamaños. Las partículas en el rango de 0,5 a 1 micrómetro representan la cola del lado derecho de la distribución principal de la fracción ligera, la mayoría de las cuales tiene tamaños de partículas menores a 5 micrómetros. Los gráficos también muestran un gran pico a la derecha de 1 a 20 micrómetros, con un tamaño medio de 8 a 10 micrómetros.

20

25 Los lotes 17 y 20 también se sometieron a un análisis del tamaño de partícula después de la nebulización, y los resultados se muestran en las Figs. 11A-B.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un agregado de cisplatino complejoado con lípidos que consiste en cisplatino, colesterol y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), en donde el complejo tiene una relación de lípido a fármaco de menos de 1 en peso.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la relación de lípido a fármaco es de 0,10 a 1 en peso, de 0,10 a 0,50 en peso, de 0,15 a 0,45 en peso, de 0,20 a 0,40 en peso, o de 0,2 en peso.
3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el agregado de cisplatino complejoado con lípidos tiene un diámetro ponderado en volumen promedio de 0,5 a 20 micrómetros, 1 a 15 micrómetros, o de 2 a 10 micrómetros.
- 10 4. La composición de la reivindicación 1, 2 ó 3, en donde la concentración del agregado de cisplatino es mayor que 1,2 mg/mL, es de 1,2 a 20 mg/mL, es de 1,2 a 10 mg/mL, o es de 1,5 a 5 mg/ml.
5. La composición de cualquier reivindicación precedente, que comprende además un liposoma.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que el liposoma comprende colesterol y DPPC.
- 15 7. La composición de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la que el liposoma comprende un compuesto de platino activo.
8. La composición de la reivindicación 5, 6 ó 7, en la que el agregado de cisplatino complejoado con lípidos contiene de 70 a 100%, de 75 a 99%, o de 80 a 90% del total de agregado de cisplatino en la composición.
9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en la que el liposoma contiene de 0 a 30%, de 0,5 a 25% o de 1 a 20% del compuesto de platino total en la composición.
- 20 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en la que el agregado de cisplatino complejoado con lípidos contiene de 0,1 a 5% o de 0,25 a 3% del lípido total en la composición.
11. La composición de la reivindicación 7, 8, 9 ó 10, en la que el liposoma contiene de 75 a 99,5% o de 80 a 95% del lípido total en la composición.
- 25 12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en la que el liposoma tiene una relación de lípido a compuesto de platino activo de 100:1 a 400:1 en peso, o de 200:1 a 400:1 en peso.
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en la que el compuesto de platino activo se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, iproplatino, tetraplatino, transplatino, JM1 18 (cisaminodichloro(ciclohexilamina)platino (II)), JM 149 (cis-aminodichloro(ciclohexilamina)-trans-dihidroxiplatino (IV)), JM216 (bis-acetato-cis-aminodichloro)(ciclohexilamina)platino (IV), JM335 (trans-aminodichloro)(ciclohexilamina)dihidroxiplatino (IV)).
- 30 14. La composición de cualquier reivindicación precedente, en la que el agregado de cisplatino complejoado con lípidos comprende DPPC y colesterol en una relación de 1:1 a 5:1 en peso, de 2:1 a 4:1 en peso, o de 2,25:1 en peso.
- 35 15. Una formulación farmacéutica que comprende la composición de cualquier reivindicación precedente y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
16. La formulación farmacéutica de la reivindicación 15, adaptada para la inhalación por un paciente, o adaptada para la inyección en un paciente.

Figura 1(A)

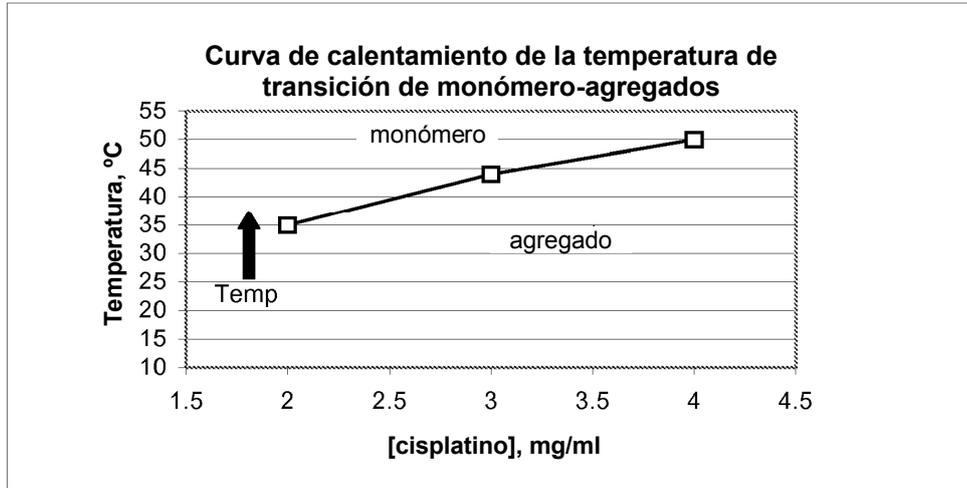


Figura 1(B)

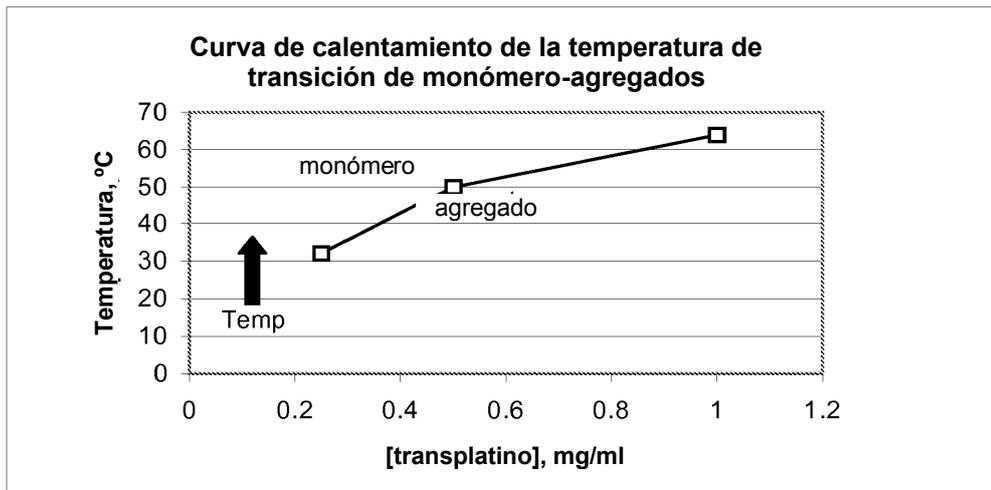


Figura 1(C)

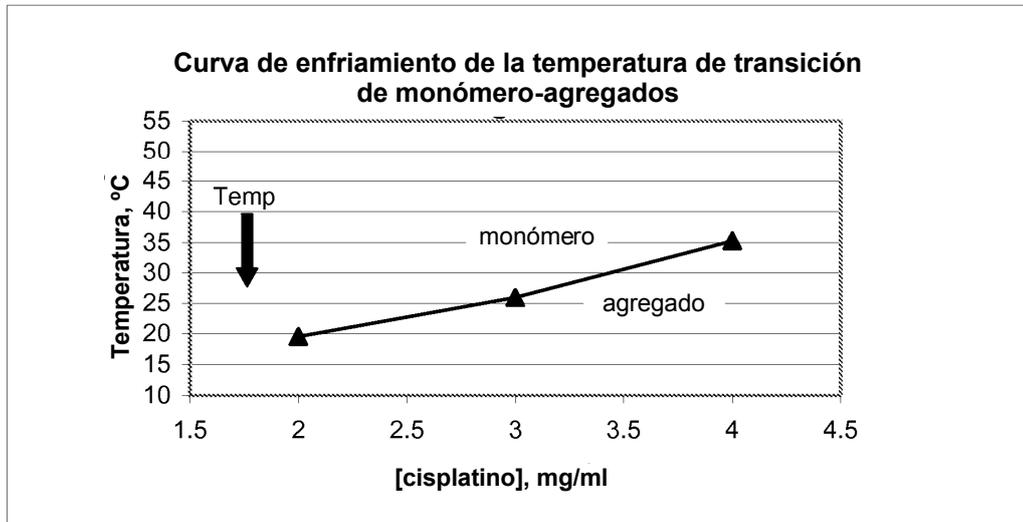


Figura 1(D)

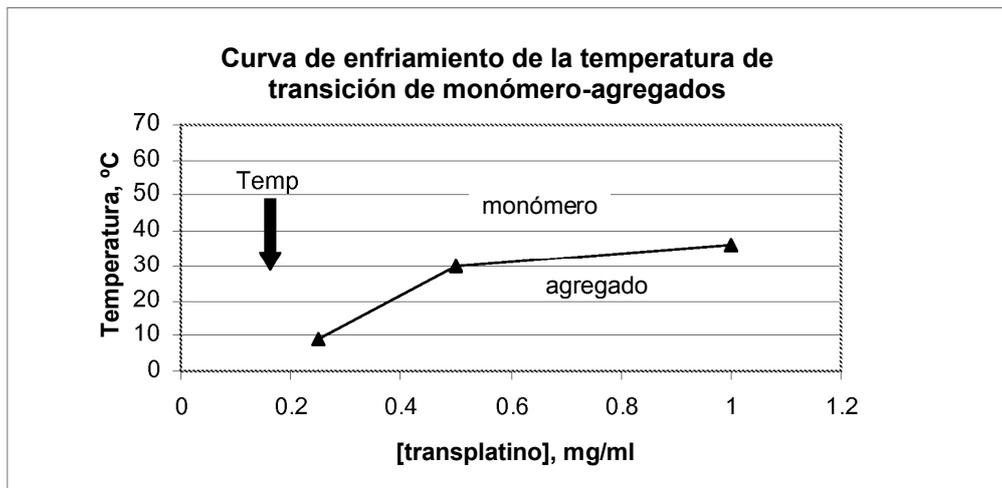


Figura 2

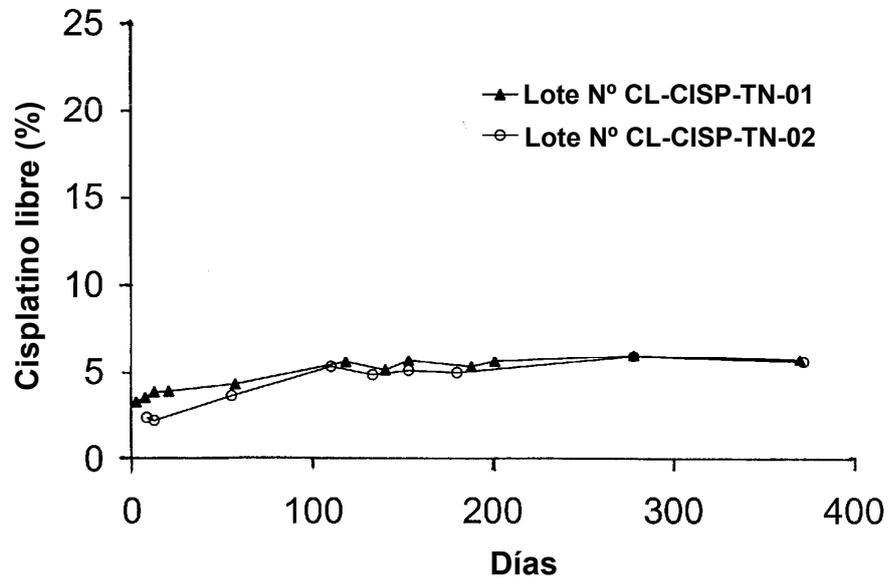


Figura 3(A)

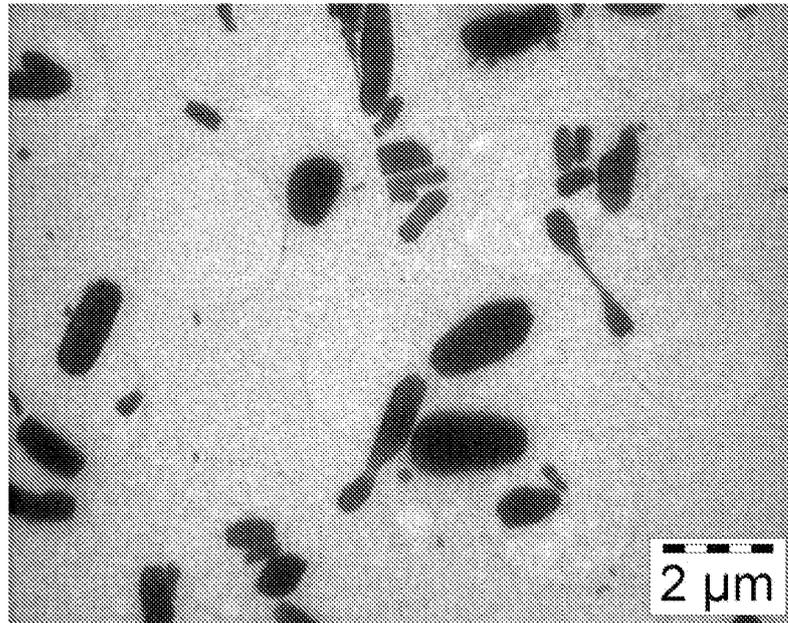


Figura 3(B)

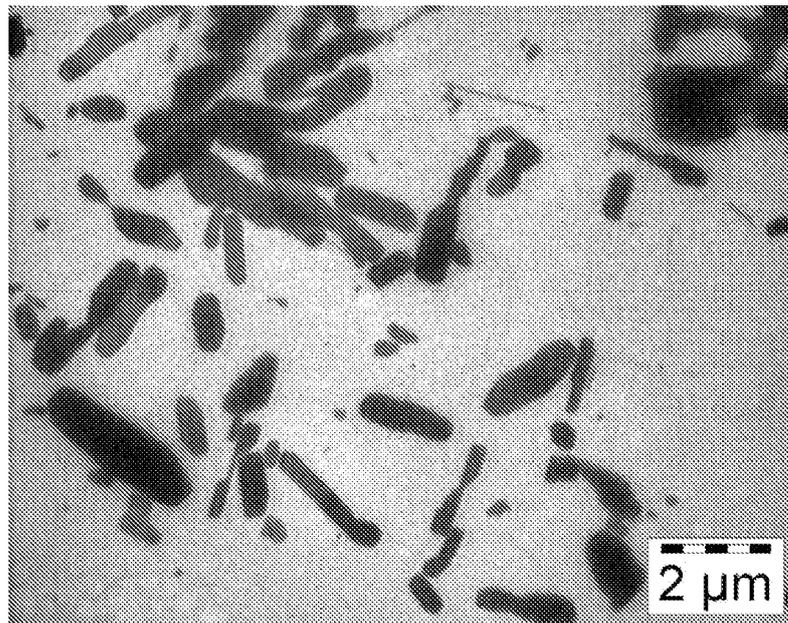


Figura 4(A)

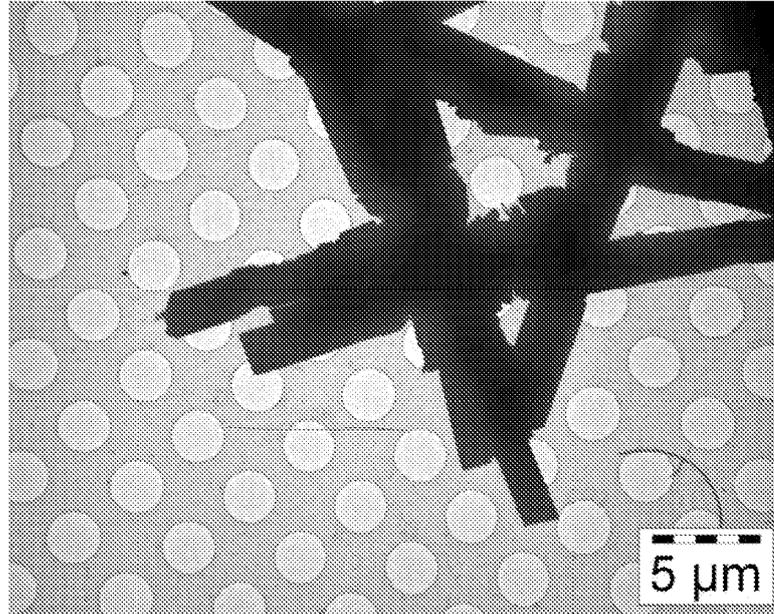


Figura 4(B)

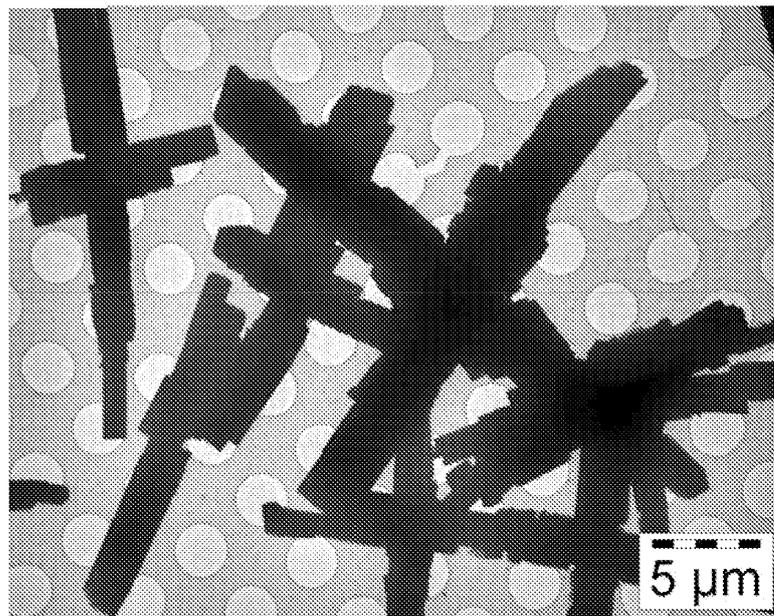


Figura 5(A)

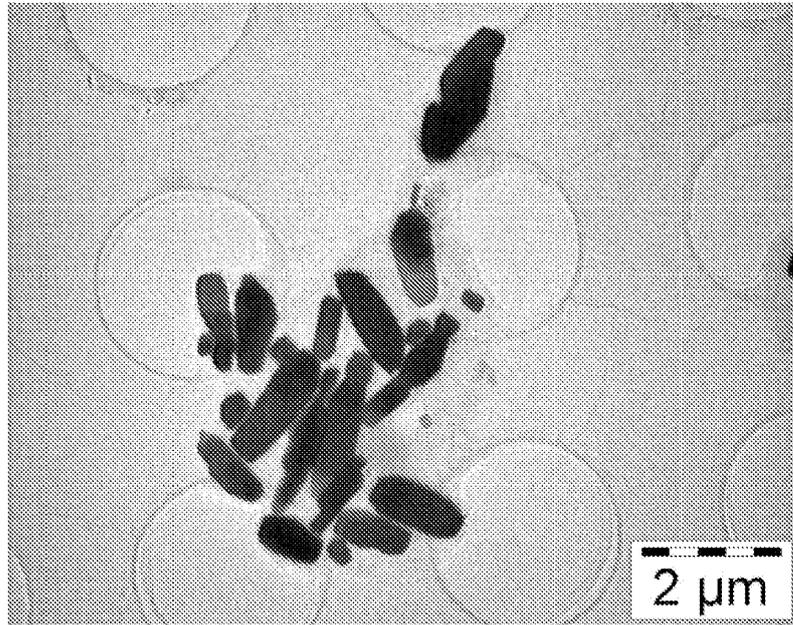


Figura 5(B)

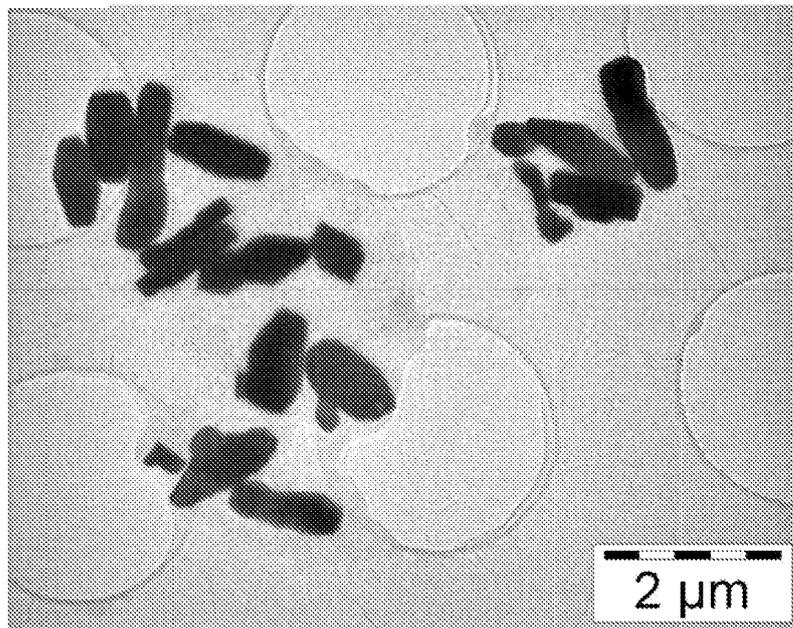


Figura 6(A)

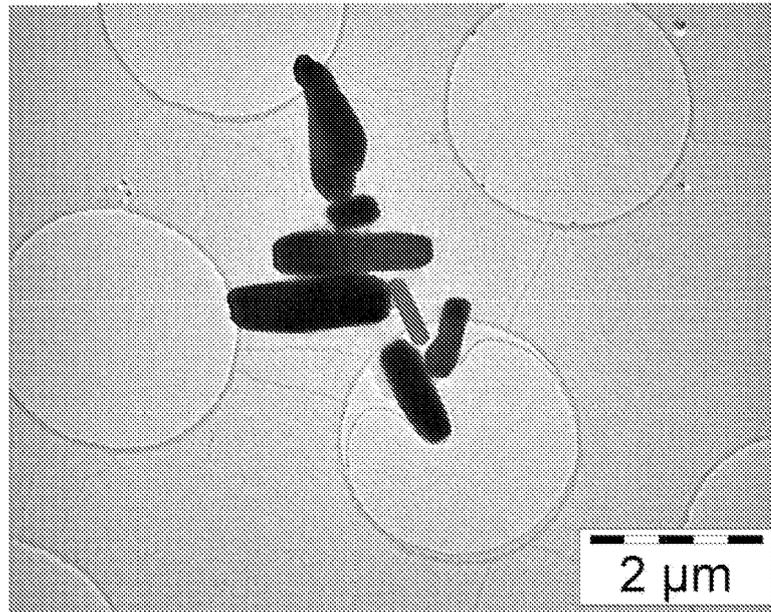


Figura 6(B)

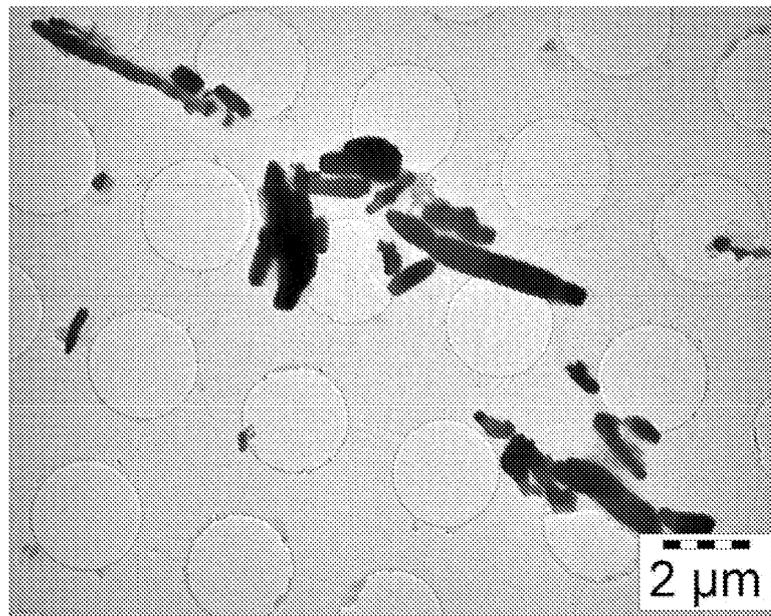


Figura 7

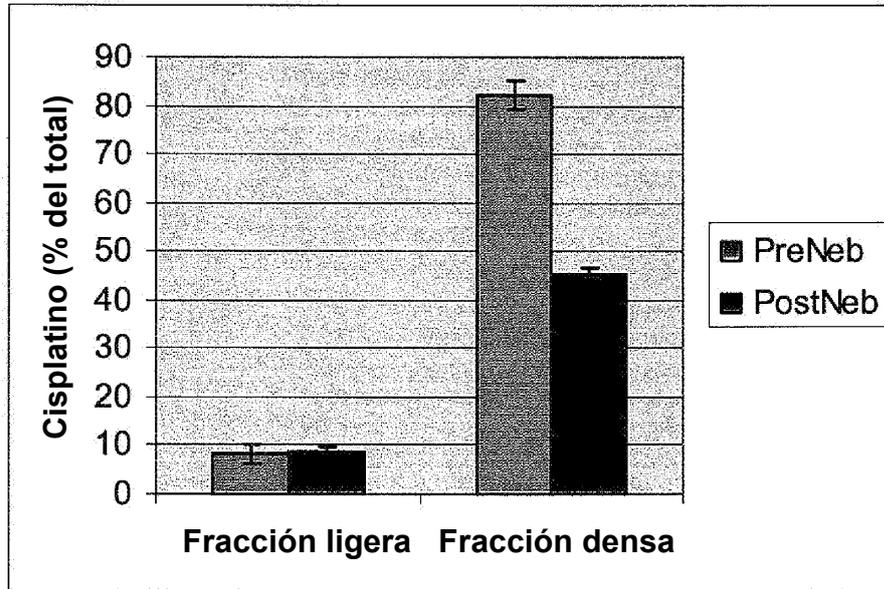


Figura 8(A)

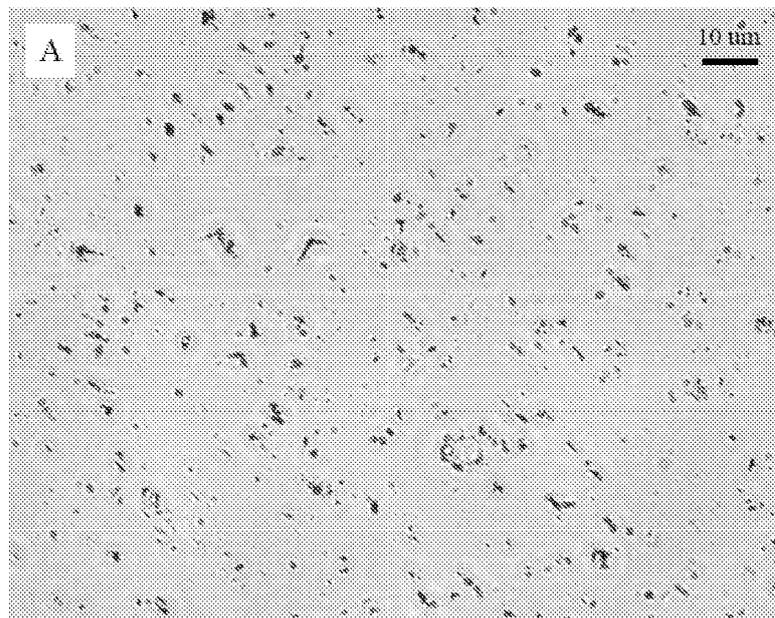


Figura 8(B)

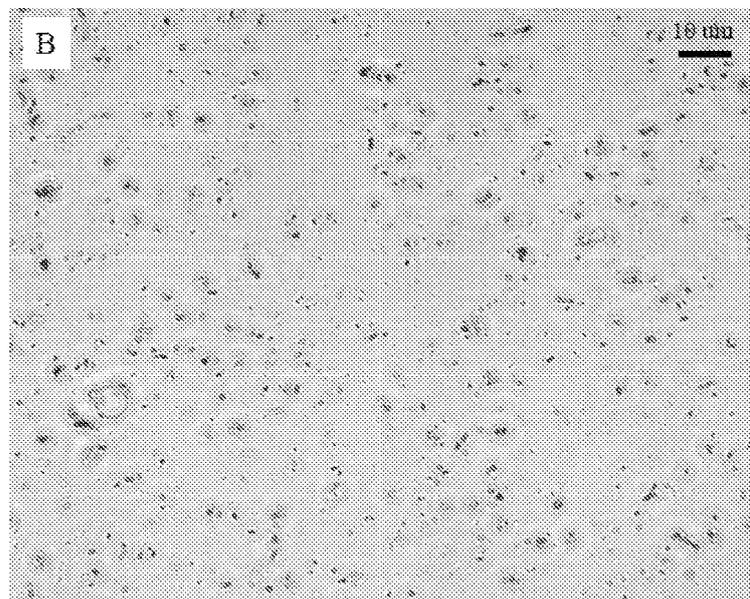


Figura 8(C)

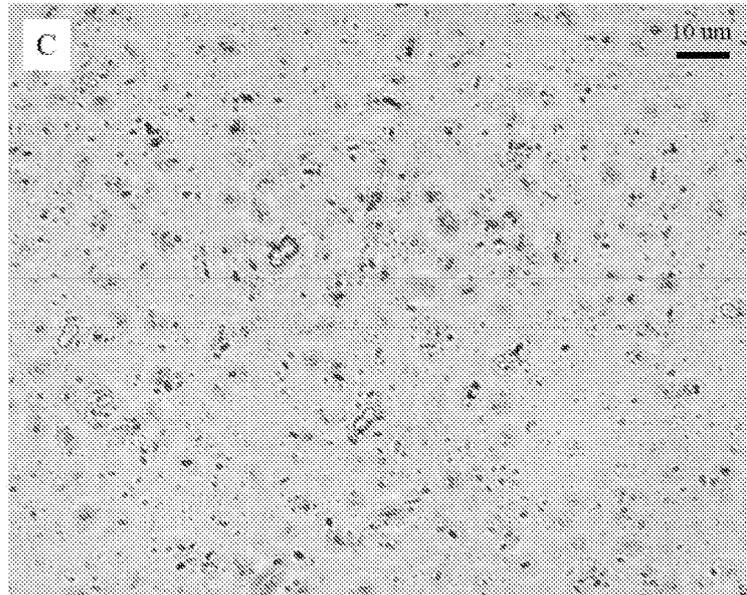


Figura 8(D)

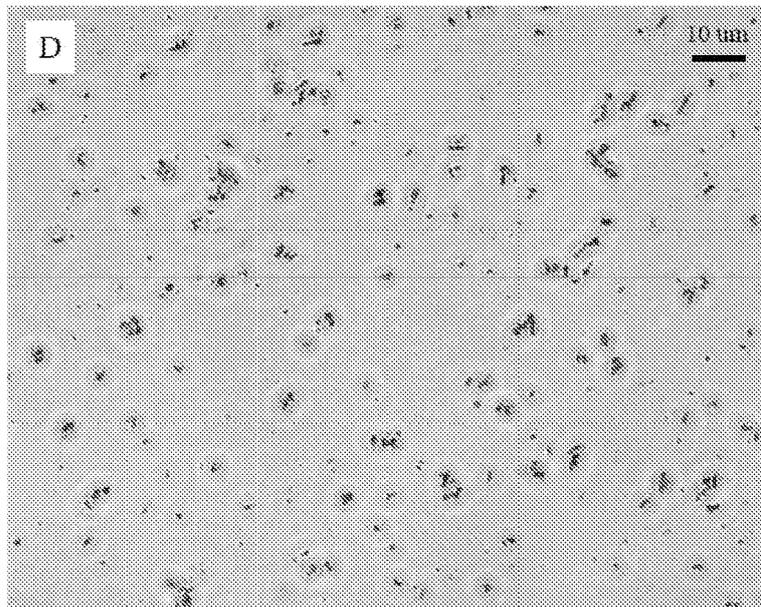


Figura 9(A)

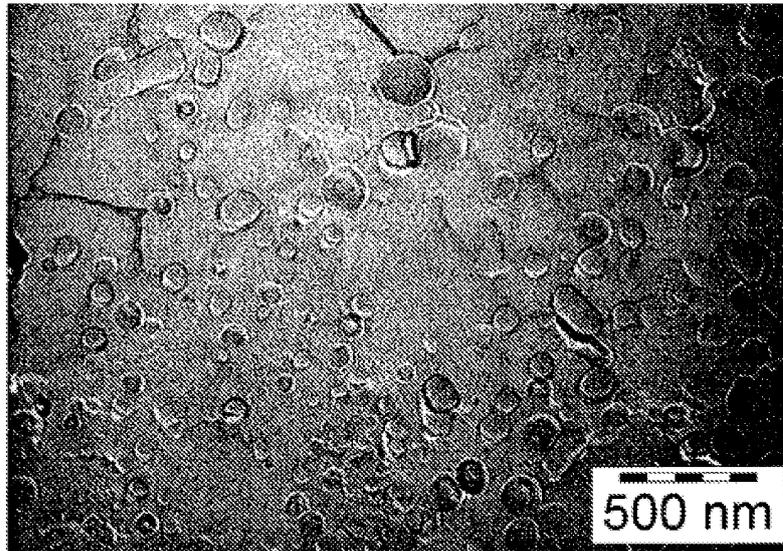


Figura 9(B)

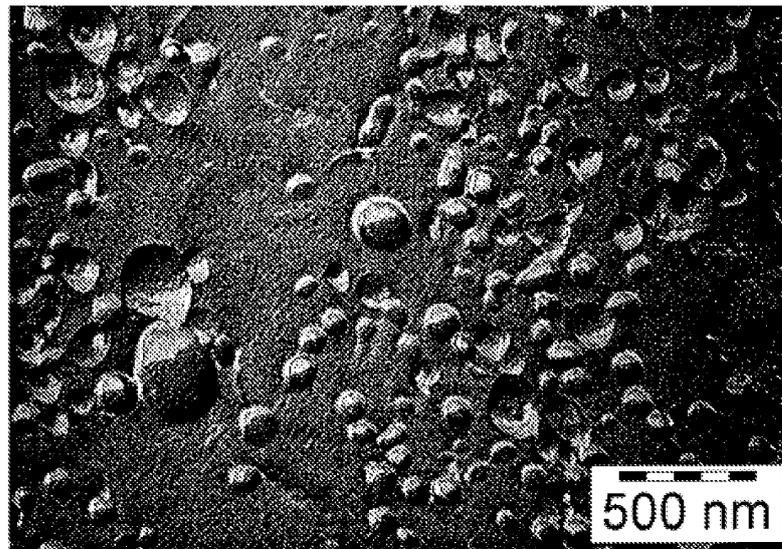


Figura 10(A)

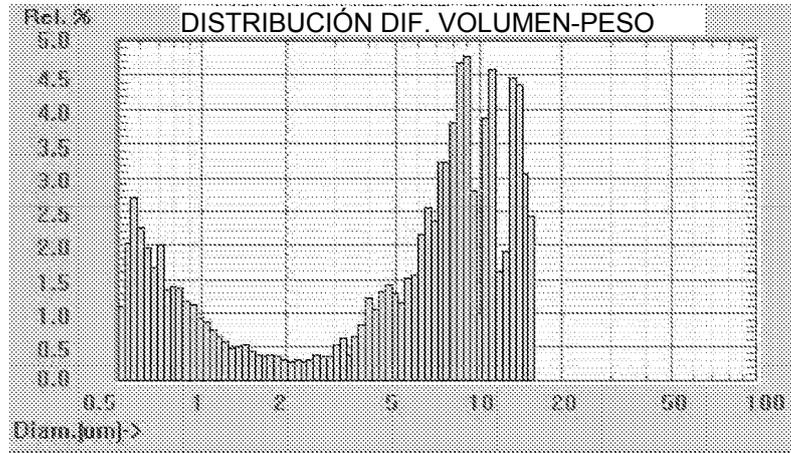


Figura 10(B)

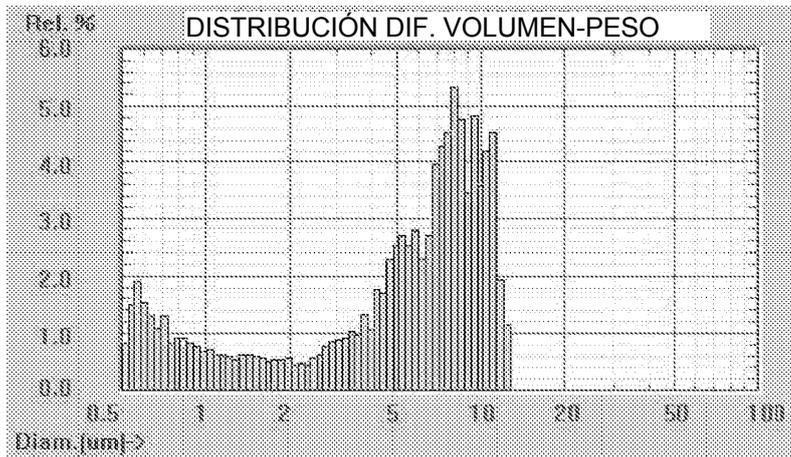


Figura 10(C)

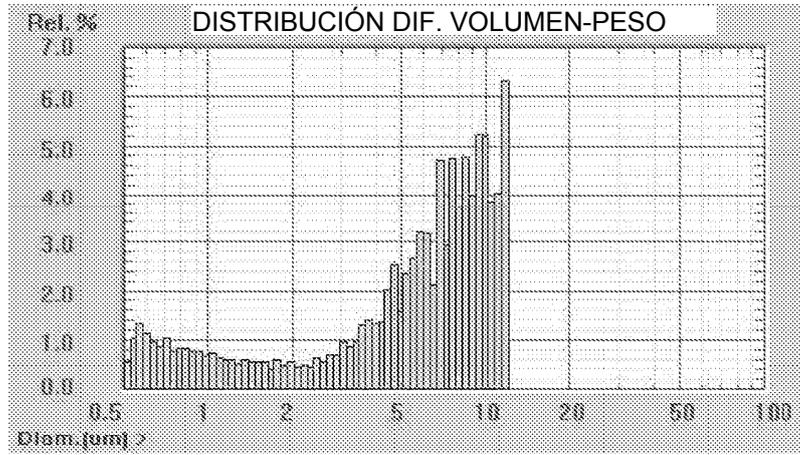


Figura 10(D)

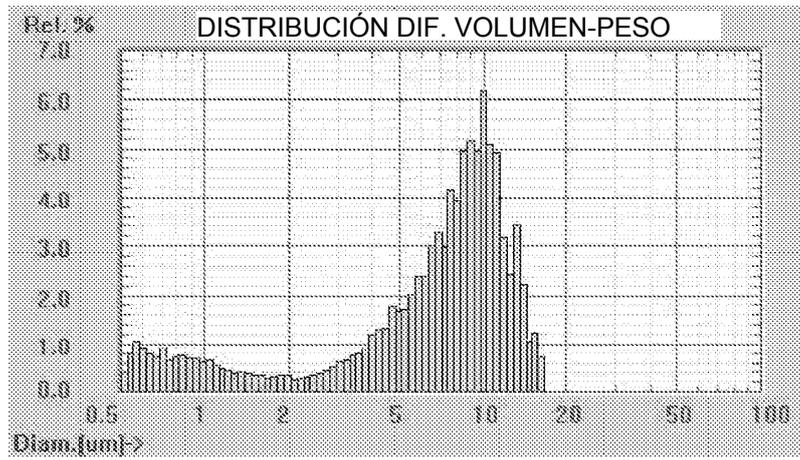


Figura 11(A)

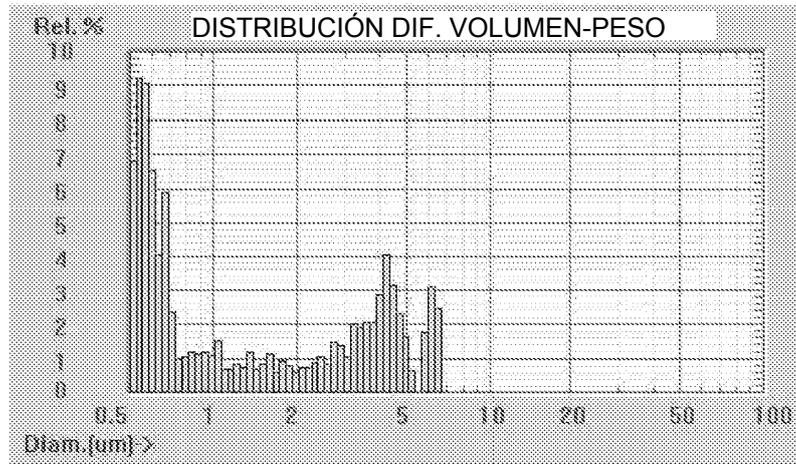


Figura 11(B)

