(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 733 061**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/282 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2013 PCT/JP2013/071720**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14025042**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2013 E 13827386 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2883542**

(54) Título: **Dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino estable y método para estabilización de la misma**

(30) Prioridad:

10.08.2012 JP 2012178971

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2019

(73) Titular/es:

TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)
1-27, Kandanishiki-cho, Chiyoda-ku
Tokyo 101-8444, JP y
THE UNIVERSITY OF TOKUSHIMA (50.0%)

(72) Inventor/es:

DOI, YUSUKE y
ISHIDA, TATSUHIRO

(74) Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 733 061 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

Dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino estable y método para estabilización de la misma

Campo técnico

Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente japonesa n.º 2012-178971, presentada el 10 de agosto de 2012. La presente invención se refiere a una técnica que permite almacenamiento a largo plazo de de liposomas encapsulantes de oxaliplatino en forma de una disolución acuosa.

Antecedentes de la técnica

Con recientes desarrollos en nanotecnología, se han hecho intentos de aplicar la nanotecnología a productos farmacéuticos. En uno de tales intentos, se forman liposomas mediante la dispersión de fosfolípidos en agua. El liposoma es un retículo endoplasmático cerrado formado por una membrana bicapa con grupos hidrófobos de fosfolípidos enfrentados entre sí. Los liposomas se componen de los mismos componentes que las membranas biológicas, y son por tanto altamente biocompatibles. Además, se han realizado muchos estudios en liposomas como portadores de fármacos que pueden transportar o bien fármacos hidrófilos o bien fármacos hidrófobos, dado que los fármacos hidrófilos pueden contenerse en el retículo endoplasmático, mientras que los fármacos hidrófobos pueden incorporarse en la membrana liposomal (bibliografía no de patentes (NPL) 1 y 2). Las características de los liposomas, tales como circulación en sangre y transporte en tumores, dependen de las propiedades físicas (por ejemplo, tamaño de partícula, carga superficial, y tasa de liberación de fármaco) de los liposomas. Para mantener estas propiedades físicas, la estabilidad física de los fosfolípidos, que son el componente principal de la membrana liposomal, es importante. La degradación de fosfolípidos reduce la estabilidad de los liposomas en el cuerpo vivo, y provoca cambios farmacocinéticos en el cuerpo. Los cambios farmacocinéticos en el cuerpo provocan de manera directa reducción de los efectos farmacológicos, generación de efectos secundarios inesperados, etc. Por tanto, la protección de los fosfolípidos se considera esencial para la aplicación de los liposomas a productos farmacéuticos.

El oxaliplatino es un compuesto complejo de platino sintetizado por el Dr. Kidani *et al.* en 1978. El oxaliplatino es uno de los agentes anticancerígenos más ampliamente usados mundialmente en el tratamiento de cáncer colorrectal. Sin embargo, el oxaliplatino, que tiene una alta tasa de unión a proteínas plasmáticas y hemocitos, y que es propenso a distribución en tejidos normales, se ha confirmado que tiene una alta toxicidad, tal como neurotoxicidad periférica. Esto es similar a otros agentes anticancerígenos, y por tanto necesita mejorarse. Se ha estudiado la aplicación de una técnica liposomal como enfoque para esta mejora (véase la bibliografía de patentes (PTL) 1 a 3). La técnica liposomal, de la cual se espera que inhiba la distribución sistémica no selectiva y promueva el transporte en tumores debido a la permeabilidad y efecto de retención potenciados (efecto EPR), puede esperarse que proporcione una actividad antitumoral mayor al mismo tiempo que reduce la toxicidad de oxaliplatino. La PTL 1 divulga una preparación de liposomas obtenida mediante encapsulación de oxaliplatino en liposomas modificados con PEG (polietilenglicol), que tiene una larga circulación en sangre. La PTL 2 divulga una preparación de liposomas modificada con PEG modificada adicionalmente con transferrina. La PTL 3 divulga un método para encapsular oxaliplatino de manera eficaz, y efectos liposomales del mismo. Sin embargo, el oxaliplatino tiene una mala compatibilidad con otros aditivos (PTL 4). Además, se considera que la reducción de pH debido a un producto de degradación provoca ruptura de liposomas. Sin embargo, ninguno de los anteriores documentos de la técnica anterior divulga un método para estabilización a largo plazo de preparaciones liposomales que son indispensables como productos farmacéuticos.

Las técnicas conocidas para estabilizar dispersiones acuosas de liposomas incluyen, por ejemplo, el uso de una disolución tampón de ácido cítrico o ácido tartárico (PTL 5), histidina (NPL 3), taurina (PTL 6), o tris (PTL 7) como estabilizador. Sin embargo, estos documentos no mencionan si las técnicas divulgadas en los mismos pueden usarse para estabilizar una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino. Estos estabilizadores se añaden principalmente para reducir la hidrólisis de fosfolípidos debida al cambio de pH, y no son aditivos usados en consideración de la compatibilidad con un compuesto específico. Por consiguiente, dependiendo del tipo de fármaco que va a encapsularse, el contacto del fármaco con un aditivo puede afectar a la estabilidad del fármaco y reducir la calidad como producto farmacéutico. En el caso de formulaciones liposomales, la reducción de pH en dispersiones acuosas acelera la hidrólisis de fosfolípidos. En dispersiones acuosas de liposomas encapsulantes de oxaliplatino, el oxaliplatino que existe en una muy baja concentración en la fase acuosa externa es propenso a descomponerse, y la desorción de ácido oxálico provoca reducción de pH (la PTL 4 divulga que el oxaliplatino que tiene una concentración inferior a 1 mg/ml tiende a ser inestable). Además, la liberación de ácido carboxílico como hidrolizado de fosfolípidos reduce aún más la reducción de pH en el sistema. Se considera que la reducción de pH debida a ácido oxálico y/o ácido carboxílico acelera la degradación de fosfolípidos y reduce aún más el pH, dando como resultado por tanto un ciclo negativo. De hecho, durante la investigación, los presentes inventores produjeron preparaciones de liposomas encapsulantes de oxaliplatino usando dispersiones acuosas preparadas con referencia a los anteriores documentos de la técnica, y confirmaron la degradación acelerada de oxaliplatino o fosfolípidos con el paso del tiempo.

Lista de referencias

Bibliografía de patentes

PTL 1: WO2009/096487

PTL 2: JP2004-10481A

PTL 3: WO2007/099377

PTL 4: WO1996/04904

PTL 5: WO1997/30696

PTL 6: JPH05-004037A

PTL 7: WO1997/28104

Bibliografía no de patentes

NPL 1: International Journal of Nanomedicine, 2006, 1 (3), 297-315

NPL 2: Science, (2004), Vol. 303, 1818-1822

NPL 3: Bioanalysis, (2011), 3 (3), 333-344

El documento US 2004/022842 se refiere a una preparación de liposomas que contiene oxaliplatino y se derivatiza con un polímero hidrófilo y un ligando. En una realización el polímero hidrófilo es polietilenglicol y el ligando es transferrina.

El documento WO 2008/030818 se refiere a composiciones que contienen lípidos, incluyendo liposomas seleccionados como diana que encapsulan metotrexato, y formulaciones farmacéuticas del mismo, así como métodos para la fabricación y uso de las composiciones que contienen lípidos, incluyendo el uso de liposomas seleccionados como diana en el tratamiento de cáncer, artritis reumatoide y otras enfermedades.

Sumario de la invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino que tiene alta estabilidad de almacenamiento a largo plazo. Además, la presente invención proporciona una técnica para estabilizar una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino.

Solución al problema

Los presentes inventores llevaron a cabo un estudio exhaustivo y, como resultado, encontraron que cuando el ácido 2-morfolinoetanosulfónico (a continuación en el presente documento denominado MES) está contenido como estabilizador en la fase acuosa externa de los liposomas, puede obtenerse una dispersión acuosa en la que los fosfolípidos se mantienen de manera suficientemente estable durante un largo periodo de tiempo mientras el contenido total de oxaliplatino de los liposomas apenas se ve afectado. Los inventores encontraron además que la adición de MES sólo a la fase acuosa externa de liposomas puede estabilizar una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino durante un largo periodo de tiempo. Los inventores investigaron además el pH óptimo, etc., de la dispersión acuosa de liposomas, y lograron la presente invención.

Específicamente, la presente invención proporciona las siguientes dispersiones acuosas de liposomas, estabilizador para las dispersiones, y métodos para estabilizar las dispersiones.

Punto 1. Una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino que comprende una fase acuosa externa que contiene ácido 2-morfolinoetanosulfónico, en la que los liposomas comprenden, como componente liposomal, fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas purificadas.

Punto 2. La dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según el punto 1, en la que la dispersión comprende una fase acuosa interna que no contiene sustancialmente ácido 2-morfolinoetanosulfónico.

Punto 3. La dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según los puntos 1 ó 2, en la que la dispersión tiene un pH de 6,0 a 7,0.

Punto 4. La dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en la que los liposomas comprenden al menos un fosfolípido saturado como componente liposomal.

Punto 5. La dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en la que la cantidad de ácido 2-morfolinoetanosulfónico es de 0,00001 a 10 partes en masa por parte en masa de fosfolípido formador de liposomas.

Punto 6. Uso de ácido 2-morfolinoetanosulfónico o una sal del mismo como estabilizador para una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino, en el que los liposomas comprenden, como componente liposomal, fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas purificadas.

Punto 7. El uso según el punto 6, en el que la dispersión tiene un pH de 6,0 a 7,0.

Punto 8. Un método para estabilizar una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino, que comprende añadir ácido 2-morfolinoetanosulfónico o una sal del mismo a la dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino, en el que los liposomas comprenden, como componente liposomal, fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas purificadas.

Punto 9. El método según el punto 8, en la que la dispersión tiene un pH de 6,0 a 7,0.

Punto 10. Una composición farmacéutica que comprende la dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según uno cualquiera de los puntos 1 a 5.

Punto 11. La dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según uno cualquiera de los puntos 1 a 5, para su uso en un método para tratar el cáncer.

Punto 12. La dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según uno cualquiera de los puntos 1 a 5, para su uso como potenciador de efecto antitumoral para su uso en un método para potenciar la actividad antitumoral de un agente antitumoral.

Punto 13. La dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino para su uso según el punto 12, comprendiendo además el uso administrar un agente antitumoral a un mamífero.

Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, puede obtenerse una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino que tiene una excelente estabilidad de almacenamiento a largo plazo. La presente invención permite la provisión de una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino que es estable durante un largo periodo de tiempo, incluso cuando se almacena a una temperatura relativamente alta de 40ºC.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra cambios en la concentración de Pt en plasma sanguíneo a lo largo del tiempo en el ejemplo de prueba 3.

Descripción de las realizaciones

El MES usado en la presente invención es un compuesto conocido, y está disponible como ácido 2-morfolinoetanosulfónico de fabricantes tales como Sigma-Aldrich (código de producto: M8250), Merck (código de producto: 106126), y Dojindo Laboratories, Inc. (código de producto: GB81). En la presente invención, la sal de MES se refiere a una sal usada comúnmente en el campo de la química orgánica. Por ejemplo, dado que MES tiene un grupo ácido sulfónico, puede usarse una sal de adición de base formada mediante la adición de una base al grupo ácido sulfónico.

Los ejemplos de la sal de adición de base incluyen sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y sales de potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y sales de magnesio; sales de amonio; y sales de aminas orgánicas tales como sales de trimetilamina, sales de trietilamina, sales de diciclohexilamina, sales de etanolamina, sales de dietanolamina, sales de trietanolamina, sales de procaína, y sales de N,N'-dibenziletilendiamina.

La cantidad de MES o una sal del mismo que va a añadirse, basándose en partes en masa de MES, es de 0,00001 a 10 partes en masa, preferiblemente de 0,00005 a 1 parte en masa, y más preferiblemente de 0,0001 a 0,1 partes en masa, por parte en masa del/los fosfolípido(s) formador(es) de liposomas.

En la presente invención, MES o una sal del mismo puede añadirse en forma de una disolución o polvo a la fase acuosa externa de la dispersión acuosa de liposomas durante el proceso de fabricación liposomal, o puede añadirse mediante el reemplazo de la fase acuosa externa con un tampón que contiene una concentración fijada de MES mediante ultrafiltración, diálisis, o similares. La adición puede llevarse a cabo de manera concurrente con una etapa de eliminación de fármaco sin encapsular. Alternativamente, también es posible añadir MES o una sal del mismo a la dispersión acuosa final. Es preferible añadir una cantidad predeterminada de una disolución concentrada de MES (el volumen que va a añadirse es del 1% o menos del fármaco) inmediatamente antes de la esterilización por filtración. Añadir MES o una sal del mismo a la dispersión acuosa final también da como resultado una presencia sustancial de MES o una sal del mismo en la fase acuosa externa.

En la presente invención, la fase acuosa externa tiene preferiblemente un pH de 5,0 a 8,0, más preferiblemente de 5,5 a 7,5, e incluso más preferiblemente de 6,0 a 7,0. En la presente invención, el pH de la fase acuosa externa se determina sumergiendo los electrodos de un pH-metro en una dispersión liposomal. El pH de la fase acuosa externa puede ajustarse al valor de pH deseado, por ejemplo, añadiendo un ajustador de pH después de añadir MES o una sal del mismo a la dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino. Los ejemplos de ajustadores de pH que pueden usarse para este ajuste de pH incluyen hidróxidos de metales alcalinos y/o hidróxidos de metales alcalinotérreos. Los ejemplos específicos incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidrogenocarbonato de sodio. Es preferible el hidróxido de sodio.

En la presente invención, “estabilidad de almacenamiento a largo plazo” significa que no se produce ninguna precipitación, agregación, ni cambio de tamaño de las partículas después del almacenamiento en un lugar frío durante al menos 6 meses, y que hay poca degradación del oxaliplatino y fosfolípidos, o que la degradación se produce a un nivel aceptable.

En la presente invención, “encapsulante” se refiere al estado en el que un fármaco (oxaliplatino) se encapsula en el espacio cerrado de un liposoma formado por una membrana lipídica, o al estado en que un fármaco (oxaliplatino) se transporta de una manera tal que una porción o todo el fármaco se contiene en las capas lipídicas que forman la membrana.

El “oxaliplatino” (a continuación en el presente documento denominado a veces “L-OHP”) usado en la presente invención es un compuesto conocido y se representa mediante cis-oxalato(1R,2R-diaminociclohexano)platino(II). La unión de L-OHP al ADN de células cancerígenas provoca daño funcional del ADN y escisión de la hebra de ADN, que conducen a la muerte de células cancerígenas. El oxaliplatino puede producirse usando un método conocido, tal como los métodos divulgados en los documentos JPS60-41077B y JPH06-211833A.

El “liposoma” que va a usarse en la presente invención es una vesícula cerrada que tiene una porción de fase acuosa interna delimitada por una membrana lipídica bicapa que se forma mediante la dispersión en agua de al menos un fosfolípido que es un componente de membrana celular. Los liposomas pueden clasificarse en los siguientes tres tipos según el tamaño de la partícula y el número de biomoléculas lipídicas: vesículas multilaminares (MLV), vesículas unilaminares grandes (LUV), y vesículas unilaminares pequeñas (SUV). Siempre que el liposoma sea una vesícula cerrada con una estructura de bicapa lipídica, cualquier tipo de liposoma puede usarse en la presente invención.

Los liposomas usados en la presente invención deben formar una estructura liposomal estable antes y después de la administración a organismos vivos. Los ejemplos de fosfolípidos que forman los liposomas incluyen fosfolípidos saturados, que pueden seleccionarse, por ejemplo, de fosfatidilcolinas de yema de huevo hidrogenadas purificadas (temperatura de transición de fase: 50ºC, a continuación en el presente documento denominada HEPC), fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas purificadas (temperatura de transición de fase: aproximadamente 55ºC, a continuación en el presente documento denominada HSPC), dipalmitoilfosfatidilcolinas (temperatura de transición de fase: aproximadamente 41ºC, a continuación en el presente documento denominada DPPC), y distearoilfosfatidilcolinas (temperatura de transición de fase: aproximadamente 58ºC, a continuación en el presente documento denominada DSPC). Según la invención, los liposomas comprenden, como componente liposomal, fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas purificadas. Usando fosfolípidos que tienen diferentes temperaturas de transición de fase, puede cambiarse la fluidez de la membrana lipídica bimolecular de los liposomas. El fosfolípido más adecuado puede seleccionarse en vista de la tasa de encapsulación del fármaco, estabilidad en una preparación farmacéutica, cambios farmacocinéticos *in vivo* tras la administración, etc.

En esta memoria descriptiva, “fosfatidilcolinas de yema de huevo hidrogenadas” se refieren a aquellas obtenidas mediante hidrogenación de fosfatidilcolinas derivadas de yema de huevo. Los ejemplos de fosfatidilcolinas de yema de huevo hidrogenadas preferidas incluyen aquellas que comprenden como componente principal una fosfatidilcolina en la que el resto acilo es un grupo acilo derivado de un ácido graso de cadena lineal saturado C_{16-18}. En la presente invención, “fosfatidilcolinas de yema de huevo hidrogenadas purificadas” se refieren a aquellas obtenidas mediante purificación de fosfatidilcolinas de yema de huevo hidrogenadas. Por ejemplo, pueden usarse fosfatidilcolinas de yema de huevo hidrogenadas que tienen una pureza del 80% o más, y preferiblemente el 90% o más.

En esta memoria descriptiva, “fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas” se refieren a aquellas obtenidas mediante hidrogenación de fosfatidilcolinas derivadas de soja. Los ejemplos de fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas preferidas incluyen aquellas que comprenden, como componente principal, una fosfatidilcolina en la que el resto acilo es un grupo acilo derivado de un ácido graso de cadena lineal saturado C_{16-18}. En la presente invención, “fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas purificadas” se refieren a aquellas obtenidas mediante purificación de fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas. Por ejemplo, pueden usarse fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas que tienen una pureza del 80% o más, preferiblemente el 90% o más.

Para estabilizar de manera física o química la bicapa lipídica y para ajustar la fluidez de membrana, la bicapa lipídica puede comprender, por ejemplo, colesterol, ácido succínico de colesterol, lanosterol, dihidrolanosterol, desmosterol, dihidrocolesterol, y esteroles similares derivados de animales; estigmasterol, sitosterol, campesterol, brasicasterol, y esteroles similares derivados de plantas (fitoesteroles); cimosterol, ergosterol, y esteroles similares derivados de microorganismos; glicerol, sacarosa, y sacáridos similares; trioleína, trioctanoína y ésteres de ácidos grasos de glicerina similares. Estos pueden usarse de manera individual, o en una combinación de dos o más. La cantidad de los mismos no está particularmente limitada, pero es preferiblemente del 10 al 50% (razón molar), y más preferiblemente del 20 al 40% (razón molar), basándose en la cantidad total de los lípidos que forman la bicapa lipídica.

La bicapa lipídica puede comprender tocoferol, galato de propilo, palmitato ascorbilo, hidroxitolueno butilado, y agentes antioxidantes similares; estearilamina, oleilamina, y materiales cargados similares para proporcionar una carga positiva; fosfato de dicetilo y materiales cargados similares para proporcionar una carga negativa; y proteína extrínseca de membrana, proteína intrínseca de membrana, y proteínas de membrana similares. La cantidad de los mismos puede ajustarse de manera conveniente.

Modificar aún más la superficie de la membrana liposomal con un ligando según se desee puede mejorar aún más la estabilidad liposomal en sangre, distribución tisular, y transporte tejidos tumorales. Los ejemplos de tales ligandos incluyen polímeros hidrófilos tales como polietilenglicol y poliglicerina, lípidos que contienen grupo funcional básico tal como un grupo amina, un grupo amidina, o un grupo guadinina (a continuación en el presente documento denominados “lípidos cationizados”), péptidos, lectinas, anticuerpos, sacáridos, glicoproteínas y glicolípidos.

En la presente invención, el “polietilenglicol” incluye no sólo polietilenglicol sin sustituciones, sino también derivados de polietilenglicol que tienen una cadena lateral oleófila (hidrófoba) unida de manera covalente. Los ejemplos específicos de la cadena lateral oleófila incluyen cadenas alquilo, fosfolípidos, y colesteroles. Son preferibles fosfolípidos que tienen un polietilenglicol unido de manera covalente. Los ejemplos de fosfolípidos que tienen un polietilenglicol unido de manera covalente incluyen EPC (fosfatidilcolina de huevo), DLPC (dilinoleoilfosfatidilcolina), DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DSPC (distearoilfosfatidilcolina), POPC (palmitoiloleoilfosfatidilcolina), DOPC (dioleoilfosfatidilcolina), DSPE (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina), y SOPE (estearioloeoilfosfatidilcolina). Entre estos, EPC, DOPC, DSPE, DOPE, SOPE, y similares son preferibles, y DSPE es más preferible. Puede usarse una amplia variedad de derivados de polietilenglicol que se usan habitualmente para mejorar la estabilidad de los liposomas como derivados de polietilenglicol. De manera similar, en la presente invención, la “poliglicerina” no sólo incluye poliglicerina sin sustituciones, sino también derivados de poliglicerina que tienen una cadena lateral oleófila (hidrófoba) unida de manera covalente. Los ejemplos específicos de la cadena lateral oleófila incluyen cadenas alquilo, fosfolípidos, y colesteroles. Puede usarse una amplia variedad de derivados de poliglicerina que se usan habitualmente para mejorar la estabilidad de los liposomas como derivados de poliglicerina. Si es necesario, la fase acuosa usada como base puede contener además agentes isotónicos (por ejemplo, manitol, glicerol, sacarosa, glucosa, y cloruro de sodio) y conservantes (por ejemplo, parabenos, clorobutanol, alcohol bencílico, y propilenglicol), siempre que los efectos de la presente invención no se vean alterados. El oxaliplatino está en forma de una disolución en esta fase acuosa y está presente en los liposomas, mientras que MES, que es un estabilizador, está en forma de una disolución en fase acuosa y está presente fuera los liposomas.

Además, una pequeña cantidad de taurina puede añadirse fuera de los liposomas para ayudar a la acción estabilizadora liposomal de MES. La cantidad de taurina añadida no es más de 1 parte en masa, preferiblemente de 0,0001 a 0,5 partes en masa, por parte en masa de MES.

La preparación de liposomas de la presente invención está preparada usando un método conocido. Los ejemplos de un método conocido para preparar una preparación de liposomas incluyen un método de evaporación en fase inversa (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 75-4194, 1978, documento WO97/48398), un método de congelación y descongelación (Arch. Biochem. Biophys, vol. 212, 186, 1981), un método de gradiente de pH (Biochem. Biophys. Acta, vol. 816, 294, 1985, documento JPH7-165560A), y un método de hidratación.

Entre estos métodos, cuando se usa el método de evaporación en fase inversa, puede producirse la preparación de liposomas de la presente invención, por ejemplo, mediante el siguiente proceso. Un componente lipídico se disuelve en un disolvente tal como cloroformo, éter, o etanol, y la disolución resultante se coloca en un matraz de recuperación. El disolvente se elimina por destilación a presión reducida para formar una película fina de lípido. Después, se añade un líquido mixto que contiene cloroformo y dietil éter con una razón de cloroformo/dietil éter de

1/2 para disolver la película fina. Se añade una disolución acuosa de oxaliplatino a lo anterior, y se sonica la mezcla a 25ºC durante 15 minutos para obtener una emulsión. Después, la porción de disolvente orgánico se elimina mediante destilación a presión reducida usando un evaporador durante aproximadamente 1 hora mientras se agita con vórtex para invertir una emulsión de agua en aceite en una emulsión de aceite en agua. Se forman por tanto liposomas, y el oxaliplatino se encapsula simultáneamente en los liposomas.

Un ejemplo de producción de liposomas usando un método de hidratación se describe a continuación. Después de que uno o más componentes lipídicos, tales como fosfolípidos, colesteroles, y derivados de alto peso molecular, se disuelven en un disolvente orgánico, el disolvente orgánico se elimina mediante evaporación para obtener una membrana lipídica. Los ejemplos del disolvente orgánico usado en este proceso incluyen hidrocarburos tales como pentano, hexano, heptano, y ciclohexano; hidrocarburos halogenados tales como cloruro de metileno y cloroformo; hidrocarburos aromáticos tales como benceno y tolueno; alcoholes inferiores tales como metanol y etanol; ésteres tales como acetato de metilo y acetato de etilo; y cetonas tales como acetona. Estos pueden usarse de manera individual, o en una combinación de dos o más.

Después de que uno o más lípidos que son un componente de la bicapa lipídica se disuelven en un disolvente orgánico, el disolvente orgánico se elimina mediante evaporación para obtener una membrana lipídica. Después, la membrana lipídica se hidrata con una disolución acuosa de oxaliplatino, y se agita o ultrasonica para producir liposomas.

Alternativamente, la preparación de liposomas de la presente invención también puede producirse según el siguiente ejemplo de producción. Uno o lípidos formadores de membrana liposomal (por ejemplo, fosfolípidos, colesteroles, y derivados de polímero hidrófilo) se disuelven en un disolvente orgánico volátil, preferiblemente etanol absoluto, mientras se calienta para obtener una disolución lipídica. La temperatura de calentamiento debe fijarse en no menos que la temperatura de transición de fase de los fosfolípidos usados. Cuando se usa HSPC, la temperatura de calentamiento es de 50 a 80ºC, y es preferiblemente de 60 a 70ºC. Después, se disuelven en agua un agente modulador osmótico, un ajustador de pH, oxaliplatino, etc. Después de que la disolución resultante se caliente hasta una temperatura similar a la temperatura de la disolución lipídica, la disolución se mezcla con la disolución lipídica, y se agita para obtener una dispersión liposomal bruta. La agitación puede llevarse a cabo usando un agitador magnético, un agitador de estilo de hélices, o similares. Además, la dispersión puede emulsionarse usando una homomezcladora o similares, si fuera necesario.

La composición liposomal usada en la presente invención comprende preferiblemente un HSPC, colesterol, y un fosfolípido unido a polietilenglicol (por ejemplo, DSPE unido a polietilenglicol). Específicamente, la razón de composición liposomal (en una base molar) es preferiblemente tal que la razón de fosfolípido:colesterol: fosfolípido que tiene un polietilenglicol unido de manera covalente es preferiblemente de 1:0,01 a 2:0,005 a 0,5, y más preferiblemente de 1:0.1 a 1:0,01 a 0.1.

Se ha informado que el tamaño de partícula de los liposomas afecta de manera importante a la biodistribución de oxaliplatino encapsulado y transporte en tejidos tumorales (Biol. Pharm. Bull., vol. 17, 935, 1994). Para obtener liposomas de tamaño uniforme y apropiado que contienen oxaliplatino en los mismos, el dimensionado de las partículas se lleva a cabo preferiblemente en la presente invención. Por ejemplo, tratamiento supersónico usando un biodisruptor (producido por Nippon Seiki Co., Ltd., etc.) o emulsificación a altas presiones usando un nanomizador (producido por Yoshida Kikai Co., Ltd.) pueden llevarse a cabo para ajustar el tamaño de la partícula de los liposomas a un tamaño de partícula medio de aproximadamente 100 a 200 nm. Alternativamente, la disolución liposomal puede verse sujeta a dimensionado (0,4 μm, 0,2 μm, 0,1 μm y 0,08 μm) a una presión de nitrógeno usando diversos filtros de membrana policarbonados para ajustar el tamaño de partícula medio a aproximadamente de 100 a 300 nm.

El término “tamaño de partícula medio” tal como se usa en el presente documento se refiere a un diámetro de partícula promedio determinado mediante un método de dispersión dinámica de luz usando un FPAR-1000 (producido por Otsuka Electronics Co., Ltd.).

La preparación de liposomas según la presente invención puede obtenerse, por ejemplo, mediante métodos descritos en los documentos WO2009/096487, JP2004-10481A, WO2007/099377, y JP2006-248978A que divulgan preparaciones de liposomas encapsulantes de oxaliplatino.

En una realización preferida, la preparación de liposomas de la presente invención se produce usando una disolución de oxaliplatino preparada disolviendo oxaliplatino en una disolución de sacarosa del 1 al 20% a una concentración de 1 a 20 mg/ml. La preparación de liposomas encapsulantes de oxaliplatino así obtenida está sujeta, si es necesario, a ultracentrifugación, filtración en gel, ultrafiltración, o diálisis, que pueden llevarse a cabo de manera individual o en una combinación conveniente, para de este modo eliminar el oxaliplatino sin encapsular en el liposoma.

La preparación de liposomas encapsulantes de oxaliplatino obtenida por el método anterior puede usarse sin modificar como dispersión acuosa. Sin embargo, en vista de la duración del periodo de almacenamiento,

condiciones de almacenamiento, etc., la preparación de liposomas encapsulantes de oxaliplatino puede liofilizarse y almacenarse después de añadir un excipiente, tal como manitol, trehalosa, lactosa, o glicina, y el producto resultante puede usarse como dispersión acuosa que contiene MES de la presente invención. Alternativamente, la preparación de liposomas encapsulantes de oxaliplatino puede crioconservarse después de añadir un agente de crioconservación, tal como glicerol, y el producto resultante puede usarse como dispersión acuosa que contiene MES de la presente invención.

En una realización preferida, la preparación de liposomas encapsulantes de oxaliplatino contiene oxaliplatino en una cantidad de 1 a 100 μg/mg de fosfolípidos, preferiblemente de 5 a 60 μg/mg de fosfolípidos, y más preferiblemente de 10 a 50 μg/mg de fosfolípidos.

La preparación de liposomas encapsulantes de oxaliplatino de la presente invención tiene un diámetro de partícula medio de preferiblemente 50 a 300 nm, más preferiblemente de 80 a 200 nm, e incluso más preferiblemente de 100 a 150 nm.

La dispersión liposomal de la presente invención puede usarse tanto *in vivo* como *in vitro.* Cuando la dispersión liposomal de la presente invención se usa *in vivo,* la vía de administración puede ser, por ejemplo, inyección intravenosa o goteo intravenoso. La dosis y frecuencia de administración pueden ajustarse de manera conveniente según la cantidad de oxaliplatino encapsulado en la dispersión liposomal de la presente invención, el paciente, etc.

Una característica de la dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino de la presente invención es que el oxaliplatino está contenido en la fase acuosa interna de los liposomas. La dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino de la presente invención incluye, siempre que los efectos de la presente invención se mantengan, aquellas en las que una porción de oxaliplatino permea la bicapa lipídica y se filtra a la fase acuosa externa. De manera similar, la dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino de la presente invención incluye además, siempre que los efectos de la presente invención se mantengan, aquellas en las que una porción del MES presente en la fase acuosa externa penetra en la fase acuosa interna.

La dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino se suspende o diluye generalmente con una disolución acuosa fisiológicamente aceptable, y se usa como una preparación inyectable (preparación administrada de manera intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, o subcutánea). Sin embargo, la dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino puede también procesarse y usarse como una preparación oral, una disolución oftálmica, un pulverizador nasal, un inhalante, un supositorio, una preparación transdérmica, una preparación transmucosa, etc. En este caso, la dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino adopta la forma de una composición farmacéutica de manera usual usando uno o más portadores farmacéuticos adecuados. Los ejemplos de portadores que pueden usarse incluyen aquellos que se usan comúnmente en preparaciones farmacéuticas convencionales. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen agentes isotónicos, ajustadores de pH, conservantes, estabilizadores, colorantes, correctores, agentes enmascarantes de olor, y tensioactivos. Estos portadores pueden usarse siempre que los efectos de la presente invención no se vean afectados.

No hay limitación particular sobre el tipo de tumor maligno que puede tratarse administrando la preparación farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos del tumor maligno incluyen cánceres epiteliales (por ejemplo, cánceres respiratorios, cánceres del aparato digestivo, cánceres del aparato reproductor y cánceres del sistema endocrino), sarcomas, y tumores de células hematopoyéticas, preferiblemente cánceres epiteliales, y más preferiblemente cánceres del aparato digestivo. No hay limitación particular sobre el órgano en el que el tumor se origina. Los ejemplos específicos incluyen cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepático, cáncer de vesícula biliar/vía biliar, cáncer de páncreas, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de faringe, tumor cerebral, leucemia, melanoma y linfoma maligno. En particular, se espera que una combinación de la preparación farmacéutica con un agente anticancerígeno basado en 5-FU proporcionen un efecto destacable en cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de mama, y cáncer de cabeza y cuello. Además, también se espera un efecto destacable en tumores farmacorresistentes típicos y tumores que están desarrollando resistencia a fármacos.

La cantidad de oxaliplatino que va a contenerse en tal forma farmacéutica unitaria varía dependiendo del estado del paciente a quien se le administra, o de la forma farmacéutica. La cantidad deseable de oxaliplatino por unidad de forma farmacéutica es normalmente de aproximadamente 0,05 a 1.000 mg en preparaciones orales, aproximadamente de 0,01 a 500 mg en inyecciones, y aproximadamente de 1 a 1.000 mg en supositorios.

La dosis diaria del fármaco en tal forma farmacéutica varía dependiendo del estado, peso corporal, edad, sexo, etc., del paciente, y no puede generalizarse. La dosis diaria para adultos (pero corporal: 50 kg) puede ser normalmente de aproximadamente 0,05 a 5,000 mg, preferiblemente de 0,1 a 1,000 mg, que se administra preferiblemente de una vez o dividida en aproximadamente dos o tres porciones al día.

Los ejemplos de mamíferos a los que se administra la dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino de la presente invención incluyen humanos, monos, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, vacas, caballos, cerdos y ovejas. La dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino de la presente invención tiene un efecto potenciador de la actividad antitumoral de agentes antitumorales. Por consiguiente, la dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino de la presente invención puede usarse como potenciador de efecto antitumoral para potenciar la actividad antitumoral de un agente antitumoral.

Pueden usarse una amplia variedad de agentes antitumorales conocidos como agente antitumoral que va a usarse en combinación con la dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino de la presente invención. Los ejemplos de tales agentes antitumorales incluyen 5-fluorouracilo, doxifluridina, capecitabina, un fármaco anticancerígeno combinado que contiene tres componentes, es decir, tegafur, gimeracilo y oteracilo potasio, como principios activos, y CPT-11.

El potenciador de efecto antitumoral de la presente invención de manera separada o concurrente con un agente antitumoral. Más específicamente, el potenciador de efecto antitumoral de la presente invención puede administrarse de manera concurrente o en cualquier momento antes o después de la administración del agente antitumoral usado en combinación con el mismo. Preferiblemente, el potenciador de efecto antitumoral se administra de manera concurrente o en el plazo de 4 horas antes o después de la administración del agente antitumoral, y más preferiblemente en el plazo de 2 horas antes o después de la administración del agente antitumoral.

Cuando el potenciador de efecto antitumoral se administra de manera concurrente con o separada del agente antitumoral, el potenciador de efecto antitumoral se administra preferiblemente en una cantidad tal que la cantidad de oxaliplatino por mol del agente antitumoral está dentro del intervalo de aproximadamente 0,1 a 5 moles, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 3 moles, y más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a 2 moles.

Ejemplos

A continuación se proporcionan ejemplos de producción, ejemplos de referencia, ejemplos, ejemplos comparativos y ejemplos de prueba para ilustrar la invención en más detalle; sin embargo, el alcance de la invención no está limitado por estos ejemplos y ejemplos de prueba.

Ejemplo 1

(1) Preparación de la disolución de MES

Se preparó una disolución acuosa 3 mM de ácido 2-morfolinoetanosulfónico (producido por Dojindo Laboratories Co., Ltd., código de producto: 349-01623) (a continuación en el presente documento denominada “disolución de MES”) y se ajustó a un pH de 6,0 a 6,5 con NaOH 0,1 N.

(2) Preparación de muestras para evaluar la compatibilidad

Se añadieron 1,12 g de un polvo lipídico mixto (HSPC/Chol/mPEG2000-DSPE = 2/1/0,1, mol/mol) con agitación a 50 ml de una disolución de sacarosa al 10% calentada hasta de 60 a 70ºC. Se creó entonces un estado de emulsión más homogéneo mediante el uso de una homomezcladora o similar según fuese apropiado. Después, se hizo pasar la emulsión a través de un filtro de policarbonato con un diámetro de poro de 0,2 μm varias veces para obtener una dispersión de liposomas placebo con un tamaño de partícula medio de 100 a 200 nm. Se usó esta dispersión como muestra de HSPC.

Se añadió la disolución de MES preparada anteriormente en (1) a 1 ml de la muestra de oxaliplatino (disolución acuosa 1 mg/ml) para hacer que el volumen total fuera de 20 ml. Se usó la mezcla resultante como una muestra para evaluar la compatibilidad de oxaliplatino con MES. De manera similar, se añadió la disolución de MES a 1 ml de la muestra de HSPC para hacer que el volumen total fuera de 20 ml. Se usó la mezcla resultante como muestra para evaluar la compatibilidad de HSPC con MES.

Ejemplo comparativo 1

Se añadió una disolución de sacarosa al 10% a 1 ml de la muestra de oxaliplatino y a 1 ml de la muestra de HSPC de la misma manera que en el ejemplo 1 para hacer que el volumen total de cada muestra fuera de 20 ml. Se usó cada mezcla como muestra para evaluar la estabilidad de oxaliplatino libre de estabilizadores o HSPC libre de estabilizadores.

Ejemplo comparativo 2

Se preparó un tampón citrato 3 mM con un pH de 6,0 a 6,5. Se añadió este tampón citrato a 1 ml de la muestra de oxaliplatino y a 1 ml de la muestra de HSPC de la misma manera que en el ejemplo 1 para hacer que el volumen

total de cada mezcla fuera de 20 ml. Se usó cada mezcla como muestra para evaluar la compatibilidad de oxaliplatino o HSPC con ácido cítrico.

Ejemplo comparativo 3

Se preparó un tampón ácido tartárico 3 mM con un pH de 6,0 a 6,5. Se añadió este tampón ácido tartárico a 1 ml de la muestra de oxaliplatino y a 1 ml de la muestra de HSPC de la misma manera que en el ejemplo 1 para hacer que el volumen total de cada mezcla fuera de 20 ml. Se usó cada mezcla como muestra para evaluar la compatibilidad de oxaliplatino o HSPC con ácido tartárico.

Ejemplo comparativo 4

Se preparó una disolución acuosa de histidina 3 mM con un pH de 6,0 a 6,5. Se añadió esta disolución acuosa de histidina a 1 ml de la muestra de oxaliplatino y a 1 ml de la muestra de HSPC de la misma manera que en el ejemplo 1 para hacer que el volumen total de cada mezcla fuera de 20 ml. Se usó cada mezcla como muestra para evaluar la compatibilidad de oxaliplatino o HSPC con histidina.

Ejemplo comparativo 5

Se preparó una disolución acuosa de taurina 3 mM con un pH de 6,0 a 6,5. Se añadió esta disolución acuosa de taurina a 1 ml de la muestra de oxaliplatino y a 1 ml de la muestra de HSPC para hacer que el volumen total de cada mezcla fuera de 20 ml. Se usó cada mezcla como muestra para evaluar la compatibilidad de oxaliplatino o HSPC con taurina.

Ejemplo comparativo 6

Se preparó una disolución acuosa de Tris 3 mM con un pH de 6,0 a 6,5. Se añadió esta disolución acuosa de Tris a 1 ml de la muestra de oxaliplatino y a 1 ml de la muestra de HSPC de la misma manera que en el ejemplo 1 para hacer que el volumen total de cada mezcla fuera de 20 ml. Se usó cada mezcla como muestra para evaluar la compatibilidad de oxaliplatino o HSPC con Tris.

Ejemplo comparativo 7

Se preparó una disolución acuosa de HEPES 3 mM con un pH de 6,0 a 6,5. Se añadió esta disolución acuosa de HEPES a 1 ml de la muestra de oxaliplatino y a 1 ml de la muestra de HSPC de la misma manera que en el ejemplo 1 para hacer que el volumen total de cada mezcla fuera de 20 ml. Se usó cada mezcla como muestra para evaluar la compatibilidad de oxaliplatino o HSPC con HEPES.

Ejemplo de prueba 1 Evaluación de la compatibilidad de oxaliplatino y HSPC con diversos aditivos (Prueba de estabilidad)

Se colocaron las muestras obtenidas en ejemplo 1 a ejemplo comparativo 7 en viales, que se sellaron herméticamente. Después, se almacenaron las muestras que contenían oxaliplatino a 60ºC, mientras que las muestras que contenían HSPC se almacenaron a 40ºC. Las concentraciones de oxaliplatino y HSPC en las muestras se determinaron por HPLC, y la compatibilidad se evaluó comparando los valores iniciales y los valores después de 10 días de almacenamiento. La tabla 1 muestra los porcentajes de concentraciones de oxaliplatino y HSPC después de 10 días de almacenamiento en relación con las concentraciones iniciales.

Tabla 1

Evaluación de la compatibilidad de la disolución de oxaliplatino y lisosomas placebo con diversos aditivos

Porcentaje del contenido después de 10 días de almacenamiento en relación con las condiciones iniciales (%)	Ejemplo 1 MES	Ej. comp. 1 Libre de estabilizador	Ej. comp. 2 Ácido cítrico	Ej. comp. 3 Ácido tartárico	Ej. comp. 4 Histidina	Ej. comp. 5 Taurina	Ej. comp. 6 Tris	Ej. comp. 7 HEPES
Muestra que contiene oxaliplatino (condiciones de almacenamiento: 60ºC)	79,4	85,2	1,6	30,6	ND	75,9	58,0	51,0
Muestra que contiene HSPC (condiciones de almacenamiento: 40°C)	83,8	48,5	97,2	79,8	94,4	40,9	96,1	78,1

ND: La sustancia diana no se detectó después del almacenamiento

Los resultados de la tabla 1 revelan lo siguiente. En el ejemplo 1, la adición de MES provoca poca degradación del oxaliplatino (equivalente al ejemplo comparativo 1 libre de tampón), y hubo también poca degradación de HSPC. En cambio, en los ejemplos comparativos 1 y 5, a pesar de que hubo poca degradación de oxaliplatino, el HSPC se degradó en gran medida, y los resultados sugieren la necesidad de añadir un estabilizador. En los ejemplos comparativos 2 a 4, 6, y 7, a pesar de que se estabilizó el HSPC, la degradación de oxaliplatino se aceleró.

Ejemplo de producción1

Se añadieron aproximadamente 60 g de un polvo lipídico mixto (HSPC/Chol/mPEG2000-DSPE = 2/1/0,1, mol/mol) con agitación a 100 ml de etanol absoluto calentado hasta de 60 a 70ºC para obtener una disolución lipídica. Se añadió esta disolución lipídica a 900 ml de una disolución de sacarosa al 10% que contenía 8 mg/ml de oxaliplatino, que también se había calentado de antemano hasta de 60 a 70ºC. Se agitó la mezcla resultante. Se creó entonces un estado de emulsión más homogéneo mediante el uso de una homomezcladora o similar según fuese apropiado. Después, se hizo pasar la emulsión a través de un filtro de policarbonato con un diámetro de poro de 0,2 μm varias veces para obtener una dispersión de liposomas encapsulantes de oxaliplatino con un tamaño de partícula medio de 100 a 200 nm.

Después, se eliminó el oxaliplatino sin encapsular mediante ultrafiltración usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial (PES, 300 kDa, 0,1 m^2) para obtener liposomas encapsulantes de oxaliplatino (a continuación en el presente documento denominados “muestra liposomal n.º 1”).

Ejemplo 2

Se preparó una disolución acuosa con alta concentración de MES y se añadió a la muestra liposomal n.º 1 obtenida en el ejemplo de producción 1 en una cantidad tal que la concentración de MES en la formulación resultante fue de 3 mM. Después, se ajustó la mezcla resultante a un pH de 6,0 a 6,5 con NaOH 0,1 N para obtener una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino a la que se le añadió MES.

Ejemplo comparativo 8

Se usó la muestra liposomal n.º 1 obtenida en el ejemplo de producción 1 sin modificar como una formulación libre de aditivos.

Ejemplo comparativo 9

Se preparó una disolución acuosa con alta concentración de Tris y se añadió a la muestra liposomal n.º 1 en una cantidad tal que la concentración de Tris en la formulación resultante fue de 3 mM. Después, se ajustó la mezcla resultante a un pH de 6,0 a 6,5 usando una disolución de ácido sulfúrico (ácido sulfúrico diluido 1:100) para obtener una formulación a la que se le añadió Tris.

Ejemplo comparativo 10

Se preparó una disolución acuosa con alta concentración de histidina y se añadió a la muestra liposomal n.º 1 en una cantidad tal que la concentración de histidina en la formulación resultante fue de 3 mM. Después, se ajustó la mezcla resultante a un pH de 6,0 a 6,5 usando una disolución de ácido sulfúrico (ácido sulfúrico diluido 1:100) para obtener una formulación a la que se ha añadido histidina.

Ejemplo de prueba 2 Efecto estabilizador de MES sobre formulación de liposoma que contiene oxaliplatino - 1

Se colocaron las muestras obtenidas en el ejemplo 2 y los ejemplos comparativos 8 a 10 en viales, que se sellaron herméticamente. Las muestras se almacenaron entonces a 40ºC. El tamaño de partícula medio de las muestras se determinó mediante dispersión dinámica de luz, y las concentraciones de oxaliplatino y HSPC se determinaron mediante HPLC. El efecto estabilizador se evaluó mediante la comparación de los valores iniciales con los valores después de un mes de almacenamiento. La tabla 2 muestra los resultados.

Tabla 2

Efecto estabilizador de fármaco de diversos aditivos (almacenados a 40ºC)

	Ejemplo 2			Ej. comp. 8			Ej. comp. 9			Ej. comp. 10		
	Valor inicial	Des-pués de un mes	%	Valor inicial	Des-pués de un mes	%	Valor inicial	Des-pués de un mes	%	Valor inicial	Des-pués de un mes	%
Tamaño	147,1	153.3		151,1	162,9		144,6	162,0		152,8	159,1	

de partícula medio (nm)												
Concen-tración de L-OHP (mg/ml)	0,92	0.88	95,7	0,96	0,92	95,8	0,92	0,82	89,1	0,94	9,69	73,4
Concen-tración de HSPC (mg/ml)	28,8	25.0	86,8	30,7	30,1	48,2	30,1	17,6	58,5	31,1	26,4	84,3
pH	6.3	6.1		5,3	6,2		6,2	3,9		6,5	5,4	

Tal como se muestra en la tabla 2, en el ejemplo comparativo 8 ó 9, la concentración de HSPC se redujo a aproximadamente la mitad del valor inicial. Los resultados confirmaron la degradación de fosfolípidos formadores de liposomas. En el ejemplo comparativo 10, mientras que la reducción de la concentración de HSPC se vio suprimida, se observó reducción de la concentración de L-OHP. En cambio, en el ejemplo 2, se mejoró en gran medida la reducción de la concentración de HSPC sin afectar la concentración de L-OHP.

Ejemplo de prueba 3 Efecto estabilizador de MES sobre formulación de liposoma que contiene oxaliplatino - 2

Se colocaron las muestras obtenidas en el ejemplo 2 y el ejemplo comparativo 8 en viales, que se sellaron herméticamente. Las muestras se almacenaron entonces a de 2 a 8ºC. El tamaño de partícula medio de cada muestra se determinó mediante dispersión dinámica de luz, y las concentraciones de oxaliplatino y HSPC se determinaron mediante HPLC. El efecto estabilizador se evaluó comparando los valores iniciales con los valores después de 6 meses de almacenamiento. La tabla 3 muestra los resultados.

Tabla 3

Efecto estabilizador de MES sobre la preparación farmacéutica (5ºC)

	Ejemplo 2			Ej. comp.8		
	Valor inicial	Después de 6 meses	%	Valor inicial	Después de 6 meses	%
Tamaño de partícula promedio (nm)	159,9	151,6	94,8	154,2	152,2	98,7
Concentración de L-OHP (mg/ml)	0,94	,095	101,1	0,95	0,97	10,1
Concentración de HSPC (mg/ml)	31,1	31,0	99,7	31,1	24,9	79,9
pH	6,3	6,1	97,8	5,1	4,4	85,7

Los resultados de la tabla 3 también confirmaron la reducción de la concentración de HSPC y del pH en el ejemplo comparativo 8, mientras que la degradación de HSPC se vio suprimida sin afectar la concentración de L-OHP en la formulación del ejemplo 2.

Ejemplo de prueba 4 Relación entre la estabilización de la formulación mediante MES y propiedades de la formulación de liposomas encapsulantes de oxaliplatino

Se colocaron las muestras obtenidas en el ejemplo 2 y el ejemplo comparativo 8 en viales, que se sellaron herméticamente. Las muestras se almacenaron entonces a 25ºC durante 4 meses. Después del almacenamiento, se administraron las formulaciones del ejemplo 2 y el ejemplo comparativo 8 a ratones macho BALB/c a través de la vena de la cola a una dosis de oxaliplatino de 4,2 mg/kg. Después de 6, 24, y 72 horas, se extrajo sangre para obtener plasma sanguíneo. Se determinó la concentración de Pt en plasma sanguíneo usando un espectrómetro de absorción atómica. La figura 1 muestra los resultados.

En comparación con el ejemplo 2, la formulación del ejemplo comparativo 8 cuya degradación progresó tuvo una corta circulación en sangre, mientras que la formulación del ejemplo 2 mantuvo una circulación en sangre elevada equivalente al nivel inmediatamente posterior al almacenamiento en el ejemplo 2.

Ejemplo 3 (referencia)

Se añadieron aproximadamente 40 g de DSPC, aproximadamente 4,8 g de colesterol, y aproximadamente 7,5 g de mPEG2000-DSPE con agitación a 100 ml de etanol absoluto calentado hasta de 60 a 70ºC para obtener una disolución lipídica (DSPC/Chol/mPEG2000-DSPE = 2/0,5/0,1, mol/mol). Se añadió esta disolución lipídica a 900 ml de una disolución de sacarosa al 10% que contenía 8 mg/ml de oxaliplatino, que también se había calentado de antemano hasta de 60 a 70ºC. Se agitó la mezcla resultante. Se creó entonces un estado de emulsión más homogéneo mediante el uso de una homomezcladora o similar según fuese apropiado. Después, se hizo pasar la emulsión a través de un filtro de policarbonato con un diámetro de poro de 0,2 μm varias veces para obtener una dispersión de liposomas encapsulantes de oxaliplatino con un tamaño de partícula medio de 100 a 200 nm.

Después, se eliminó el oxaliplatino sin encapsular mediante ultrafiltración usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial (PES, 300 kDa, 0,1 m^2) para obtener liposomas encapsulantes de oxaliplatino.

Se preparó una disolución acuosa con alta concentración de MES y se añadió a los liposomas obtenidos anteriormente en una cantidad tal que la concentración de MES en la formulación resultante fue de 1 mM. Después, se ajustó la mezcla resultante a un pH de 6,0 a 6,5 con NaOH 0,1 N para obtener una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino a los que se le ha añadido MES.

Ejemplo 4 (referencia)

Se añadieron aproximadamente 37 g de DPPC, aproximadamente 10 g de colesterol, y aproximadamente 15 g de mPEG2000-DSPE con agitación a 100 ml de etanol absoluto calentado hasta de 60 a 70ºC para obtener una disolución lipídica (DPPC/Chol/mPEG2000-DSPE = 2/1/0.2, mol/mol). Se añadió esta disolución lipídica a 900 ml de una disolución de sacarosa al 10% que contenía 8 mg/ml de oxaliplatino, que también se había calentado de antemano hasta de 60 a 70ºC. Se agitó la mezcla resultante. Se creó entonces un estado de emulsión más homogéneo mediante el uso de una homomezcladora o similar según fuese apropiado. Después, se hizo pasar la emulsión a través de un filtro de policarbonato con un diámetro de poro de 0,2 μm varias veces para obtener una dispersión de liposomas encapsulantes de oxaliplatino con un tamaño de partícula medio de 100 a 200 nm.

Después, se eliminó el oxaliplatino sin encapsular mediante ultrafiltración usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial (PES, 300kDa, 0,1 m^2) para obtener liposomas encapsulantes de oxaliplatino.

Se preparó una disolución acuosa con alta concentración de MES y se añadió a los liposomas obtenidos anteriormente en una cantidad tal que la concentración de MES en la formulación resultante fue de 5 mM. Después, se ajustó la mezcla resultante a un pH de 6,0 a 6,5 con NaOH 0,1 N para obtener una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino a la que se le añadió MES.

Ejemplo 5 (referencia)

Se añadieron aproximadamente 39 g de HEPC, aproximadamente 15 g de colesterol, y aproximadamente 0.4 g de mPEG2000-DSPE con agitación a 100 ml de etanol absoluto calentado hasta de 60 a 70ºC para obtener una disolución lipídica (HEPC/Chol/mPEG2000-DSPE = 2/1,5/0,05, mol/mol). Se añadió esta disolución lipídica a 900 ml de una disolución de sacarosa al 10% que contenía 8 mg/ml de oxaliplatino, que también se había calentado de antemano hasta de 60 a 70ºC. Se agitó la mezcla resultante. Se creó entonces un estado de emulsión más homogéneo mediante el uso de una homomezcladora o similar según fuese apropiado. Después, se hizo pasar la emulsión a través de un filtro de policarbonato con un diámetro de poro de 0,2 μm varias veces para obtener una dispersión de liposomas encapsulantes de oxaliplatino con un tamaño de partícula medio de 100 a 200 nm.

Después, se eliminó el oxaliplatino sin encapsular mediante ultrafiltración usando una membrana de ultrafiltración de flujo tangencial (PES, 300 kDa, 0,1 m^2) para obtener liposomas encapsulantes de oxaliplatino.

Se preparó una disolución acuosa con alta concentración de MES y se añadió a los liposomas obtenidos anteriormente en una cantidad tal que la concentración de MES en la formulación resultante fue de 0,1 mM. Después, la mezcla resultante se ajustó a un pH de 6,0 a 6,5 con NaOH 0,1 N para obtener una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino a la que se le añadió MES.

REIVINDICACIONES

1. Dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino que comprende una fase acuosa externa que contiene ácido 2-morfolinoetanosulfónico, en la que los liposomas comprenden, como componente liposomal, fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas purificadas.

2. Dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según la reivindicación 1, en la que la dispersión comprende una fase acuosa interna que no contiene sustancialmente ácido 2-morfolinoetanosulfónico.

3. Dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según la reivindicación 1 ó 2, en la que la dispersión tiene un pH de 6,0 a 7,0.

4. Dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que los liposomas comprenden al menos un fosfolípido saturado como componente liposomal.

5. Dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la cantidad de ácido 2-morfolinoetanosulfónico es de 0,00001 a 10 partes en masa por parte en masa de fosfolípido formador de liposomas.

6. Uso de ácido 2-morfolinoetanosulfónico o sal del mismo como estabilizador para una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino, en el que los liposomas comprenden, como componente liposomal, fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas purificadas.

7. Uso según la reivindicación 6, en el que la dispersión tiene un pH de 6,0 a 7,0

8. Método para estabilizar una dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino, que comprende añadir ácido 2-morfolinoetanosulfónico o una sal del mismo a la dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino, en el que los liposomas comprenden, como componente liposomal, fosfatidilcolinas de soja hidrogenadas purificadas.

9. Método según la reivindicación 8, en el que la dispersión tiene un pH de 6,0 a 7,0.

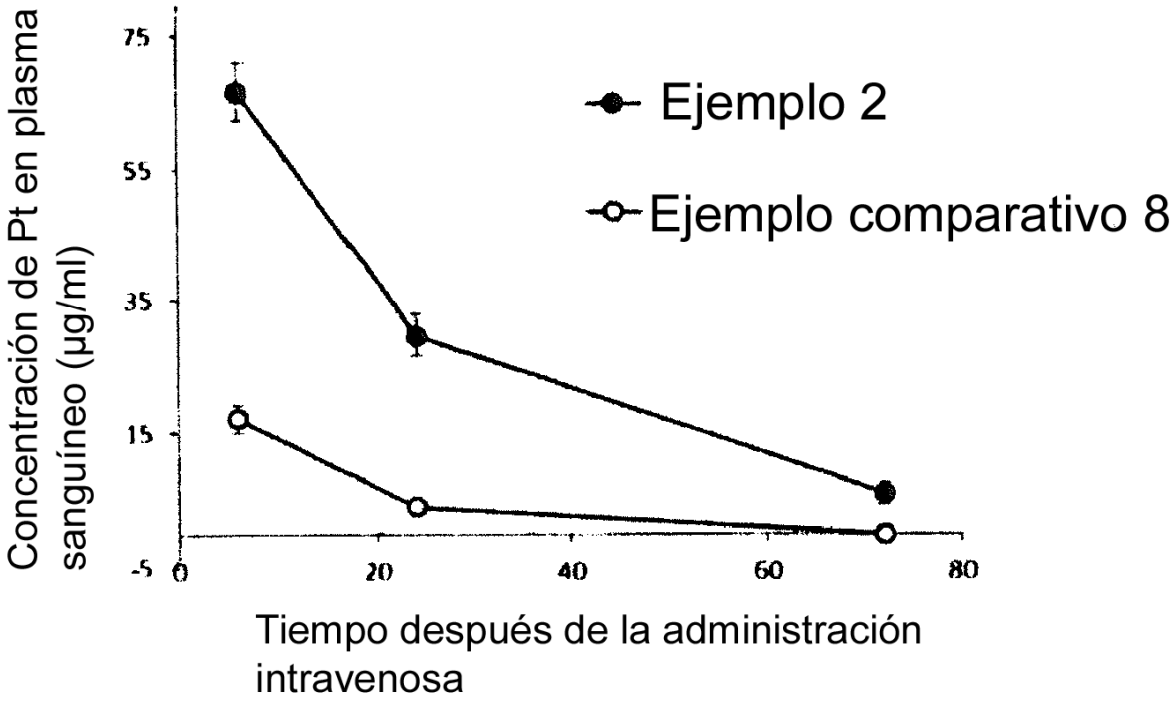
10. Composición farmacéutica que comprende la dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

11. Dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en un método de tratamiento para el cáncer.

12. Dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso como potenciador de efecto antitumoral para su uso en un método de potenciamiento de la actividad antitumoral de un agente antitumoral.

13. Dispersión acuosa de liposomas encapsulantes de oxaliplatino para su uso según la reivindicación 12, comprendiendo además el uso que administrar un agente antitumoral a un mamífero.

Fig. 1


Concentración de Pt en plasma sanguíneo (µg/ml)
75
55
35
15
-5
0
20
40
60
80
Ejemplo 2
Ejemplo comparativo 8
Tiempo después de la administración intravenosa