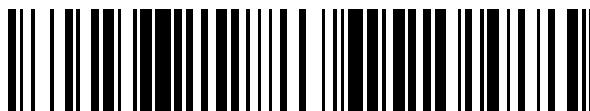


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 750**

51 Int. Cl.:

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 31/375 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2012 PCT/IB2012/051014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12117385**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2012 E 12719451 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2680821**

54 Título: **Formulación liposomal que contiene un compuesto activo antitumoral, método para producirla y composiciones farmacéuticas que la contiene**

30 Prioridad:

03.03.2011 PL 39408211

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

12.03.2019

73 Titular/es:

**WROCLAWSKIE CENTRUM BADAN EIT + SP Z
O.O. (100.0%)
ul. Stablowicka 147
54-066 Wrocław, PL**

72 Inventor/es:

**GUERNATOR, JERZY;
KOZUBEK, ARKADIUSZ;
PADUSZYNSKI, PIOTR y
LIPKA, DOMINIK**

74 Agente/Representante:

DE PABLOS RIBA, Juan Ramón

ES 2 703 750 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).

Formulación liposomal que contiene un compuesto activo antitumoral, método para producirla y composiciones farmacéuticas que la contienen

5 Descripción

El objeto de la presente invención es una formulación liposomal que contiene un compuesto activo antitumoral, un método para producirla y una composición farmacéutica que la contiene con el fin de usarse en medicina.

10 Los liposomas son estructuras cerradas que pueden ser unilamelares o multilamelares, donde una bicapa de un lípido anfifílico contiene una microgota de agua (liposomas unilamelares) o donde se forman membranas lipídicas de forma concéntrica que se entremezclan con las capas acuosas (liposomas multilamelares). Los lípidos anfifílicos que forman la bicapa poseen un grupo
15 hidrofílico polar y una o más cadenas de policarbonato hidrofóbicas lineales (>C8). Los grupos polares pueden ser derivados de compuestos de fosfatos, de sulfatos y de nitrógeno, pero los más utilizados son los fosfolípidos, en concreto los de origen natural, tales como las fosfatidilcolinas que se obtienen usando el refinamiento de los lípidos vegetales, de los fosfolípidos sintéticos, de las
20 formulaciones de fosfolípidos que están disponibles en el mercado, incluso de los fosfolípidos modificados químicamente que utilizan derivados de etilenglicol y de colesterol. Dependiendo de la solubilidad, la sustancia medicinal se sitúa en la capa acuosa o en la capa lipídica de los liposomas.

Existen diversos métodos para producir liposomas. El método clásico
25 para producir liposomas multicapa se basa en la evaporación de una solución disolvente lipídica-orgánica y en la rehidratación de la película lipídica con una solución acuosa del compuesto medicinal (J. Mol. Biol. 13 (1965), 238-252). Otras técnicas incluyen la emulsión de un lípido dentro de una mezcla bifásica de una fase acuosa y orgánica que contiene el lípido, con la evaporación
30 simultánea del disolvente orgánico (p. ej. tal y como se muestra en las descripciones de las patentes estadounidenses 4.522.803, 5.030.453 y 5.169.637), la formación de una emulsión de agua en aceite, desde la que la fase orgánica se evapora con el fin de producir un gel que se mezcla después para producir liposomas oligolamelares (US 4.235.871), así como ciclos
35 múltiples de congelación/descongelación (US 5.008.050). Los liposomas unilamelares se obtienen de los liposomas multilamelares utilizando ultrasonidos, la extrusión (p. ej. US 4.975.282), la homogeneización, así como la inyección de soluciones de etanol o etéricas de lípidos dentro de la fase acuosa (Deamer R., Uster, P. "Liposome preparation; Methods and
40 Mechanisms", in: "Liposomes", ed. M. Ostro, Marcel Dekker, New York, 1987).

En el caso de muchos grupos de terapéuticos, tanto la eficiencia de la encapsulación del compuesto activo en las vesículas como la estabilidad de los liposomas (*in vitro* e *in vivo*) son un problema técnico grave. En particular, las formulaciones liposomales clásicas que son altamente insolubles en agua,
45 como los taxoides, que se basan en la lecitina de soja o en un análogo de fosfolípido sintético (Bartoli et al. J. Microencapsulation 7, 1990, 191-197, Riondel et al. In Vivo 6, 1992, 23-28), muestran una tendencia tanto a la agrupación como a la inestabilidad, lo que causa tanto una "pérdida" del compuesto activo de los liposomas como su cristalización. En muchos casos, la
50 producción de las formulaciones liposomales de los compuestos antitumorales

con una proporción eficiente de lípido/fármaco necesita que se utilicen procedimientos especiales, como por ejemplo el que se describe en la publicación de la patente WO 9202208 y en la solicitud de patente EP 546951 A1, como incorporar fosfolípidos de carga negativa o incorporar un alcohol polihidroxilado y sales de amonio cuaternario tal y como se describe en la descripción de la patente japonesa JP 06254379. Las estructuras liposomales mejoradas que aseguran una mayor estabilidad a través de la estabilización estérica de la superficie de la bicapa lipídica se obtienen con los liposomas llamados "Stealth" (D. D. Lasic, F. Martin "Stealth Liposomes", CRC Press Boca Raton, 1995). Un método que tiene como objetivo diseñar formas más duraderas de liposomas es el uso de un recubrimiento de polietilenglicol hidrofílico, tal y como se describe en la publicación de la solicitud internacional WO 9422429. La medicina ha sido testigo de la introducción de una forma de doxorubicina encapsulada en liposomas, revestida con un polietilenglicol bajo el nombre comercial de Doxil®. Esta preparación de Doxil® contiene doxorubicina encapsulada en transportadores de liposomas Stealth y está compuesta por tres componentes lípidos: lecitina de soja hidrogenada, colesterol y un conjugado de carbamato de distearilfosfatidiletanolamina con un derivado de metoxilo de polietilenglicol 2000 en una proporción molar adecuada. Tanto la larga vida media de los liposomas Stealth, como la pérdida leve del fármaco se obtienen usando métodos únicos de encapsulación, que aseguran una alta eficiencia de carga y una retención del fármaco a largo plazo. Estos métodos incluyen la carga con un gradiente electrolítico (solicitud EP 361894 A1) o con el gradiente de pH (publicación de patente WO 8806442). En la publicación de patente WO 8806442, los componentes de la capa lipídica son compuestos lipídicos clásicos, como lo pueden ser las fosfatidilcolinas naturales y sintéticas, pudiendo agregar también colesterol, y en el proceso de encapsulación se utiliza un gradiente de pH. De conformidad con la descripción, la proporción limitada de la pérdida del compuesto activo que está biológicamente encapsulado es el resultado de la diferencia de pH entre las dos caras de la membrana lipídica. Sin embargo, el método de carga del gradiente de pH se limita únicamente a los fármacos solubles en la fase acuosa, que son ácidos débiles o bases. Las formulaciones liposomales que contienen topotecán y lípidos en una proporción de 0,05:0,2, que se cargan utilizando un gradiente de pH o un método de carga de ionóforos se describen en la publicación de patente WO 0202078. La capa lipídica incluye esfingomielina y colesterol. La solicitud internacional WO 9915153 divulga, entre otros, liposomas que contienen taxol, que se caracterizan por una concentración de un compuesto activo en los liposomas que no supera los 5mg/ml y que contienen la lecitina sintética dilauroilfosfatidilcolina en calidad de lípido. Los autores afirman que la proporción de fármaco:lipido se encuentra entre 1:1 y 1:2000, siendo preferiblemente de 1:30, pero no muestra ningún tipo de información sobre la estabilidad de estas formulaciones liposomales, que están concebidas para que los compuestos antitumorales se administren por inhalación.

Las formulaciones liposomales estables se han obtenido de este modo principalmente usando procedimientos especiales o con la modificación de moléculas del compuesto activo, p. ej. mediante la unión de cadenas de hidrocarburos, poliméricas o de péptidos. En las patentes polacas con número de patente 190077 y 190078 se obtuvo una alta eficiencia de encapsulación de

doxorubicina y de mitoxantrona en una proporción que preferiblemente es de fármaco a lípido en una formulación liposomal como resultado de la modificación en la composición de la capa lipídica que contiene, además de los componentes clásicos, lecitina de huevo y lecitina de huevo hidrogenada, un sulfato de hidrógeno de acilo que es un derivado de la resorcina. Las formulaciones liposomales estables de paclitaxel se han obtenido agregando cardiolipina a la formulación lipídica (en las descripciones de las patentes estadounidenses con número de publicación 5.424.073, 5.648.090, 5.939.567 y 6.146.659). La descripción de la patente estadounidense con número de publicación 6.146.659 divulga que en este caso la eficiencia de la incorporación de paclitaxel en las vesículas liposomales supera el 90%, teniendo una proporción en masa del compuesto activo con el transportador lipídico de alrededor un 7%. En general, la posibilidad de incorporar paclitaxel dentro de los liposomas como resultado de su alta hidrofobicidad se limita a un 1-10% (en peso), siendo en la mayoría de los casos de un 2-8% (en peso) en relación con el transportador lipídico. Este coeficiente sólo se podría mejorar ligeramente (hasta el 12-14% en peso) al modificar la molécula de paclitaxel, p. ej. mediante la unión de las cadenas de hidrocarburos (tal y como se observa en las descripciones de las patentes estadounidenses con número de publicación 5.919.815, 5.939.567, 6.118.011).

Por consiguiente, existe la necesidad de diseñar formulaciones liposomales farmacéuticas, en particular formulaciones liposomales que contengan un compuesto antitumoral hidrofóbico, con un lípido propicio para la proporción del compuesto activo, o unas que faciliten la transferencia de la misma cantidad del compuesto activo mediante una cantidad más pequeña del transportador lipídico.

Otra necesidad que no se ha cubierto es la de ofrecer un liposoma que contenga dos compuestos antitumorales para la terapia combinada con un efecto terapéutico mejorado y que esté caracterizada por una alta estabilidad.

Inesperadamente, los problemas mencionados anteriormente se han solucionado con la presente invención.

El primer objeto de la presente invención es una formulación liposomal que contiene un compuesto antitumoral que está caracterizada en que contiene un compuesto activo encapsulado en las vesículas liposomales que forma una composición de los componentes lipídicos en una proporción de 1 parte en masa del compuesto activo por una proporción de entre 3 a 12 partes en masa de componentes lipídicos, siendo preferiblemente 1 parte en masa del compuesto activo por 5 partes en masa de los componentes lipídicos, así como una vitamina o un derivado de ésta. Preferiblemente, una formulación liposomal de conformidad con la presente invención se caracteriza en que el compuesto activo contiene antraciclinas. Preferiblemente, una formulación liposomal de conformidad con la presente invención se caracteriza en que la vitamina es un ácido ascórbico o una sal de éste, preferiblemente un ascorbato de amonio, un ácido fólico o una sal de éste, preferiblemente folato de amonio o ácido pantoténico, preferiblemente una sal de amonio de éste. Igualmente es preferible que una formulación liposomal de conformidad con la presente invención se caracterice en que el derivado vitamínico sea metotrexato.

El segundo objeto de la presente invención es un método para producir una formulación liposomal con un compuesto activo antitumoral, el cual se caracteriza en que incluye:

- 5 a) la creación de liposomas unilamelares a través de la hidratación de una mezcla de fosfolípidos, preferiblemente lecitina de soja hidrogenada o lecitina de huevo hidrogenada o distearilfosfatidilcolina, así como colesterol, preferiblemente en una cantidad de entre 30 mg/ml y 60 mg/ml en una solución de 300mM de una vitamina o de su derivado, preferiblemente siendo una sal de amonio de un ácido ascórbico, fólico o pantoténico.
- 10 b) la congelación y descongelación de la suspensión de liposomas en una solución de sal vitamínica o su derivado, en nitrógeno líquido y en agua caliente a una temperatura que esté por encima de la temperatura de la transición de fase del lípido principal con el fin de igualar las concentraciones de sal vitamínica o su derivado a ambos lados de las bicapas liposomales;
- 15 c) la disminución del tamaño y de las capas de liposomas, preferiblemente mediante la extracción de los liposomas a través de los filtros de policarbonato con un tamaño de poro adecuado en un extrusor de alta presión o mediante su homogeneización en un homogeneizador de alta presión.
- 20 d) el intercambio de la solución externa de los liposomas, preferiblemente mediante diálisis o mediante el tamiz molecular, a un amortiguador neutro, preferiblemente siendo éste un PBS (tampón fosfato salino) con el fin de formar un gradiente de PH o iónico.
- 25 e) la incorporación del compuesto activo antitumoral, siendo preferiblemente antraciclina;
- 30 f) el calentamiento de la suspensión a una temperatura superior a la temperatura de la transición de fase del principal fosfolípido que forma los liposomas, siendo preferiblemente de 60°C.

35 Igualmente es preferible que un método de conformidad con la presente invención se caracterice en que durante la fase a) se añada fosfatidiletanolamina PEGilada con el fin de estabilizar los liposomas en el sistema circulatorio. Preferiblemente, un método de conformidad con la presente invención se caracteriza en que el derivado vitamínico que se utiliza en la fase a) es metotrexato o una sal de amonio de éste.

40 El tercer objeto de la presente invención es una composición farmacéutica para administrarla vía parenteral que incluye un transportador farmacéuticamente aceptable y/o compuestos auxiliares farmacéuticamente aceptables, y una cantidad terapéuticamente eficiente de un compuesto activo antitumoral, caracterizado en que contiene una formulación liposomal que contiene un compuesto antitumoral que está encapsulado en las vesículas liposomales que forman la composición de componentes lipídicos dentro de una proporción de 1 parte en masa del compuesto activo por una proporción de entre 3 y 12 partes en masa de los componentes lipídicos, siendo
50 preferiblemente de 1 parte en masa del compuesto activo por 5 partes en masa

de los componentes lipídicos así como una vitamina o un derivado de ésta. Igualmente es preferible que una composición de conformidad con la presente invención se caracterice en que contenga metotrexato o una sal de éste, así como un compuesto que provenga de las antraciclinas.

Un liposoma de conformidad con la presente invención se caracteriza por una conveniente proporción del compuesto lipídico/activo, así como por una alta eficiencia de encapsulación del fármaco en liposomas después de 5-10 minutos del proceso de encapsulación de conformidad con el método que se presenta en la descripción. Además, un método de conformidad con la presente invención permite que se puedan preparar liposomas para la llamada terapia combinada, donde se utilizan dos fármacos diferentes con el fin de aumentar el efecto terapéutico. Por consiguiente, en este caso se utiliza un fármaco para que encapsule el segundo, y como consecuencia se obtienen dos fármacos encapsulados dentro de la estructura de un solo liposoma. Este procedimiento también permite que se disminuya la pérdida del complejo del derivado vitamínico, p. ej. del metotrexato y de las antraciclinas, lo que estabiliza ambos fármacos dentro de los liposomas. En el caso del metotrexato, la pérdida de este derivado vitamínico después de la administración intravenosa podría resultar demasiado rápida debido a la presencia de la solución del fármaco acuosa, mientras que la forma precipitada del fármaco se ve favorecida por su mayor estabilidad.

Las realizaciones de la presente invención se muestran en las figuras, donde la Fig. 1 representa un gráfico de la cinética de la encapsulación de la epirubicina en los liposomas que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol debido al uso de un gradiente iónico de 300 mM de una sal de amonio de ácido ascórbico. Las condiciones de la encapsulación del fármaco se dan en el Ejemplo 1. A-C; Fig. 2 representa el efecto del fármaco: proporción lipídica sobre la eficiencia de la encapsulación de la epirubicina en los liposomas que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol debido al uso de un gradiente iónico de 300 mM de una sal de amonio de ácido ascórbico. Las condiciones de la encapsulación de los fármacos se describen en el Ejemplo 2. A; Fig. 3 es la retención de la epirubicina en los liposomas que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol que se encapsulan utilizando un gradiente iónico de 300 mM de una sal de amonio de ácido ascórbico. Las condiciones de la encapsulación de los fármacos se describen en el Ejemplo 3. A; y la Fig. 4 representa la eficiencia de la encapsulación de la epirubicina en los liposomas que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol que utilizan un gradiente iónico de 300 mM de una sal de amonio de ácido fólico, de ácido pantoténico, así como de metotrexato, respectivamente. Las condiciones de la encapsulación del fármaco son las que se muestran en el Ejemplo 4. A-D.

Ejemplo 1

A. Producción de liposomas que contienen ácido ascórbico. Un matraz de fondo redondo de 100ml se cargó con 35,28mg de lecitina de soja hidrogenada (HSPC), con 13,02mg de colesterol (Chol), así como con 11,67mg de distearilfosfatidiletanolamina PEGilada (DSPE-PEG 2000) en forma de soluciones de cloroformo, y después el disolvente orgánico se evaporó utilizando un evaporador de vacío. A la película lipídica seca

se le añadió una solución de 1,5ml de una sal de amonio de ácido ascórbico (pH = 4,0) en una concentración de 300 mM, y después se hidrató a una temperatura de 64°C hasta el punto en el que se obtuvieron liposomas multilamelares.

La suspensión del liposoma se congeló y descongeló en repetidas ocasiones al tratarla de forma alterna en nitrógeno líquido y en agua a una temperatura de 64°C, y después se extrajo en un calibrador de presión mediante un filtro de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm a una temperatura de 64°C.

B. Creación de un gradiente iónico de una sal de amonio de ácido ascórbico.

Los liposomas que se obtuvieron en la parte A se cargaron sobre una columna (1x20cm) llena de un gel Sephadex G-50 fino, se equilibraron en el PBS y después de desalaron, al mismo tiempo que se intercambiaba la solución externa (solución de 300 mM de una sal de amonio de ácido ascórbico) por el tampón fosfato (PBS, pH = 7,4). Tras haber separado los liposomas, la concentración lipídica se determinó utilizando el método Steward.

C. Encapsulación de la epirubicina en los liposomas que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol.

A una suspensión de liposomas que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol que contienen 300 mM de sal de amonio de ácido ascórbico se le añadió una solución de hidrocloreuro de epirubicina en 150 mM de NaCl en una concentración de 6 mg/ml en tal cantidad que por cada 5 partes en masa del lípido había una parte en masa del fármaco. La suspensión se mezcló y se calentó durante 60 minutos a una temperatura de 60°C y se fueron recogiendo muestras de la suspensión en intervalos de tiempo seleccionados. Después de la incubación, determinamos la eficiencia de la encapsulación del fármaco, que después de 10 minutos era del 98%. Se establecieron las condiciones experimentales de tal manera que la concentración lipídica final fuera de 15 mg/ml. Una descripción detallada de la encapsulación del fármaco se muestra en la Fig. 1.

Ejemplo 2.

A. El efecto de la proporción del fármaco y del lípido sobre la eficiencia de la encapsulación de la epirubicina en los liposomas que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol debido al uso de un gradiente iónico de 300 mM de una sal de amonio de ácido ascórbico.

Los liposomas se prepararon como en el Ejemplo 1. de la A a la C, con la diferencia de que el proceso de la encapsulación del fármaco se realizó para varias proporciones en masa del fármaco/lípido; de 1:5 (0,2) a 1:1 (1,0). El tiempo de la encapsulación del fármaco en cada caso se estableció en 10 minutos a 60°C. Después de cada paso de incubación, los liposomas se separaron del fármaco no encapsulado con el fin de determinar la eficiencia de

encapsulación del fármaco. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la Fig. 2.

Ejemplo 3.

- A. Efecto del tiempo de almacenamiento de los liposomas a 4°C sobre la retención de la epirubicina en los liposomas que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol en los que el fármaco se encapsuló utilizando un gradiente iónico de 300 mM de una sal de amonio de ácido ascórbico.

Los liposomas que se obtuvieron en el Ejemplo 1 se incubaron durante 10 minutos con el fin de encapsular el fármaco y después el fármaco no encapsulado se separó de los liposomas sobre una mini columna de 0,5x7cm llena de un gel Sephadex G-50 fino. Se recogieron los liposomas separados y después, tras haber determinado la cantidad del lípido, éste se diluyó con un tampón PBS a pH = 7, 4 de tal manera que la concentración lipídica final fuera de 10 mg/ml. Los liposomas se almacenaron a 4°C. De las partes resultantes de liposomas se recogieron muestras de 50 µl de liposomas en intervalos seleccionados y después se separaron con el fin de determinar las cantidades de fármaco liberado. Los datos que se obtuvieron se muestran en la Fig. 3.

Ejemplo 4.

- A. Producción de liposomas que contienen una sal de amonio de ácido fólico, de ácido pantoténico, así como de metotrexato.

Los liposomas se prepararon como en el Ejemplo 1. A-B con la diferencia de que en vez de utilizar una solución de 300 mM de sal de amonio de ácido ascórbico a pH = 4,0, utilizamos una solución de 300 mM de una sal de amonio de ácido fólico a pH = 7,8, una solución de 300 mM de una sal de amonio de ácido pantoténico a pH = 7,8 o una solución de 300 mM de una sal de amonio de metotrexato.

- B. Encapsulación de la epirubicina en los liposomas que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol utilizando un gradiente iónico de una sal de amonio de ácido fólico.

A una suspensión de liposomas que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol que contienen 300 mM de sal de amonio de ácido fólico se le añadió una solución de hidrocloreuro de epirubicina en 150 mM de NaCl en una concentración de 6 mg/ml, en tal cantidad que por cada 5 partes en masa del lípido había una parte en masa del fármaco. La suspensión se mezcló y se calentó durante 10 minutos a una temperatura de 60°C. Después de la incubación, determinamos la eficiencia de la encapsulación del fármaco, que era del 99%. Se establecieron las condiciones experimentales de tal manera que la concentración lipídica final fuera de 15 mg/ml. Una descripción detallada del proceso de la encapsulación del fármaco se muestra en la Fig. 4.

C. Encapsulación de la epirubicina en los liposomas que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol utilizando un gradiente iónico de una sal de amonio de ácido pantoténico.

La encapsulación del fármaco en los liposomas se realizó como en el Ejemplo 4. B, con la diferencia de que los liposomas no contenían 300 mM de sal de amonio de ácido fólico a pH = 7,8, sino 300 mM de sal de amonio de ácido pantoténico. La eficiencia de la encapsulación del fármaco fue del 97%.

D. Encapsulación de la epirubicina en los liposomas que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol utilizando un gradiente iónico de 300 mM de una sal de amonio de metotrexato a pH = 7,8.

La encapsulación del fármaco en los liposomas se realizó como en el Ejemplo 4. B, con la diferencia de que los liposomas no contenían 300 mM de sal de amonio de ácido fólico a pH = 7,8, sino 300 mM de sal de amonio de metotrexato. La eficiencia de la encapsulación del fármaco fue del 97%.

Los resultados de la encapsulación que se obtuvieron desde el apartado B al D para las sales de 300 mM de ácido fólico, de ácido pantoténico, así como de metotrexato se muestran en la Fig. 4.

Reivindicaciones

- 5 1. Una formulación liposomal que contiene una epirubicina **caracterizada en que** contiene una epirubicina en las vesículas liposomales que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol que forman una composición de componentes lipídicos en una proporción de 1 parte en masa de la epirubicina por una proporción de 3 a 12 partes en masa de los componentes lipídicos, y una solución de 300 mM de ácido ascórbico o de una sal de éste, preferiblemente un ascorbato de amonio, o una solución de 300 mM de ácido fólico o de una sal de éste, preferiblemente folato de amonio, o una solución de 300 mM de ácido pantoténico, preferiblemente una sal de amonio de éste, o una solución de 300 mM de metotrexato o una sal de amonio de éste.
- 15 2. Un método para producir la formulación liposomal de conformidad con la reivindicación número 1, **caracterizado en que** incluye:

 - 20 a) la creación de liposomas multilamelares a través de la hidratación de una mezcla de fosfolípidos, preferiblemente la lecitina de soja hidrogenada o la lecitina de huevo hidrogenada, o la distearilfosfatidilcolina, así como el colesterol, preferiblemente en una cantidad de entre 30 mg/ml y 60 mg/ml en una solución de 300 mM de ácido ascórbico, de ácido pantoténico, de ácido fólico o de metotrexato o su derivado, preferiblemente una sal de amonio de ácido ascórbico, de ácido fólico, de ácido pantoténico o de metotrexato, y preferiblemente se añade fosfatidiletanolamina PEGilada con el fin de estabilizar los liposomas en el sistema circulatorio;
 - 30 b) la congelación y la descongelación de la suspensión de liposomas en una solución de ácido ascórbico o de una sal de éste, preferiblemente un ascorbato de amonio, un ácido fólico o una sal de éste, preferiblemente un folato de amonio o un ácido pantoténico, preferiblemente una sal de amonio de éste y metotrexato o una sal de amonio de éste dentro del nitrógeno líquido y del agua caliente, a una temperatura que esté por encima de la temperatura de transición de fase del lípido principal con el fin de equilibrar las concentraciones de sal vitamínica o de su derivado a ambos lados de las membranas liposomales;
 - 40 c) la disminución del tamaño y del número de capas de los liposomas, preferiblemente mediante la extracción de los liposomas a través de filtros de policarbonato con tamaños de poro adecuados en un extrusor de alta presión o mediante su homogeneización en un homogeneizador de alta presión;
 - 45 d) el intercambio de la solución externa de los liposomas, preferiblemente mediante diálisis o mediante el tamiz molecular, por un tampón neutro, siendo preferiblemente el PBS con el fin de crear el gradiente de pH/iónico;
 - e) la incorporación de la epirubicina;

- f) el calentamiento de la suspensión a una temperatura que sea superior a la temperatura de la transición de fase del fosfolípido principal que forma los liposomas, siendo preferiblemente de 60°C.

5

3. Una composición farmacéutica para que se administre vía parenteral que incluye un transportador farmacéuticamente aceptable y/o compuestos auxiliares farmacéuticamente aceptables, y una cantidad terapéuticamente eficiente de epirubicina, **caracterizada en que** contiene una formulación liposomal que contiene una epirubicina encapsulada dentro de las vesículas liposomales que se componen de HSPC/Chol/DSPE-PEG 2000 5,5:4:0,5 mol/mol que forman una composición de componentes lipídicos en una proporción de 1 parte en masa de la antraciclina por una proporción de entre 3 y 12 partes en masa de los componentes lipídicos, y una solución de 300 mM de ácido ascórbico o de una sal de éste, preferiblemente ascorbato de amonio, una solución de 300 mM de ácido fólico o de una sal de éste, preferiblemente folato de amonio, una solución de 300 mM de ácido pantoténico, preferiblemente una sal de amonio de éste, o una solución de 300 mM de metotrexato o una sal de amonio de éste.

10

15

20

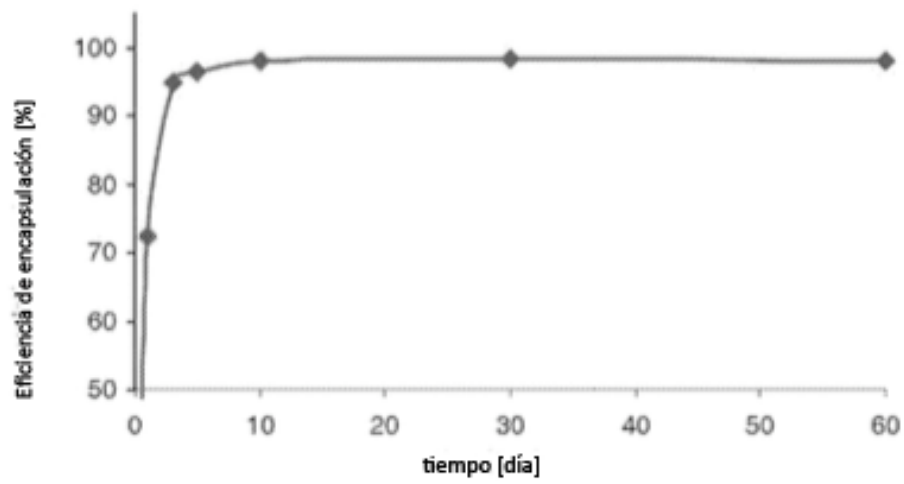


Fig.1.

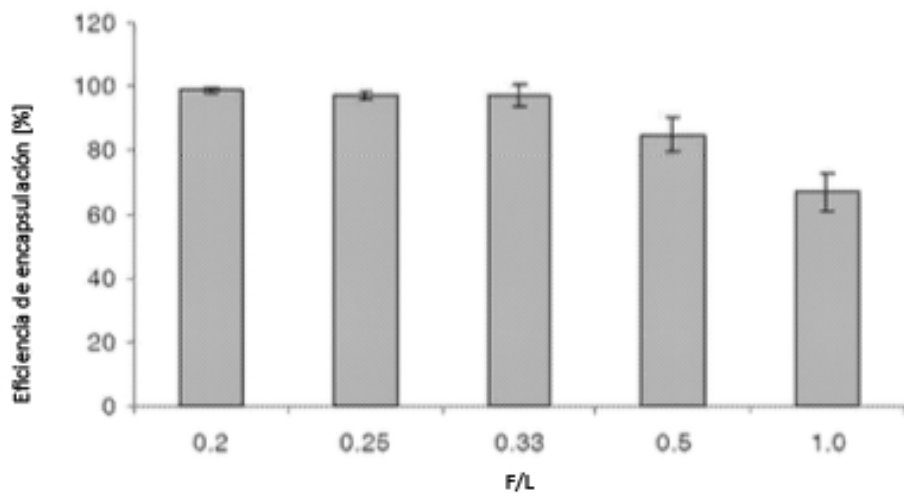


Fig. 2

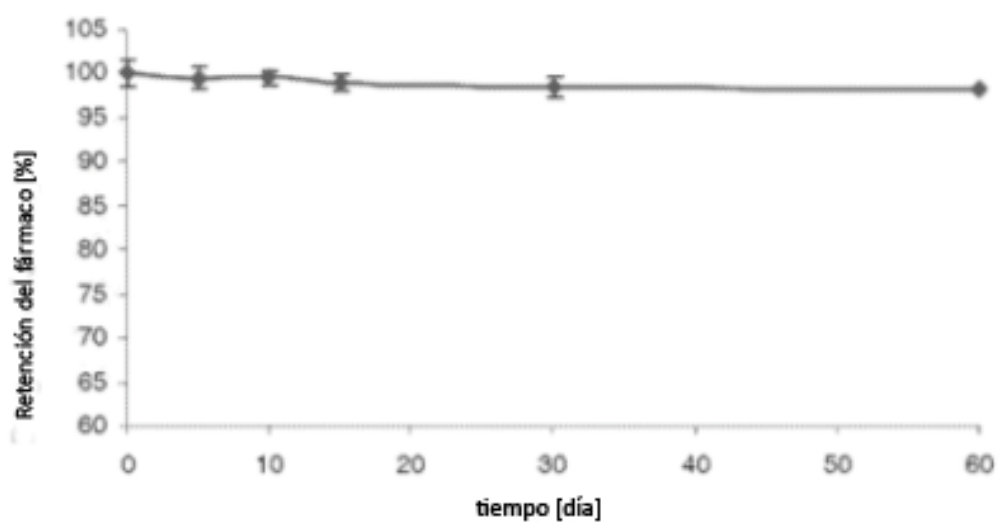


Fig. 3

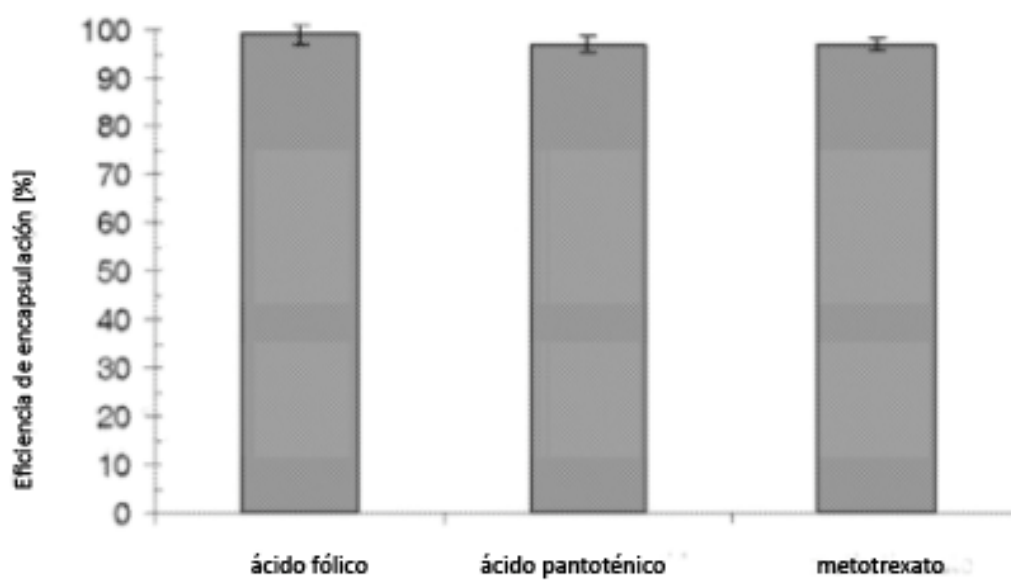


Fig. 4