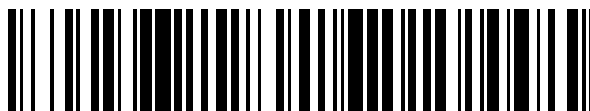


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 299**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2013 PCT/US2013/026453**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13123407**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2013 E 13748684 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 2814464**

54 Título: **Formulaciones de nanopartículas termosensibles y método de preparación de las mismas**

30 Prioridad:

17.02.2012 US 201261600418 P

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

10.07.2020

73 Titular/es:

**CELSION CORPORATION (100.0%)
997 Lenox Drive Suite 100
Lawrenceville, NJ 08648, US**

72 Inventor/es:

**REED, ROBERT, A. y
SU, DAISHUI**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 773 299 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

Formulaciones de nanopartículas termosensibles y método de preparación de las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una formulación de liposomas termosensibles, y más específicamente a una formulación de liposomas que comprende fosfolípidos y un tensioactivo, en la que los liposomas soportan almacenamiento a largo plazo a temperaturas de menos de o igual a aproximadamente 8°C, controlan la formación de degradados para maximizar la potencia del producto y liberan su contenido a temperaturas hipertérmicas suaves. También se describen métodos de preparación de formulaciones.

Antecedentes de la invención

15 Los liposomas se componen de al menos una membrana de bicapa lipídica que encierra un compartimento interno acuoso. Los liposomas pueden caracterizarse por el tipo de membrana y por el tamaño. Las vesículas unilaminares pequeñas (VUP) tienen una única membrana y normalmente oscilan entre 0,02 y 0,25 µm de diámetro; las vesículas unilaminares grandes (VUG) son normalmente mayores de 0,25 µm. Las vesículas grandes oligolaminares y las vesículas grandes multilaminares tienen múltiples, habitualmente concéntricas, capas de membranas y son normalmente mayores de 0,25 µm. Los liposomas con varias membranas no concéntricas, es decir, varias vesículas pequeñas contenidas dentro de una vesícula más grandes, se denominan vesículas multivesiculares.

Los liposomas pueden formularse para portar agentes terapéuticos, fármacos u otros principios activos o bien contenidos dentro del espacio interior acuoso (principios activos solubles en agua) o bien repartidos en la bicapa lipídica (principios activos insolubles en agua). Los liposomas también pueden conjugarse con un anticuerpo o una molécula de direccionamiento que permite la administración de un principio activo a un sitio diana específico. La encapsulación de un fármaco en un liposoma (1) reduce la toxicidad del fármaco, (2) evita las defensas del cuerpo que normalmente reconocen partículas extrañas y las seleccionan como diana para la retirada por el sistema reticuloendotelial (SRE) del hígado y el bazo, y (3) permite dirigir el portador del fármaco al sitio terapéutico de acción, y una vez allí, liberar el fármaco rápidamente de manera que pueda actuar sobre el tejido diana. Además, el aclaramiento del liposoma de la sangre por las células del sistema reticuloendotelial (SRE) puede inhibirse incorporando lípidos de polietilenglicol en la membrana del liposoma; estos lípidos inhiben la adsorción de proteínas que marca el liposoma para la captación del SRE.

Los liposomas pueden diseñarse para no ser permeables, pero se volverán así si se produce un poro en la membrana del liposoma, o si la membrana se vuelve fluida (por ejemplo, sufre una transición de fases desde fase sólida o gel hasta fase líquida), o si la membrana se degrada o disuelve. Una ruptura de este tipo en la permeabilidad puede inducirse por la aplicación de campos eléctricos (electroporación), o exposición del liposoma a enzimas o tensioactivos. Otro método implica elevar la temperatura de la membrana hasta temperaturas en la proximidad de su temperatura de transición de fases de gel a líquido, en la que parece que los defectos porosos en las regiones de límite de fases en la membrana parcialmente líquida y parcialmente sólida tienen en cuenta el transporte aumentado de agua, iones y pequeñas moléculas a través de la membrana. La elevación clínica de temperatura en el cuerpo se denomina hipertermia. Este procedimiento se ha usado para elevar la temperatura en un sitio diana en un sujeto y si pueden administrarse liposomas sensibles a la temperatura al sitio diana entonces este aumento en la temperatura puede desencadenar la liberación del contenido del liposoma, dando lugar a la administración selectiva y liberación de agentes terapéuticos en el sitio diana, tal como se describió inicialmente por Yatvin *et al.*, Science 204:188 (1979). Esta técnica se limita, sin embargo, a condiciones en las que la temperatura de transición de fases del liposoma es mayor (mayor de 37°C) que la temperatura normal del tejido.

La hipertermia provoca múltiples cambios biológicos. Para una revisión consulte Issels RD. Hyperthermia adds to Chemotherapy, European J of Cancer (2008) 44:2546-2554. Las temperaturas en el intervalo de hipertermia suave (39-44°C) median los cambios fisiológicos localizados tales como el aumento en el flujo sanguíneo, la permeabilidad de la vasculatura y la oxigenación de tejidos. La vasculatura que soporta tumores sólidos es de estructura caótica y las células endoteliales que recubren la microvasculatura no se sellan juntas, dando como resultado normalmente una calidad porosa. La hipertermia provoca un aumento en el tamaño de poro en la microvasculatura tumoral anómala y, por tanto, potencia la extravasación de moléculas a nanoescala, tales como liposomas de aproximadamente 100 nm de diámetro, en el intersticio tumoral (Bates DA, Mackillop WJ. Hyperthermia, adriamycin transport, and cytotoxicity in drug-sensitive and -resistant Chinese hamster ovary cells, Cancer Res (1986) 46:5477-5481; Nagaoka S, Kawasaki S, Sasaki K, Nakanishi T. Intracellular uptake, retention and cytotoxic effect of adriamycin combined with hyperthermia *in vitro*. Jpn J Cancer Res (1986) 77:205-211). Por estos motivos la hipertermia suave es letal de manera selectiva para células tumorales, aumentando el efecto antitumoral a medida que aumenta la temperatura.

Los liposomas sensibles al calor portan una alta concentración de agente quimioterápico a tumores sólidos y la vasculatura de soporte y liberan el fármaco de manera local cuando se calientan. La hipertermia aumenta de manera selectiva la captación liposomal, la permeabilidad liposomal, estimula la liberación de fármaco localizada, aumenta la

entrada de fármaco en células tumorales y aumenta la unión del fármaco al ADN de la célula tumoral (siendo la última esencial para el mecanismo de acción de varios agentes quimioterápicos).

5 Para empezar a usar la hipertermia para el tratamiento de tumores profundamente asentados (por ejemplo, tumores de próstata, ováricos, colorrectales y de mama), es por consiguiente deseable idear formulaciones de liposomas que pueden administrar cantidades terapéuticas de principios activos en respuesta a condiciones hipertérmicas suaves, es decir, para temperaturas que pueden alcanzarse de manera clínica en el intervalo de 39-45°C.

10 La patente estadounidense n.º 6.726.925 describe liposomas que son sensibles a alteraciones en la temperatura del entorno que los rodea. Los liposomas se cargan con, entre otros, doxorubicina, un fármaco de oncología aprobado y usado de manera frecuente para el tratamiento de una amplia gama de cánceres. La formulación liposomal que contiene doxorubicina se administra por vía intravenosa y en combinación con hipertermia puede proporcionar control tumoral local y mejorar la calidad de vida. La hipertermia suave localizada (39,5-45°C) libera la doxorubicina atrapada del liposoma. Esta tecnología de administración permite que se depositen de manera preferente altas concentraciones de doxorubicina en un tumor seleccionado como diana. La patente estadounidense n.º 7.901.709 describe un método para encapsulación liposomal activada por calor de doxorubicina.

15 La solicitud internacional publicada n.º WO 2007/024826 describe un método de almacenamiento de una formulación de liposomas o nanopartículas incluyendo congelación de dicha formulación. La formulación describe un método de almacenamiento de liposomas que tiene características de almacenamiento y estabilidad mejoradas.

20 Los principios de diseño clave que se requieren para que una formulación de fármaco liposomal activada de manera hipertérmica sea eficaz son: 1) encapsulación casi completa del principio activo para permitir que el fármaco se asocie con el liposoma en la circulación general, 2) una membrana que se modifica por ingeniería para conservar el fármaco a las temperaturas corporales normales (37°C) y liberar el fármaco a temperaturas de hipertermia suave (es decir 41-43°C), 3) una composición de membrana y un tamaño de partícula que permita al liposoma permanecer en la circulación general lo suficiente para permitir la aplicación de una modalidad de calentamiento para desencadenar la liberación del fármaco a su diana, y 4) un tamaño de liposoma que permita su extravasación desde el torrente circulatorio a través de la microvasculatura tumoral permeable que permita dirigir los fármacos quimioterápicos a un sitio tumoral.

25 Un problema de diseño importante adicional descubierto por los inventores con formulaciones liposomales de doxorubicina (por ejemplo, dado a conocer en la patente estadounidense n.º 7.901.709) es el efecto de estabilización de la formación del complejo de doxorubicina (cocrystal o sal) sobre la estabilidad del medicamento terminado. El control exitoso de las tasas de degradación dará como resultado un impacto significativo sobre la temperatura de almacenamiento y la estabilidad a largo plazo del medicamento. Dos productos de degradación de interés son 8-desacetil-8-carboxildaunorubicina e impureza A.

30 La presente invención resuelve un problema persistente con la degradación de fármacos en una formulación liposomal de doxorubicina que da como resultado un complejo de citrato (cocrystal o sal). Se ha encontrado que el complejo de citrato desempeña un papel significativo en la inestabilidad de la doxorubicina y la formación de degradados. Más específicamente, la formación de 8-desacetil-8-carboxildaunorubicina e impureza A puede reducirse significativamente cambiando la formación de un complejo de citrato a un complejo de sulfato (cocrystal o sal). Además, la presente invención mantiene los principios de diseño claves enumerados anteriormente para una formulación liposomal activada de manera hipertérmica eficaz que contiene un principio activo.

Breve resumen de la invención

35 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende una suspensión de liposomas que tiene una bicapa lipídica en fase gel y doxorubicina atrapada dentro de los liposomas; comprendiendo dicha bicapa lipídica:

55 (i) uno o más fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfatidilcolinas, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolaminas;

(ii) uno o más fosfolípidos derivatizados con un polímero hidrófilo; y

60 (iii) uno o más lisolípidos seleccionados del grupo que consiste en monoacilfosfatidilcolinas, monoacilfosfatidilglicerol, monoacilfosfatidilinositol y monoacilfosfatidiletanolaminas;

en la que los constituyentes de la bicapa lipídica se proporcionan en una razón molar (i):(ii):(iii) de aproximadamente 80-90:2-8:2-18; en la que los liposomas en la suspensión tienen un tamaño de partícula promedio de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 150 nm; y

65 en la que la concentración relativa de impureza A después de 6 meses de almacenamiento a aproximadamente menos de o igual a 8°C es de menos del 0,5%, y en la que la impureza A es un pico con un tiempo de retención

relativo de aproximadamente 1,4 cuando se logra la separación usando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con una columna de fase inversa C18 y tampón de elución de gradiente de disolvente ácido acético/metanol.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un método para cargar la doxorubicina en liposomas sensibles a la temperatura, que comprende:

(a) preparar una suspensión de liposomas que tiene una bicapa lipídica en fase gel y una concentración mayor de iones amonio dentro de los liposomas que fuera de los liposomas, comprendiendo dicha bicapa lipídica:

10 (i) uno o más fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfatidilcolinas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilinositoles y fosfatidiletanolaminas;

(ii) uno o más fosfolípidos derivatizados con un polímero hidrófilo; y

15 (iii) uno o más lisolípidos seleccionados del grupo que consiste en monoacilfosfatidilcolinas, monoacilfosfatidilgliceroles, monoacilfosfatidilinositoles y monoacilfosfatidiletanolaminas;

en la que los constituyentes de la bicapa lipídica se proporcionan en una razón molar (i):(ii):(iii) de aproximadamente 80-90:2-8:2-18; y

20 en la que dicha preparación incluye reducir el tamaño de los liposomas en la suspensión hasta un tamaño de partícula promedio de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 150 nm;

(b) añadir una disolución de doxorubicina a la suspensión de liposomas, en la que la doxorubicina se absorbe en los liposomas.

En otro aspecto, la invención comprende una preparación liposomal preparada por el método expuesto anteriormente.

30 En otro aspecto, la invención comprende una preparación liposomal que comprende doxorubicina y un agente de obtención de imágenes. En aún otro aspecto, la invención comprende una preparación liposomal que comprende doxorubicina y otro fármaco.

Estos y otros aspectos y ventajas de la invención se exponen en detalle a continuación en el presente documento.

35 Breve descripción de los dibujos/figuras

La figura 1 representa de manera esquemática un liposoma que tiene una membrana bicapa que contiene dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) como fosfolípido, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[poli(etilenglicol) 40 2000 (DSPE-MPEG) y monoesteroilfosfatidilcolina (MSPC) como lisolípidos. Se indica la orientación de los monómeros de lisolípidos y su presencia tanto en las capas internas como externas de la bicapa lipídica.

La figura 2 es una representación esquemática del proceso de fabricación de liposomas de doxorubicina cargados con amonio.

La figura 3 es una distribución de tamaño de partícula de liposomas de doxorubicina cargados con NH_4^+ formados mediante el proceso de extrusión.

La figura 4 representa un gráfico de calorimetría diferencial de barrido (tasa de barrido de 2°C por minuto) de liposomas cargados usando un gradiente de pH preparados usando métodos conocidos en la técnica.

La figura 5 representa un gráfico de calorimetría diferencial de barrido (tasa de barrido de 2°C por minuto) de liposomas cargados con NH_4^+ de la presente invención.

55 La figura 6 representa una micrografía electrónica de efecto túnel de liposomas cargados usando un gradiente de pH preparados según métodos conocidos en la técnica.

La figura 7 representa una micrografía electrónica de efecto túnel de liposomas cargados con NH_4^+ preparados según la presente invención.

60 La figura 8 muestra una comparación de perfiles de liberación de doxorubicina en función de la temperatura de disolución para los liposomas cargados usando un gradiente de pH y cargados con NH_4^+ .

65 Las figuras 9a y 9b muestra una comparación de los niveles de 8-desacetil-8-carboxildaunorubicina e impureza A respectivamente en los liposomas de doxorubicina cargados usando un gradiente de pH o cargados con NH_4^+ . Las barras "A" y "B" denotan niveles de impureza para una formulación preparada usando excipientes procedentes de

diferentes proveedores. Las figuras 9a y 9b también muestran los niveles de impurezas de 8-desacetil-8-carboxildaunorrubicina e impureza A para tres series replicadas de liposomas de doxorubicina cargados con NH_4^+ preparados según la presente invención.

5 La figura 10 muestra los niveles de doxorubicina en liposomas de doxorubicina cargados usando un gradiente de pH y cargados con NH_4^+ tras el almacenamiento durante periodos prolongados de tiempo a 2-8°C.

La figura 11 muestra los niveles de crecimiento de degradados en liposomas de doxorubicina cargados usando un gradiente de pH y cargados con NH_4^+ tras el almacenamiento durante periodos prolongados de tiempo a 2-8°C.

10 La figura 12 muestra los niveles de doxorubicina en liposomas de doxorubicina cargados usando un gradiente de pH y cargados con NH_4^+ tras el almacenamiento durante periodos prolongados de tiempo a -20°C.

15 La figura 13 muestra los niveles de crecimiento de degradados en liposomas de doxorubicina cargados usando un gradiente de pH y cargados con NH_4^+ tras el almacenamiento durante periodos prolongados de tiempo a -20°C.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se describirá ahora en referencia a realizaciones expuestas en el presente documento y en las figuras. Estas realizaciones son simplemente a efectos de ilustración y no deben interpretarse como limitativas de la invención tal como se define por las reivindicaciones.

25 En un aspecto, la invención proporciona una preparación liposomal, que comprende una suspensión de liposomas que tiene una bicapa lipídica en fase gel y un principio activo atrapado dentro de los liposomas; comprendiendo dicha bicapa lipídica:

(i) uno o más fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfatidilcolinas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilinositoles y fosfatidiletanolaminas;

30 (ii) uno o más fosfolípidos derivatizados con un polímero hidrófilo; y

(iii) uno o más lisolípidos seleccionados del grupo que consiste en monoacilfosfatidilcolinas, monoacilfosfatidilgliceroles, monoacilfosfatidilinositoles y monoacilfosfatidiletanolaminas;

35 en la que el principio activo se selecciona del grupo que consiste en doxorubicina, bleomicina, dacarbazina, daunorrubicina, dactinomicina, fludarabina, gemcitabina, idarrubicina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, vinblastina, vinorelbina y vincristina, y

40 en la que los constituyentes de la bicapa lipídica se proporcionan en una razón molar de aproximadamente 80-90:2-8:2-18; y en la que el tamaño de los liposomas en la suspensión es de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 150 nm.

45 En una realización, el principio activo es doxorubicina, y la concentración relativa de impureza A después de 6 meses de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos del 0,5%, en el que la impureza A es un pico con un tiempo de retención relativo aproximadamente 1,4 en una cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con una columna de fase inversa C18 con unas condiciones de elución de gradiente de disolvente ácido acético/metanol.

50 En una realización, la concentración relativa de impureza A después de 6 meses de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos de aproximadamente el 0,5%, o menos del 0,4%, o menos del 0,3%, o menos del 0,2%. En otra realización, la concentración relativa de impureza A después de aproximadamente 1 año de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos de aproximadamente el 0,5%, o menos del 0,4%, o menos del 0,3%, o menos del 0,2%. En otra realización, la concentración relativa de impureza A después de aproximadamente 2 años de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos de aproximadamente el 1%, el 0,75%, el 0,5%, o menos del 0,4%, o menos del 0,3%, o menos del 0,2%.

60 En una realización, la concentración relativa de 8-desacetil-8-carboxildaunorrubicina después de 6 meses de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos de aproximadamente el 0,5%, menos del 0,4%, menos del 0,3%, o menos del 0,2%. En otra realización, la concentración relativa de 8-desacetil-8-carboxildaunorrubicina después de aproximadamente 1 año de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos de aproximadamente el 0,5%, menos del 0,4%, menos del 0,3%, o menos del 0,2%. En otra realización, la concentración relativa de 8-desacetil-8-carboxildaunorrubicina después de aproximadamente 2 años de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos de aproximadamente el 2,0%, menos del 1,6%, menos del 1,5%, menos del 1,0%, menos del 0,5%, menos del 0,4%, menos del 0,3%, o menos del 0,2%.

65 En una realización adicional, la concentración de doxorubicina después de 150 días de almacenamiento a una

temperatura de aproximadamente menos de o igual a 8°C es mayor del 95%, mayor del 96%, mayor del 97%, mayor del 98%, mayor del 99%, o mayor del 99,5%, de la concentración de doxorubicina inicial, tal como se determina mediante HPLC con una columna de fase inversa C18 con unas condiciones de elución de gradiente de disolvente ácido acético/metanol. En otra realización, la concentración de doxorubicina después de aproximadamente seis meses de almacenamiento a una temperatura de aproximadamente menos de o igual a 8°C es mayor del 95%, mayor del 96%, mayor del 97%, mayor del 98%, mayor del 99%, o mayor del 99,5%, de la concentración de doxorubicina inicial, tal como se determina mediante HPLC con una columna de fase inversa C18 con unas condiciones de elución de gradiente de disolvente ácido acético/metanol. En otra realización, la concentración de doxorubicina después de aproximadamente un año de almacenamiento a una temperatura de aproximadamente menos de o igual a 8°C es mayor del 95%, mayor del 96%, mayor del 97%, mayor del 98%, mayor del 99%, o mayor del 99,5%, de la concentración de doxorubicina inicial, tal como se determina mediante HPLC con una columna de fase inversa C18 con unas condiciones de elución de gradiente de disolvente ácido acético/metanol. En otra realización, la concentración de doxorubicina después de aproximadamente dos años de almacenamiento a una temperatura de aproximadamente menos de o igual a 8°C es mayor del 95%, mayor del 96%, mayor del 97%, mayor del 98%, mayor del 99%, o mayor del 99,5%, de la concentración de doxorubicina inicial, tal como se determina mediante HPLC con una columna de fase inversa C18 con unas condiciones de elución de gradiente de disolvente ácido acético/metanol.

En otra realización, la invención es una composición farmacéutica, en la que la formación de productos de degradación totales después de 150 días de almacenamiento a una temperatura de aproximadamente menos de o igual a 8°C es de menos del 1%, o menos del 0,5%. En una realización adicional, la invención es una composición farmacéutica, en la que la formación de productos de degradación totales después de aproximadamente seis meses de almacenamiento a una temperatura de aproximadamente menos de o igual a 8°C es de menos del 1%, o menos del 0,5%. En una realización adicional, la invención es una composición farmacéutica, en la que la formación de productos de degradación totales después de aproximadamente de un año de almacenamiento a una temperatura de aproximadamente menos de o igual a 8°C es de menos del 1%, o menos del 0,5%. En una realización adicional, la invención es una composición farmacéutica, en la que la formación de productos de degradación totales después de aproximadamente dos años de almacenamiento a una temperatura de aproximadamente menos de o igual a 8°C es de menos del 2,5%, menos del 1%, o menos del 0,5%.

En aún otra realización, los liposomas se suspenden en un tampón que comprende un sacárido. El sacárido puede ser un monosacárido, tal como lactosa, o un disacárido, tal como sacarosa. En otra realización, el tampón comprende además histidina.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para cargar un principio activo en liposomas sensibles a la temperatura, que comprende:

(a) preparar una suspensión de liposomas que tiene una bicapa lipídica en fase gel y una concentración mayor de iones amonio dentro de los liposomas que fuera de los liposomas, comprendiendo dicha bicapa lipídica:

- (i) uno o más fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfatidilcolinas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilinositoles y fosfatidiletanolaminas;
- (ii) uno o más fosfolípidos derivatizados con un polímero hidrófilo; y
- (iii) uno o más lisolípidos seleccionados del grupo que consiste en monoacilfosfatidilcolinas, monoacilfosfatidilgliceroles, monoacilfosfatidilinositoles y monoacilfosfatidiletanolaminas;

en la que los constituyentes de la bicapa lipídica se proporcionan en una razón molar (i):(ii):(iii) de aproximadamente 80-90:2-8:2-18; y

en la que dicha preparación incluye reducir el tamaño de los liposomas en la suspensión hasta un tamaño de partícula promedio de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 150 nm;

(b) añadir una disolución del principio activo a la suspensión de liposomas, en la que el principio activo se absorbe en los liposomas,

en la que el principio activo se selecciona del grupo que consiste en doxorubicina, bleomicina, dacarbazina, daunorrubicina, dactinomicina, fludarabina, gemcitabina, idarrubicina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, vinblastina, vinorelbina y vincristina.

En una realización, el principio activo es doxorubicina. En otra realización, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, o al menos el 98% de la doxorubicina presente en la disolución se absorbe en los liposomas.

En otra realización, la concentración de doxorubicina absorbida en los liposomas es aproximadamente de 1 mM a

aproximadamente 200 mM, preferiblemente de manera aproximada de 10 a aproximadamente 65 mM, y lo más preferiblemente de manera aproximada de 45 mM a aproximadamente 55 mM. En una realización adicional, la concentración de doxorrubicina absorbida en los liposomas es de aproximadamente 50 mM. En otra realización, la concentración de doxorrubicina absorbida en los liposomas es de aproximadamente 75 mM.

5 Los liposomas de la presente invención se componen de fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfatidilcolinas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilinositoles y fosfatidiletanolaminas. Los fosfolípidos poseen preferiblemente una forma sólida o en gel a la temperatura de transición a líquido en el extremo inferior del intervalo hipertérmico (por ejemplo, el intervalo de desde aproximadamente 38°C hasta aproximadamente 45°C). Se prefieren
10 más los fosfolípidos cuyos grupos acilo están saturados. En una realización, el uno o más fosfolípidos tienen dos grupos acilo C₁₄-C₂₀ iguales o diferentes, tales como, por ejemplo, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), o una combinación de los mismos.

15 Los liposomas de la presente invención se componen de uno o más lisolípidos. En una realización, el lisolípidos es monopalmitoilfosfatidilcolina (MPPC), monolaurilfosfatidilcolina (MLPC), monomiristoilfosfatidilcolina (MMPC), monoestearoilfosfatidilcolina (MSPC), o una mezcla de los mismos.

20 En una realización de la invención, la concentración total de lípidos en la formulación liposomal final es de aproximadamente 10-50 mg/ml, aproximadamente 20-50 mg/ml, aproximadamente 30-40 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, o 40 mg/ml. En otra realización, la concentración de doxorrubicina en la formulación liposomal es de aproximadamente 0,2-40 mg/ml, aproximadamente 0,5-30 mg/ml, aproximadamente 1-20 mg/ml, aproximadamente 2-10 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml o aproximadamente 5 mg/ml. En una realización de la invención, la razón de doxorrubicina con respecto a lípido es de 0,02-10, aproximadamente 0,05, aproximadamente 1, aproximadamente 2,
25 aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10.

30 Los liposomas de la presente invención incluyen lípidos derivatizados con polímeros para disminuir la captación de liposomas por el SRE y, por tanto, aumentar el tiempo de circulación de los liposomas. Los polímeros adecuados incluyen polímeros hidrófilos tales como polietilenglicol, polivinilpirrolidina, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), copolímeros de poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico), poli(alcoholes vinílicos), polivinilpirrolidona, dextranos, oligosacáridos, junto con mezclas de los anteriores. En una realización, el uno o más fosfolípidos derivatizados con un polímero hidrófilo es un lípido derivatizado (pegilado) con polietilenglicol. Preferiblemente, el lípido pegilado es 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[poli(etilenglicol) 2000].
35

En una realización, la invención proporciona un método para cargar un liposoma con un principio activo que es bleomicina, dacarbazina, daunorrubicina, dactinomicina, fludarabina, gemcitabina, idarrubicina, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, vinblastina, vinorelbina o vincristina.

40 En una realización, dicha preparación comprende preparar los liposomas en presencia de una sal de amonio, proporcionada como una disolución de sulfato de amonio. En una realización, la concentración de sulfato de amonio en la disolución es aproximadamente de 100 mM a aproximadamente 300 mM, preferiblemente de manera aproximada 200 mM.

45 En otra realización, la sal de amonio se proporciona como una sal de ácido adípico, ácido L-ascórbico, ácido L-aspártico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido hipúrico, ácido clorhídrico, ácido D,L-láctico, ácido maleico, ácido L-málico, ácido fosfórico, ácido succínico o ácido L-tartárico. En una realización adicional, la sal de amonio en la disolución es aproximadamente de 100 mM a aproximadamente 300 mM, preferiblemente de manera aproximada 200 mM.
50

Los iones amonio fuera de los liposomas se sustituyen por una disolución de monosacáridos o disacáridos. En una realización adicional, la concentración de la disolución de monosacáridos o disacáridos es de aproximadamente el 5-15%, preferiblemente de manera aproximada el 10%. Esta sustitución o intercambio puede llevarse a cabo mediante técnicas tales como diálisis o diafiltración.
55

En una realización adicional, los iones amonio fuera de los liposomas se sustituyen por una disolución de monosacáridos, tal como, por ejemplo, una disolución de lactosa. En otra realización, los iones amonio fuera de los liposomas se sustituyen por una disolución de disacáridos, tal como, por ejemplo, una disolución de sacarosa.

60 En una realización, se añade un tampón de histidina a la preparación liposomal después de la etapa (b). En una realización adicional, la concentración del tampón de histidina es aproximadamente de 5 mM a aproximadamente 15 mM, preferiblemente de manera aproximada 10 mM.

65 Un método de preparación de una formulación liposomal según la presente invención comprende mezclar los componentes bicapa en las proporciones apropiadas en un disolvente orgánico adecuado. Los disolventes útiles incluyen cloroformo, acetona, metanol o cloruro de metileno. Luego se evapora el disolvente para formar una

película lipídica secada. La película se rehidrata (a temperaturas por encima de la temperatura de transición de fases de la mezcla lipídica) usando una disolución acuosa que contiene una cantidad equilibrante del lisolípido y un principio activo deseado, por ejemplo, doxorrubicina. Los liposomas formados después de la rehidratación se extruyen para formar liposomas de un tamaño deseado. Por ejemplo, cuando se producen liposomas que se componen de DPPC:MSPC 80:20, la rehidratación se lleva a cabo a una temperatura por encima de la temperatura de transición de fases de esta mezcla lipídica particular (por encima de 39°C). La disolución acuosa usada para rehidratar la película lipídica comprende una cantidad equilibrante de monómeros de lisolípido (por ejemplo, una concentración igual a la concentración micelar crítica de MSPC, aproximadamente 1 micromolar).

10 Descripción del proceso de fabricación y controles propuestos

El proceso de fabricación para lotes a gran escala de la formulación cargada con amonio se describe a continuación. El proceso puede emplearse para producir lotes de diversos tamaños de formulación, por ejemplo, un lote a escala de 2-2000 l. Un proceso de fabricación propuesto se ilustra de manera esquemática en la figura 2.

- 15 Proceso de fabricación por etapas:
- 20 1. Preparar un tampón de sulfato de amonio disolviendo cantidades apropiadas de sulfato de amonio en agua para inyección (WFI, por sus siglas en inglés) seguido por una filtración de reducción de carga biológica. La molaridad del tampón puede ser, por ejemplo, de 200 mM.
 - 25 2. Hidratar los lípidos utilizando el tampón de sulfato de amonio de la etapa 1 durante una cantidad apropiada de tiempo a una temperatura elevada (45-70°C). Por ejemplo, los lípidos se hidratan durante 1 hora a 60°C.
 - 30 3. Extruir la mezcla lipídica hidratada a través de membranas de filtro que tienen un determinado tamaño de poro a una temperatura elevada, para obtener liposomas de tamaño deseado. Por ejemplo, la mezcla lipídica hidratada se extruye a través de membranas de filtro de policarbonato de 80 nm a 65°C para formar liposomas de ~100 nm.
 - 35 4. Intercambiar el sulfato de amonio no atrapado en liposomas contra una disolución de sacáridos, por ejemplo, una disolución de sacarosa al 10%, seguido por filtración estéril a través de un filtro calentado previamente, tal como un filtro Sartobran P.
 - 40 5. Preparar un tampón de clorhidrato de histidina, por ejemplo, un tampón de histidina 100 mM a pH 6, disolviendo cantidades apropiadas de clorhidrato de histidina en WFI, seguido por filtración estéril.
 6. Preparar una disolución de clorhidrato de doxorrubicina, por ejemplo, a una concentración de 5,0 mg/ml, disolviendo una cantidad apropiada de clorhidrato de doxorrubicina en WFI, seguido por filtración estéril.
 - 40 7. Mezclar 1,0 parte de liposoma estéril con 0,8 partes de disolución estéril de clorhidrato de doxorrubicina, e incubar a 35°C durante 4 horas.
 8. Añadir 0,2 partes de tampón de histidina estéril y mezclar bien.

45 En una realización, la invención es una preparación liposomal preparada mediante un método para cargar doxorrubicina en liposomas sensibles a la temperatura, que comprende:

(a) preparar una suspensión de liposomas que tiene una bicapa lipídica en fase gel y una concentración mayor de iones amonio dentro de los liposomas que fuera de los liposomas, comprendiendo dicha bicapa lipídica:

- 50 (i) uno o más fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfatidilcolinas, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolaminas;
- (ii) uno o más fosfolípidos derivatizados con un polímero hidrófilo; y
- 55 (iii) uno o más lisolípidos seleccionados del grupo que consiste en monoacilfosfatidilcolinas, monoacilfosfatidilglicerol, monoacilfosfatidilinositol y monoacilfosfatidiletanolaminas;
- 60 en la que los constituyentes de la bicapa lipídica se proporcionan en una razón molar (i):(ii):(iii) de aproximadamente 80-90:2-8:2-18; y

en la que dicha preparación incluye reducir el tamaño de los liposomas en la suspensión hasta un tamaño de partícula promedio de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 150 nm;

65 (b) añadir una disolución de doxorrubicina a la suspensión de liposomas, en la que la doxorrubicina se absorbe en los liposomas.

Los liposomas de entre de 0,05 a 0,3 micrómetros de diámetro, se han notificado como adecuados para administración tumoral (patente estadounidense n.º 5.527.528 de Allen *et al.*). El dimensionamiento de los liposomas según la presente invención puede llevarse a cabo según métodos conocidos en la técnica, y teniendo en cuenta el principio activo contenido en los mismos y los efectos deseados (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.225.212 de Martin *et al.*; la patente estadounidense n.º 5.527.528 de Allen *et al.*). En una realización preferida de la presente invención, los liposomas son desde aproximadamente 0,05 micrómetros o aproximadamente 0,1 micrómetros de diámetro, hasta aproximadamente 0,3 micrómetros o aproximadamente 0,4 micrómetros de diámetro. Las preparaciones de liposomas pueden contener liposomas de diferentes tamaños. Ventajosamente, estos liposomas comprenden mezclas lipídicas expuestas en el presente documento y son, por tanto, sensibles a la temperatura, con una capacidad para liberar el fármaco contenido, tal como se describió.

En un aspecto de la presente invención, los liposomas se preparan para tener tamaños sustancialmente homogéneos en un intervalo de tamaños seleccionado. Un método de dimensionamiento eficaz implica la extrusión de una suspensión acuosa de los liposomas a través de una serie de membranas de policarbonato que tienen un tamaño de poro uniforme seleccionado; el tamaño de poro de la membrana corresponderá aproximadamente con los tamaños promedio de los liposomas producidos por extrusión a través de esa membrana. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.737.323.

En otra realización preferida de la presente invención, los liposomas son desde aproximadamente 50 nm, 100 nm, 120 nm, 130 nm, 140 nm o 150 nm, hasta aproximadamente 175 nm, 180 nm, 200 nm, 250 nm, 300 nm, 350 nm, 400 nm o 500 nm de diámetro.

En una realización, la preparación liposomal de la presente invención se almacena a una temperatura de menos de o igual a 8°C, desde aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 8°C, desde aproximadamente -80°C hasta aproximadamente -15°C, desde aproximadamente -30°C hasta aproximadamente -15°C, o desde aproximadamente -15°C hasta aproximadamente 2°C.

En otro aspecto, la preparación liposomal comprende doxorrubicina y un agente de obtención de imágenes o de diagnóstico. La capacidad para encapsular un agente de obtención de imágenes en un liposoma o un agente de obtención de imágenes en combinación con un agente terapéutico es deseable por varios motivos. En primer lugar, la eficacia terapéutica del principio activo se aumentará con la capacidad para visualizar la liberación del agente de obtención de imágenes y, por tanto, deducir la liberación de fármaco. Esto proporcionaría las herramientas para determinar la penetración y concentración de fármaco en los tejidos. Además, la combinación de un fármaco con un agente de obtención de imágenes en un liposoma permitirá la monitorización y cuantificación de la liberación de fármaco a lo largo del tiempo, distribución en los tejidos y el aclaramiento del fármaco. En segundo lugar, un liposoma que porta y libera un agente de obtención de imágenes permitirá tener la oportunidad de examinar previamente a los pacientes. Por ejemplo, una población de pacientes seleccionada puede identificarse como probable para beneficiarse del liposoma terapéutico basándose en la "permeabilidad" de la vasculatura tumoral. Esta permeabilidad, tal como se visualiza usando un agente de obtención de imágenes, es un indicador de la capacidad del principio activo para extravasarse a través de la microvasculatura y cualquier tejido fibrótico para acceder y tratar el tumor. Los ejemplos de los agentes de obtención de imágenes o de diagnóstico que pueden emplearse incluyen, pero no se limitan a, agentes para obtención de imágenes por rayos X, obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM), ecografía u obtención de imágenes de medicina nuclear.

En la obtención de imágenes por rayos X, incluyendo aplicaciones tales como tomografía computerizada (TAC) y angiografía por sustracción digital (ASD), el contraste se basa en las diferencias en la densidad electrónica. En un aspecto de la invención, la preparación liposomal comprende doxorrubicina y un agente de contraste de rayos X. Los agentes de contraste de rayos X se basan generalmente en elementos pesados, e incluyen sales de bario tales como sulfato de bario, que pueden usarse para mejorar la visualización del aparato digestivo y agentes de contraste yodados, que pueden usarse en la visualización del aparato digestivo y en estudios parenterales. Los agentes de contraste de rayos X yodados incluyen, pero no se limitan a, iohexol, iopentol, iopamidol, iodixanol, iopromida, iotrolán, metrizamida, ácido metrizoico, ácido diatrizoico, ácido iotalámico, ácido ioxálglico y sales de estos ácidos.

En otro aspecto de la invención, la preparación liposomal comprende doxorrubicina y un agente de contraste para IRM. Los agentes de contraste para IRM incluyen quelatos paramagnéticos, por ejemplo, basados en manganeso (2+), gadolinio (3+) o hierro (3+). Los quelatos hidrófilos tales como GdDTPA, GdDOTA, GdHPDO3A y GdDTPA-BMA se distribuyen de manera extracelular y se eliminan por vía renal. Tales compuestos son útiles en, por ejemplo, la visualización de lesiones en el sistema nervioso central. Más de otros agentes específicos de órganos o tejidos incluyen MnDPDP, GdBOPA, GdEOB-DTPA, porfirinas paramagnéticas, compuestos, partículas y liposomas macromoleculares.

En aún otro aspecto de la invención, la preparación liposomal comprende doxorrubicina y un agente de obtención de imágenes por ecografía. La obtención de imágenes por ecografía se basa en la penetración de ondas de ultrasonido, por ejemplo, en el intervalo de frecuencias 1-10 MHz, en un sujeto humano o animal a través de un transductor, interactuando las ondas de ultrasonido con superficies de separación de tejidos y líquidos corporales. El contraste en

una imagen de ecografía deriva de la reflexión/absorción diferencial de las ondas de sonido en tales superficies de contacto; los resultados pueden potenciarse mediante el uso de técnicas de Doppler, incluyendo el uso de Doppler en color para evaluar el flujo sanguíneo. Los ejemplos de agentes de contraste de ecografía incluyen Echovist®, basado en microcristales de galactosa que contienen gas; Levovist®, que comprende microcristales de galactosa que contienen gas recubiertos con ácido graso; e Infuson®, que comprende burbujas de gas encapsuladas por albúmina sérica humana parcialmente desnaturalizada.

Otros agentes de obtención de imágenes o de diagnóstico que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agentes fluorescentes tales como 6-carboxifluoresceína, agentes radiactivos (tales como radioisótopos o compuestos que contienen radioisótopos, incluyendo yodo-octanos, halocarburos y Renografin), y similares.

En otro aspecto de la invención, la preparación liposomal comprende además un principio activo adicional, para, por ejemplo, otro fármaco quimioterápico.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de liposomas sensibles a la temperatura cargados con doxorrubicina cargando con NH_4^+

Se preparan liposomas que contienen 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC), que comprende el 86% (% en moles) de la membrana del liposoma; 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-polietilenglicol 2000 (DSPE-mPEG), a aproximadamente el 4% (% en moles); y 1-estearoil-2-hidroxi-sn-glicero-fosfatidilcolina (MSPC) a aproximadamente el 10% (% en moles) mediante la siguiente técnica: en primer lugar, se hidrata la composición lipídica apropiada en tampón de sulfato de amonio 200 mM, formando liposomas multilaminares. Luego se forman pequeños liposomas unilaminares mediante extrusión a través de filtros de 80 nm para formar esferas de aproximadamente 100 nm en tampón de sulfato de amonio 200 mM.

Luego se sometieron los liposomas preparados en la etapa previa a una etapa de diálisis o diafiltración intercambiando el sulfato de amonio que es externo al liposoma con una disolución de sacarosa al 10%, formando un gradiente de concentración de amonio a través de la membrana del liposoma (es decir, 200 mM dentro, menos de 1 mM fuera). Se sabe (Haran G, Cohen R, Bar LK y Barenholz Y, Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases, Biochimica et Biophysica Acta, 1151 (1993) 201-215) que la concentración de amonio puede fomentar, de manera eficaz y casi de manera cuantitativa, la carga de una disolución de doxorrubicina añadida al volumen interno del liposoma a temperaturas elevadas. Se atrapa doxorrubicina dentro del volumen acuoso interno de los liposomas mediante incubación a 35-39°C. Al completarse la carga, se tamponó la disolución liposomal con un tampón de histidina para estabilizar el pH del producto durante el almacenamiento.

Ejemplo 2

Preparación de liposomas de doxorrubicina sensibles a la temperatura cargados usando un gradiente de pH

Se preparan liposomas con doxorrubicina cargados usando un gradiente de pH según el método descrito en el documento WO 2007/024826, los liposomas que contienen 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC), que comprende el 86% (% en moles) de la membrana del liposoma; 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-polietilenglicol 2000 (DSPE-mPEG), a aproximadamente el 4% (% en moles); y 1-estearoil-2-hidroxi-sn-glicero-fosfatidilcolina (MSPC) a aproximadamente el 10% (% en moles) se preparan mediante la siguiente técnica: en primer lugar, se hidrata la composición lipídica apropiada en tampón de citrato 300 mM (pH = 4), formando liposomas multilaminares. Luego se forman pequeños liposomas unilaminares mediante extrusión a través de filtros de 80 nm para formar esferas de aproximadamente 100 nm en tampón de citrato 300 mM.

Luego se añade una disolución de carbonato de sodio 500 mM a los liposomas preparados en la etapa previa, aumentando la disolución externa hasta un pH de ~ 7,5. Se sabe (véase, por ejemplo, Mayer LB, Bally MB, Cullis PR., Uptake of adriamycin into large unilamellar liposomes in response to a pH gradient, Biochimica et Biophysica Acta 857 (1986) 123-126) que el gradiente de pH formado a través de la membrana puede fomentar, de manera eficaz y casi de manera cuantitativa, la carga de una disolución de doxorrubicina añadida al volumen interno del liposoma a temperaturas elevadas. Se atrapa doxorrubicina dentro del volumen acuoso interno de los liposomas mediante incubación a 35-39°C.

Composición/excipientes/funcionalidad de la formulación

La tabla 1 presenta una comparación entre formulaciones según el ejemplo 1, y un liposoma cargado usando un gradiente de pH convencional, según el ejemplo 2. Tal como se observa a partir de la tabla 1, ambas formulaciones contienen 2,0 mg/ml de doxorrubicina. La formulación según la presente invención se asemeja bien a una

formulación de doxorubicina liposomal más convencional. Todos los materiales de partida usados eran de calidad farmacéutica.

Tabla 1. Composición de 2,0 mg/ml de producto liposomal de clorhidrato de doxorubicina

Componentes	Cantidad/ml (mg)		Categoría de los componentes
	Cargado usando un gradiente de pH	Cargado con NH ₄ ⁺	
Razón doxorubicina/lípidos	0,02-10	0,02-10	Principio activo
DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina)	10-50	10-50	Componente liposomal
DSPE-PEG (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-polietilenglicol 2000)			
MSPC (1-estearoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfatidilcolina)			
Lactosa	24,5	0-150	Agente isotónico
Sacarosa	-	0-150	Agente isotónico
Citrato de trisodio	15,1	-	Agente de tamponamiento
Ácido cítrico	14,4	-	Agente de tamponamiento
Carbonato de sodio	13,6	-	Agente de tamponamiento
Sulfato de amonio	-	15-40 ^a	Agente de tamponamiento
Histidina	-	0-2,0	Agente de tamponamiento
Agua	c.s.p. el volumen	c.s.p. el volumen	Disolvente

a. concentración de sulfato de amonio dentro del liposoma (por ejemplo, 150-250 mM)

5

Ejemplo 3

Métodos de caracterización del producto final

- 10 El producto final se caracteriza por el contenido total de doxorubicina, los productos de degradación de doxorubicina, el pH, la osmolalidad, la distribución de tamaño de partícula, el contenido de MSPC, el contenido de DPPC, el contenido de DSPE-mPEG, el % de doxorubicina encapsulada, la liberación de fármaco a 37°C y la liberación de fármaco a 41°C para completar de manera eficaz la evaluación del producto. El contenido total de doxorubicina objetivo es de entre aproximadamente 1,8 y aproximadamente 2,2 mg/ml. La encapsulación de fármaco fue normalmente mayor del 90%, y mostró liberación limitada, por ejemplo < 10%, a la temperatura corporal normal (es decir, 37°C), y presentó liberación mejorada, normalmente > 80%, a 41,0°C. El tamaño de partícula promediado en volumen de los liposomas tal como se midió mediante dispersión dinámica de luz es de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 150 nm.

20 Ejemplo 4

Propiedades fisicoquímicas

Diámetro físico de los liposomas

25

Las propiedades fisicoquímicas de los liposomas formados en el ejemplo 1 anterior son comparables a una preparación liposomal formada usando un tampón convencional. Tal como se muestra en la figura 3, la distribución de tamaño de partícula de un liposoma hidratado con sulfato de amonio es esencialmente idéntica a la de un liposoma hidratado con tampón de citrato.

30

Composición lipídica

Tal como se muestra en la tabla 1 anterior, la composición lipídica de la preparación liposomal de la presente invención es idéntica a la composición lipídica de la preparación liposomal conocida en la técnica. La funcionalidad

de la composición lipídica de membrana también se confirma sometiendo a prueba la liberación de fármaco diferencial tanto a 37°C como a 41,0°C.

Extensión de la encapsulación de doxorubicina

5 La presente invención proporciona un producto liposomal diseñado para utilizar un procedimiento de carga remoto (véase, por ejemplo, Haran G, Cohen R, Bar LK y Barenholz Y., Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1151 (1993) 201-215 201), para encapsular más del 90% de la doxorubicina en el núcleo acuoso interno. El % de doxorubicina encapsulada se calcula midiendo la doxorubicina no encapsulada (dox. libre), separada mediante ultrafiltración, y la doxorubicina total en el producto. Estudios actuales han demostrado que puede lograrse más del 95% de encapsulación para la formulación cargada con amonio.

15 De manera adicional, las propiedades térmicas de la liberación de cada lote, el % de liberación a 37°C y el % de liberación a 41°C, han sido muy reproducibles entre lotes, y son comparables, tal como se muestra en la figura 8.

Métodos de caracterización del producto final

20 Además de la lista de pruebas de caracterización del producto terminado mencionada anteriormente, se han evaluado muchas otras propiedades de la nueva formulación. En primer lugar, debido a la importancia de la membrana del liposoma en los parámetros de diseño claves para el medicamento, se realizó calorimetría diferencial de barrido sobre las formulaciones cargadas usando un gradiente de pH (mostradas en la figura 4) y cargadas con NH_4^+ (mostradas en la figura 5). Cada termograma muestra una exoterma principal, a aproximadamente 41°C, y sugiere que la membrana para la nueva formulación es bastante similar a la de los liposomas cargados usando un gradiente de pH, tal como era de esperar, ya que la disolución de tampón debería tener efectos insignificantes en la estructura general del orden de la membrana.

30 También se comparó el tamaño y morfología general de las dos formulaciones usando la técnica de alta resolución de microscopía electrónica de efecto túnel (TEM, por sus siglas en inglés). De nuevo, se realizó la comparación entre el producto cargado usando un gradiente de pH producido en una planta de fabricación con BPF a la escala de fabricación actual (figura 6), que se usa actualmente en estudios clínicos de fase III, y el producto preparado usando la formulación cargada con NH_4^+ a escala de laboratorio en Celsion (figura 7). Los liposomas para las dos formulaciones muestran diámetros de vesícula similares, de manera predominante membranas unilaminares, y presentan un cristal sencillo clásico dentro de cada liposoma, lo que se atribuye a la formación de complejo doxorubicina-fármaco dentro del liposoma durante la etapa de carga. En general, las TEM muestran que los liposomas generados usando un sistema de carga o bien usando un gradiente de pH o bien con NH_4^+ son bastante similares.

40 Se determinaron los perfiles de temperatura frente a liberación que miden la cantidad de doxorubicina liberada en función de la temperatura desde 35 hasta 45°C incubando cada muestra a la temperatura especificada durante 10 minutos. Los resultados de las pruebas se muestran en la figura 8. Como en las pruebas previas, se realiza la comparación entre un producto cargado usando un gradiente de pH producido en una planta de fabricación con BPF a la escala de fabricación actual, que se usa actualmente en estudios clínicos de fase III, y el producto preparado usando la formulación cargada con NH_4^+ a escala de laboratorio en Celsion (figura 8). Las curvas de liberación son muy similares para las dos formulaciones, mostrando ambas una liberación mínima a temperaturas por debajo de 39°C, y casi el 90% de liberación a 41,0°C y superiores. De manera clara, ambas formulaciones apoyan el objetivo de diseño de limitación de la liberación de doxorubicina a la temperatura corporal normal, es decir 37°C, liberándose la mayoría del fármaco con hipertermia suave, o temperaturas en el intervalo de 41-45°C.

50 Los datos de temperatura frente a liberación también son la mejor medida de la uniformidad microscópica de la composición lipídica de membrana. Para que una formulación libere más del 90% del fármaco a 41,0°C, la mayoría de los liposomas (es decir, las vesículas de 100 nm) deben tener la composición lipídica apropiada para demostrar la liberación térmica desencadenada para el producto a granel. Se sabe que niveles incorrectos de DSPE-MPEG o MSPC afectarán de manera adversa a la extensión y tasa de liberación de doxorubicina desde esos liposomas. Además, el hecho de que las temperaturas transición sean casi idénticas, junto con los barridos de DSC comparativos (figuras 4 y 5), conduce a la conclusión de que el cambio en el sistema de tampones tiene un impacto insignificante sobre la membrana del liposoma y, por tanto, debería tener un impacto insignificante sobre sus propiedades de liberación de fármaco.

60 Ejemplo 5

Comparación de niveles de 8-desacetil-8-carboxildaunorrubicina e impureza A para las formulaciones cargadas usando un gradiente de pH y cargadas con NH_4^+

65 Se realizaron experimentos de laboratorio para examinar los niveles de 8-desacetil-8-carboxildaunorrubicina e impureza A producidos en las formulaciones cargadas usando un gradiente de pH y cargadas con NH_4^+ (figura 9).

Los excipientes procedentes de dos proveedores, excipientes A y B, se examinaron para la formulación cargada usando un gradiente de pH. También se examinaron tres preparaciones independientes de las formulaciones cargadas con NH_4^+ . En todos los casos, y tanto para la 8-desacetil-8-carboxildaunorrubicina como para la impureza A, los niveles formados eran significativamente mayores para las formulaciones cargadas con un gradiente de pH que para las formulaciones cargadas con NH_4^+ . Se observaron niveles reducidos de 8-desacetil-8-carboxildaunorrubicina para las formulaciones cargadas usando un gradiente de pH y cargadas con NH_4^+ con la nueva fuente de excipientes, sin cambio en los niveles de impureza A.

Además, los niveles combinados de 8-desacetil-8-carboxildaunorrubicina e impureza A para las formulaciones cargadas con NH_4^+ fueron de menos del 0,2%, incluso con tiempos de incubación de cuatro horas a 35°C. Los niveles de formación de degradados se muestran como el punto de tiempo inicial en los datos de estabilidad mostrados en las figuras 11, y se correlacionan bien con los valores de doxorubicina mostrados en la figura 10.

Ejemplo 6

Perfil de estabilidad

Se generaron datos de estabilidad comparativos para las formulaciones cargadas usando un gradiente de pH y cargadas con NH_4^+ . Aunque la formulación cargada usando un gradiente de pH requiere almacenamiento a de -15°C a -30°C, se generó la comparación de estabilidad tanto a -20°C como en condiciones de estabilidad aceleradas, es decir, almacenamiento a +5°C. Los resultados del ensayo de doxorubicina después de 739 días mostraron una pérdida del ~4% de doxorubicina para la formulación cargada con amonio. Por lo contrario, la pérdida de doxorubicina después del mismo periodo de tiempo fue del ~60% para la formulación cargada con un gradiente de pH. Los datos del ensayo de pérdida de doxorubicina se resumen en la figura 10 y en la tabla 2. El crecimiento de degradados totales apoya la misma tendencia, es decir, se observó un aumento significativo en los degradados para la formulación cargada usando un gradiente de pH, con niveles muy bajos de crecimiento de degradados para la formulación cargada con NH_4^+ (figura 11 y tabla 2).

Tabla 2. Datos de estabilidad para productos cargados con NH_4^+ con almacenamiento a 2-8°C – ensayo de doxorubicina.

Atributo	Días de almacenamiento a 2-8°C						
	Inicial	21	35	77	175	362	739
Doxorrubicina (mg/ml)	1,99	1,99	1,99	1,98	1,98	1,94	1,91
pH	6,3	6,3	6,3	6,3	6,2	6,1	6,2
Tamaño de partícula (nm)	NT	89	91	88	90	60	95
% de encapsulación	NT	NT	97	97	97	97	98
8-desacetilo (%)	0,09	0,08	0,11	0,17	0,33	0,49	1,56
Impureza A (%)	< 0,05	0,12	0,14	0,18	0,19	0,42	0,66
Degradados totales (%)	0,09	0,20	0,25	0,35	0,52	0,91	2,22
% de liberación a 41,0°C	NT	NT	90	88	87	89	NT

NT = No sometido a prueba

Además de la estabilidad a 2-8°C, la figura 12 y la figura 13 muestran los datos del ensayo de pérdida de doxorubicina a -20°C. Los datos demuestran que la formulación cargada con NH_4^+ presenta niveles muy bajos de crecimiento de degradados y estabilidad de doxorubicina aumentada en comparación con la formulación cargada usando un gradiente de pH.

También se ha observado que la identidad de los productos de degradación formados a partir de las formulaciones cargadas usando un gradiente de pH y cargadas con NH_4^+ es la misma, confirmada mediante CL/EM, aunque la formación se produce a una extensión menor para la formulación cargada con NH_4^+ . Además, la formulación cargada con NH_4^+ presenta una estabilidad de clorhidrato de doxorubicina mejorada, junto con menores niveles de crecimiento de productos de degradación, durante al menos dos años de almacenamiento. El pH de la disolución, el tamaño de partícula del liposoma, el % de encapsulación y el % de liberación de doxorubicina a 41,0°C por la formulación cargada con NH_4^+ permanecen durante al menos dos años de almacenamiento a temperaturas de menos de o igual a 8°C.

Los datos de estabilidad acumulados explicados de manera resumida anteriormente, apoyan la afirmación de que la formulación cargada con NH_4^+ puede proporcionarse comercialmente como un producto refrigerado, almacenado a temperaturas de menos de o igual a 8°C. Se espera que la nueva formación de degradados totales minimizada producirá un producto aceptable para uso comercial con una vida en anaquel de hasta 2 años. Los niveles de

degradación disminuidos también se traducirán en un mantenimiento mejorado de la potencia del producto. En general, los efectos combinados de estas mejoras en el medicamento se considera que potencian la reproducibilidad de la dosificación, logran un mejor cumplimiento del envío y el almacenamiento, y, por tanto, conducen a un producto comercial de mayor calidad.

5

REIVINDICACIONES

1. Preparación liposomal, que comprende una suspensión de liposomas que tiene una bicapa lipídica en fase gel y un complejo de sulfato de doxorubicina atrapado dentro de los liposomas; comprendiendo dicha bicapa lipídica:
- (i) uno o más fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfatidilcolinas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilinositoles y fosfatidiletanolaminas;
- (ii) uno o más fosfolípidos derivatizados con un polímero hidrófilo; y
- (iii) uno o más lisolípidos seleccionados del grupo que consiste en monolaurilfosfatidilcolina (MLPC), monomiristoilfosfatidilcolina (MMPC) y monoestearoilfosfatidilcolina (MSPC);
- en la que los constituyentes de la bicapa lipídica está provistos en una razón molar de 80-90:2-8:2-18; y en la que el tamaño de los liposomas en la suspensión es de entre 50 y 150 nm, y en la que la concentración relativa de impureza A después de 6 meses de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos del 0,5%, y en la que la impureza A es un pico con un tiempo de retención relativo de aproximadamente 1,4 en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con una columna de fase inversa C18 con unas condiciones de elución de gradiente de disolvente ácido acético/metanol.
2. Preparación liposomal según la reivindicación 1, en la que la concentración relativa de impureza A después de 6 meses de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es menos del 0,2%; o en la que la concentración relativa de impureza A después de 1 año de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos del 0,5%; o en la que la concentración relativa de impureza A después de 2 años de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos del 0,75%.
3. Preparación liposomal según la reivindicación 1, en la que la concentración relativa de 8-desacetil-8-carboxildaunorrubicina después de 6 meses de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos del 0,5%; o en la que la concentración relativa de 8-desacetil-8-carboxildaunorrubicina después de 1 año de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos del 0,5%; o en la que la concentración relativa de 8-desacetil-8-carboxildaunorrubicina después de 2 años de almacenamiento a menos de o igual a 8°C es de menos del 1,6%.
4. Preparación liposomal según la reivindicación 1, en la que la concentración de doxorubicina después de aproximadamente seis meses de almacenamiento a una temperatura de menos de o igual a 8°C es mayor del 99% de la concentración de doxorubicina inicial, tal como se determina mediante HPLC usando una columna de exclusión molecular C18 con unas condiciones de elución de gradiente de disolvente ácido acético/metanol; o en la que la concentración de doxorubicina después de un año de almacenamiento a una temperatura de menos de o igual a 8°C es mayor del 97% de la concentración de doxorubicina inicial, tal como se determina mediante HPLC con una columna de fase inversa C18 con unas condiciones de elución de gradiente de disolvente ácido acético/metanol; o en la que la concentración de doxorubicina después de dos años de almacenamiento a una temperatura de menos de o igual a 8°C es mayor del 95% de la concentración de doxorubicina inicial, tal como se determina mediante HPLC con una columna de fase inversa C18 con unas condiciones de elución de gradiente de disolvente ácido acético/metanol.
5. Preparación liposomal según la reivindicación 1, en la que la formación de productos de degradación totales después de seis meses de almacenamiento a una temperatura de menos de o igual a 8°C es de menos del 1%; o en la que la formación de productos de degradación totales después de un año de almacenamiento a una temperatura de menos de o igual a 8°C es de menos del 1%; o en la que la formación de productos de degradación totales después de dos años de almacenamiento a una temperatura de menos de o igual a 8°C es de menos del 2,5%.
6. Preparación liposomal según la reivindicación 1, en la que el uno o más fosfolípidos es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), o una combinación de los mismos; el lisolípido es monolaurilfosfatidilcolina (MLPC), monomiristoilfosfatidilcolina (MMPC), monoestearoilfosfatidilcolina (MSPC), o mezclas de los mismos; y el uno o más fosfolípidos derivatizados con un polímero hidrófilo es un lípido pegilado; o en la que el uno o más fosfolípidos es dipalmitoilfosfatidilcolina, uno o más fosfolípidos derivatizados con un polímero hidrófilo es 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[poli(etilenglicol) 2000] y el uno o más lisolípidos es monoestearoilfosfatidilcolina.
7. Preparación liposomal según la reivindicación 1, en la que los liposomas comprenden además un agente de obtención de imágenes o un agente de diagnóstico.
8. Preparación liposomal según la reivindicación 7, en la que el agente de obtención de imágenes o agente de

diagnóstico se atrapa en el liposoma.

- 5 9. Preparación liposomal según la reivindicación 8, en la que el agente de obtención de imágenes o agente de diagnóstico es un agente de contraste de rayos X, un agente de contraste para IRM, un agente de obtención de imágenes por ecografía, un agente fluorescente o un agente radiactivo.
10. Método para cargar doxorubicina en liposomas sensibles a la temperatura, que comprende:
- 10 (a) preparar una suspensión de liposomas que tiene una bicapa lipídica en fase gel y una concentración mayor de iones amonio dentro de los liposomas que fuera de los liposomas, comprendiendo dicha bicapa lipídica:
- 15 (i) uno o más fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfatidilcolinas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilinositoles y fosfatidiletanolaminas;
- (ii) uno o más fosfolípidos derivatizados con un polímero hidrófilo; y
- (iii) uno o más lisolípidos seleccionados del grupo que consiste en monolaurilfosfatidilcolina (MLPC), monomiristoilfosfatidilcolina (MMPC) y monoestearoilfosfatidilcolina (MSPC);
- 20 en el que los constituyentes de la bicapa lipídica se proporcionan en una razón molar de 80-90:2-8:2-18; y en la que dicha preparación incluye la reducción del tamaño de los liposomas en la suspensión hasta un tamaño de partícula promedio de entre 50 y 150 nm;
- 25 (b) añadir una disolución de doxorubicina a la suspensión de liposomas, en el que la doxorubicina se absorbe en los liposomas en forma de un complejo de sulfato de doxorubicina.
- 30 11. Método según la reivindicación 10, en el que al menos el 95% de la doxorubicina presente en la disolución se absorbe en los liposomas.
12. Método según la reivindicación 10, en el que la concentración de doxorubicina absorbida en los liposomas es 50 mM; o en el que la concentración de doxorubicina absorbida en los liposomas es de 75 mM.
- 35 13. Método según la reivindicación 10, en el que el uno o más fosfolípidos es dipalmitoilfosfatidilcolina, uno o más fosfolípidos derivatizados con un polímero hidrófilo es 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[poli(etilenglicol) 2000] y el uno o más lisolípidos es monoestearoilfosfatidilcolina.
- 40 14. Método según la reivindicación 10, en el que la preparación comprende preparar los liposomas en presencia de una disolución de sulfato de amonio.
15. Método según la reivindicación 14, en el que la concentración de sulfato de amonio es de 100 mM a 300 mM.
- 45 16. Método según la reivindicación 10, que comprende además sustituir los iones amonio fuera de los liposomas con una disolución de monosacáridos o disacáridos.
17. Método según la reivindicación 16, en el que la concentración de la disolución de monosacáridos o disacáridos es del 5-15%.
- 50 18. Método según la reivindicación 17, en el que los iones amonio fuera de los liposomas se sustituyen por una disolución de monosacáridos.
19. Método según la reivindicación 18, en el que la disolución de monosacáridos es una disolución de lactosa.
- 55 20. Método según la reivindicación 10, que comprende además añadir un tampón de histidina después de la etapa (b).
21. Método según la reivindicación 20, en el que la concentración del tampón de histidina es de 5 mM a 15 mM.
- 60 22. Método según la reivindicación 10, en el que el uno o más fosfolípidos tiene dos grupos acilo C₁₄-C₂₀ iguales o diferentes.
23. Método según la reivindicación 22, en el que el uno o más fosfolípidos es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), o una combinación de los mismos.
- 65 24. Método según la reivindicación 10, en el que el uno o más fosfolípidos derivatizados con un polímero

hidrófilo es un lípido pegilado.

- 5
25. Método según la reivindicación 24, en el que dicho lípido pegilado es 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[poli(etilenglicol)2000].
 26. Preparación de liposomas preparada mediante el método según la reivindicación 10.

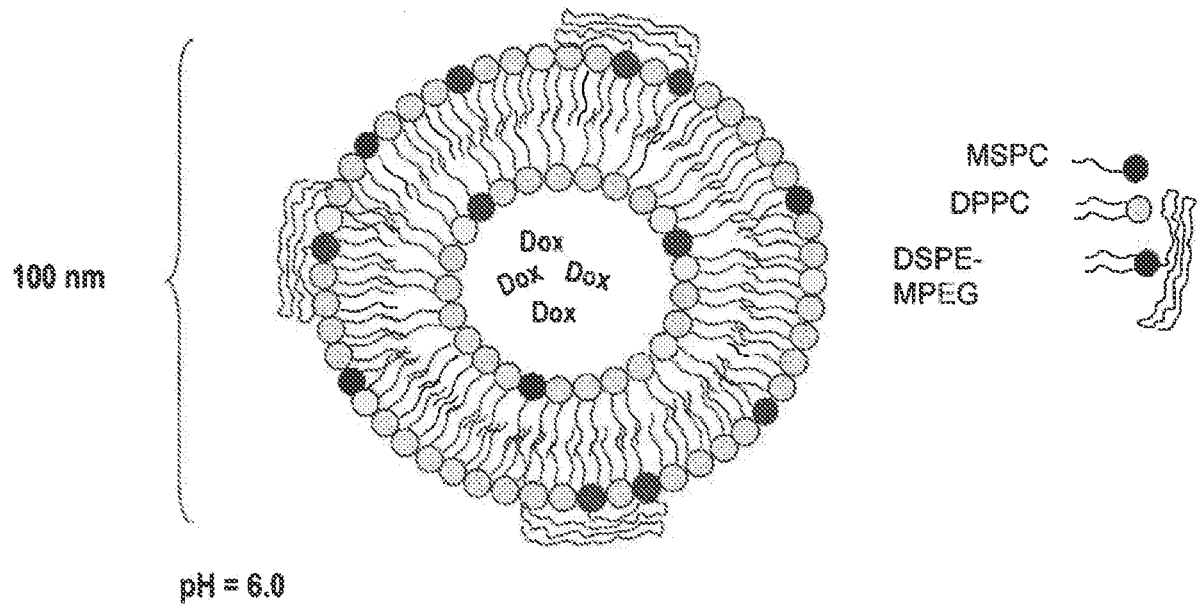


FIG. 1

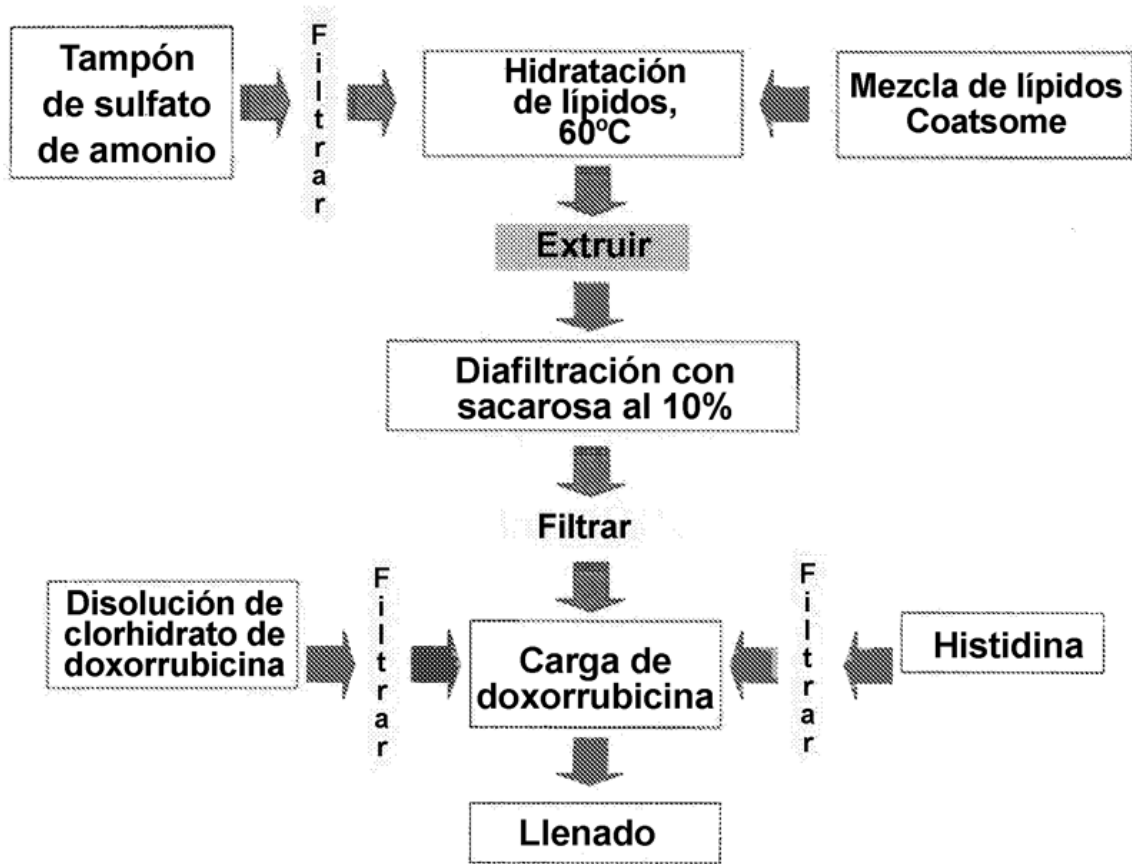
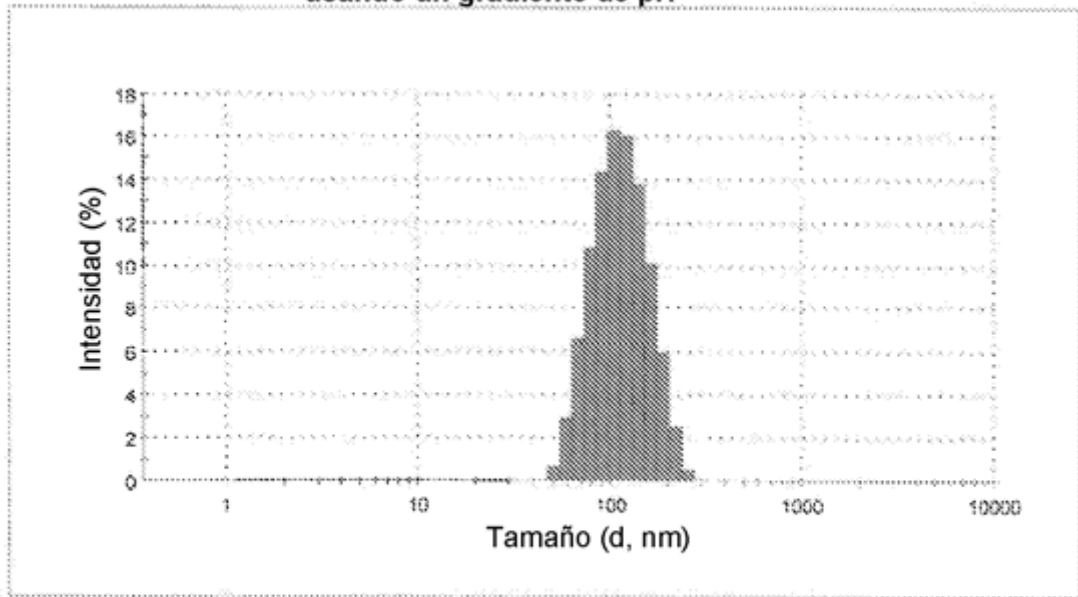


FIG. 2

Distribución de tamaños de partícula para una formulación cargada usando un gradiente de pH



Distribución de tamaños de partícula de una formulación cargada con amonio

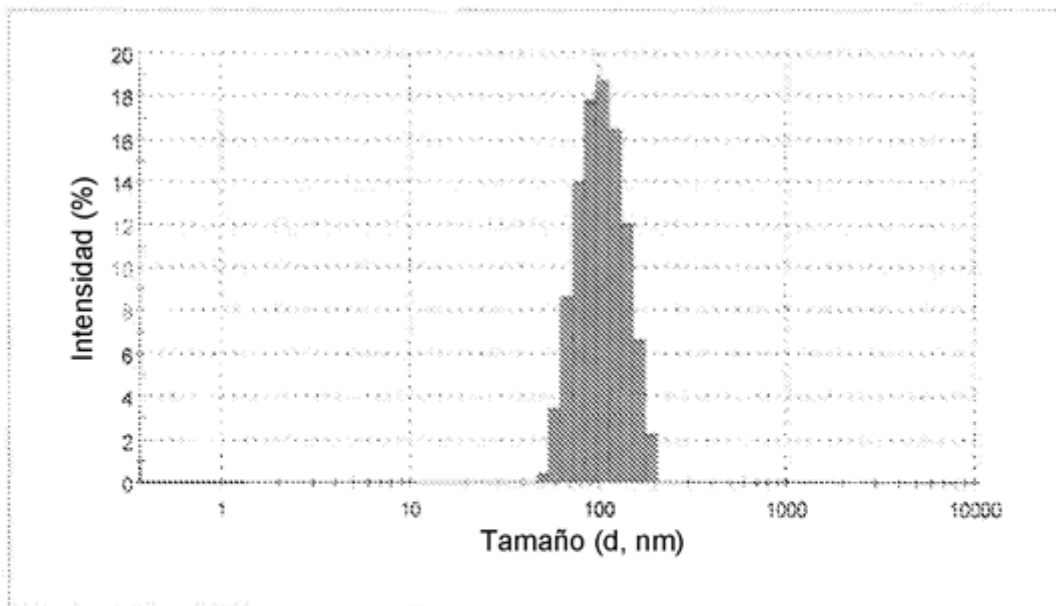


FIG. 3

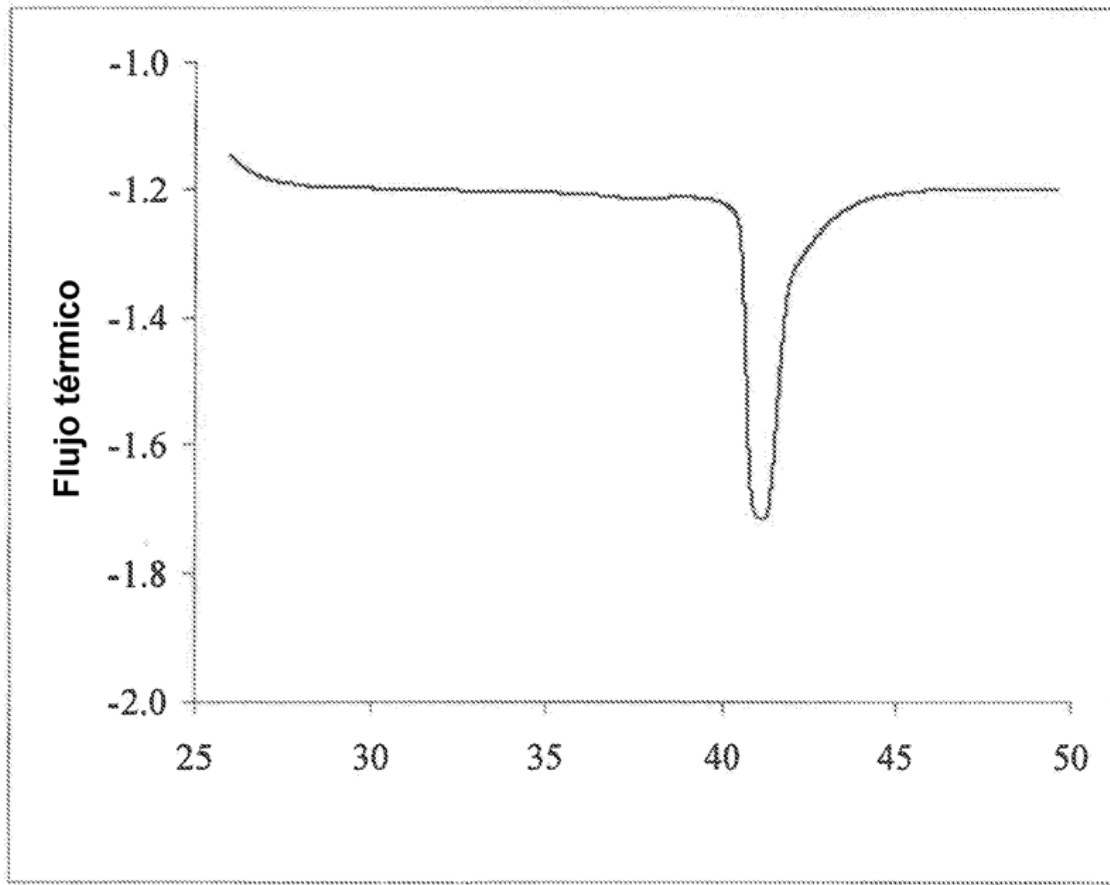


FIG. 4

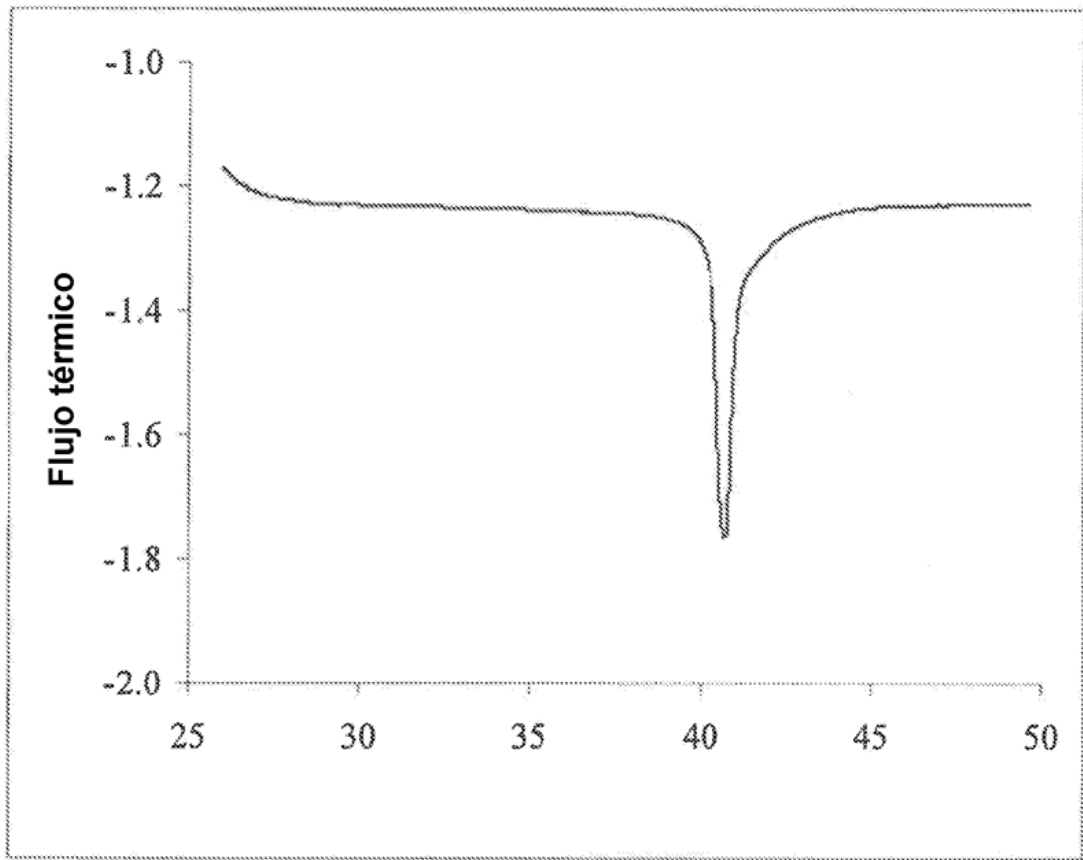


FIG. 5

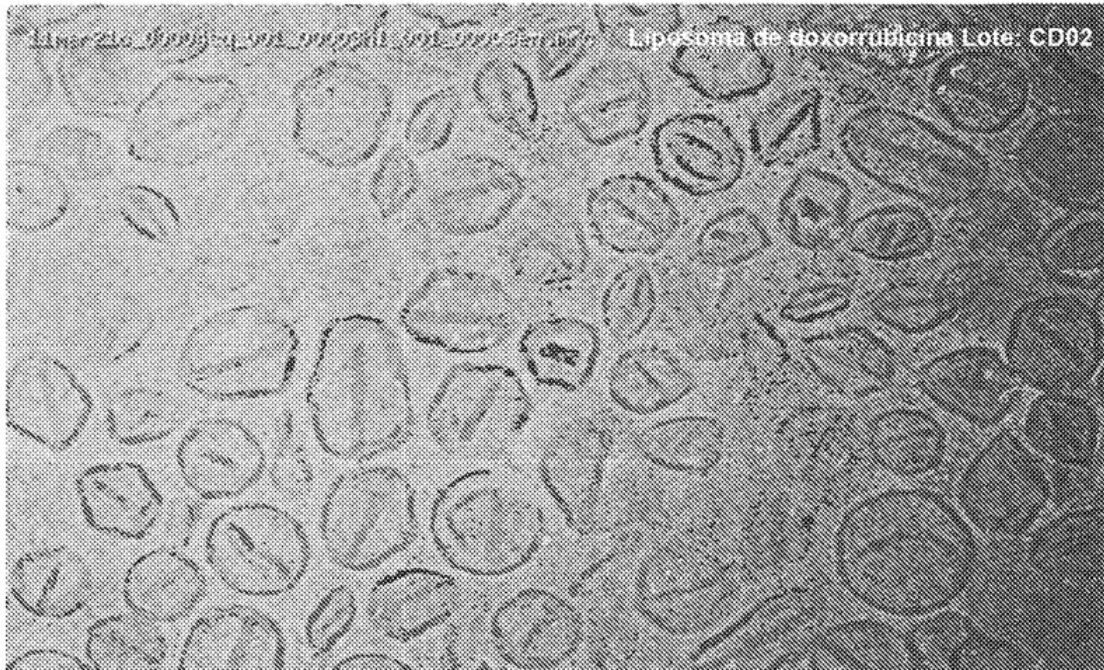


FIG. 6

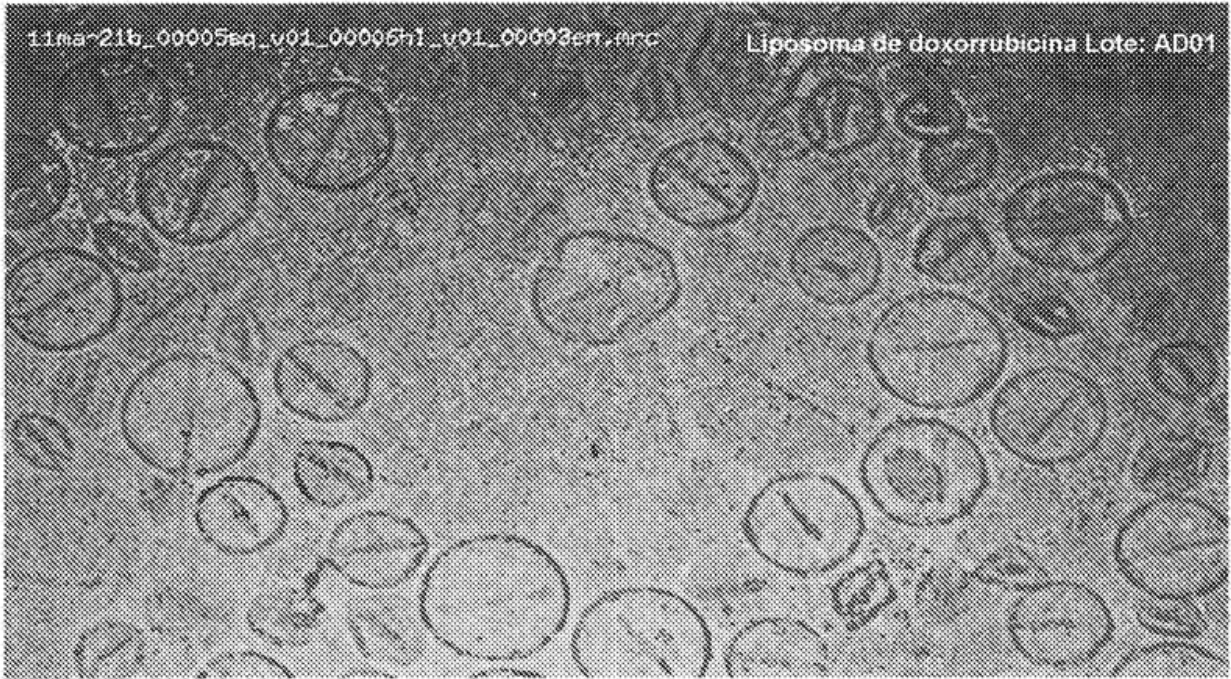


FIG. 7

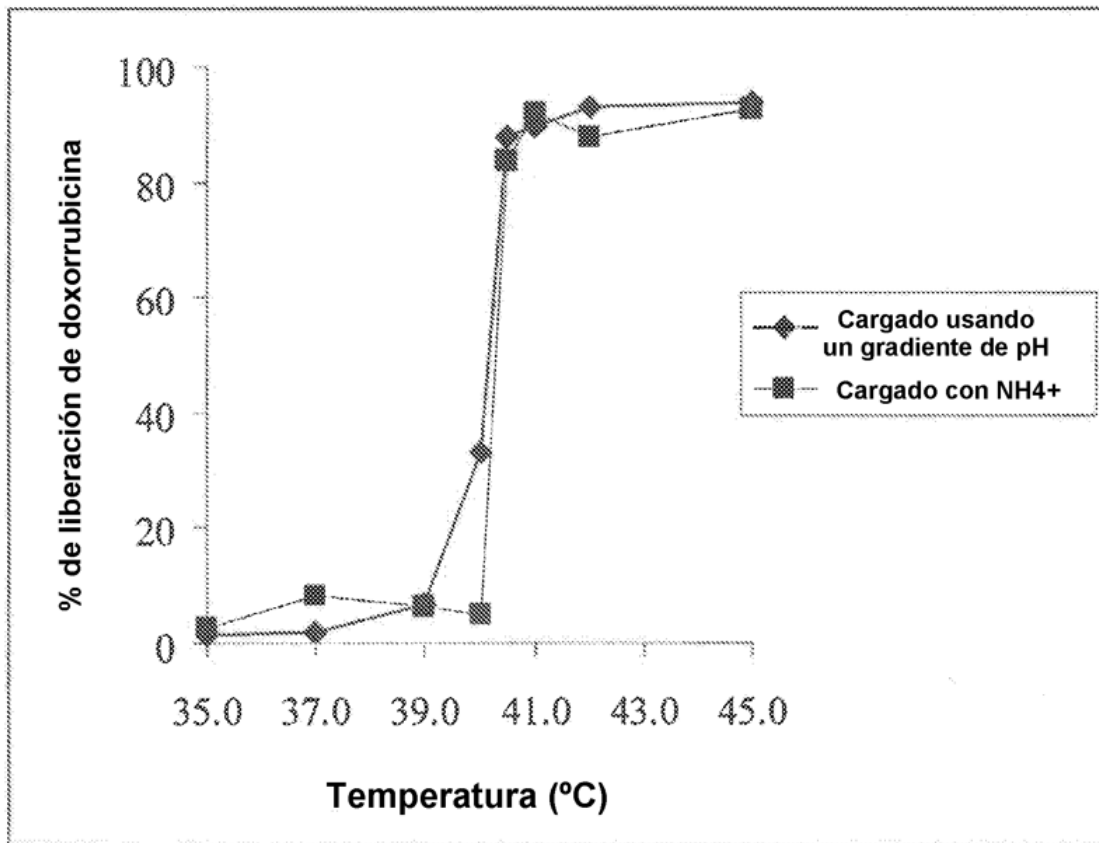


FIG. 8

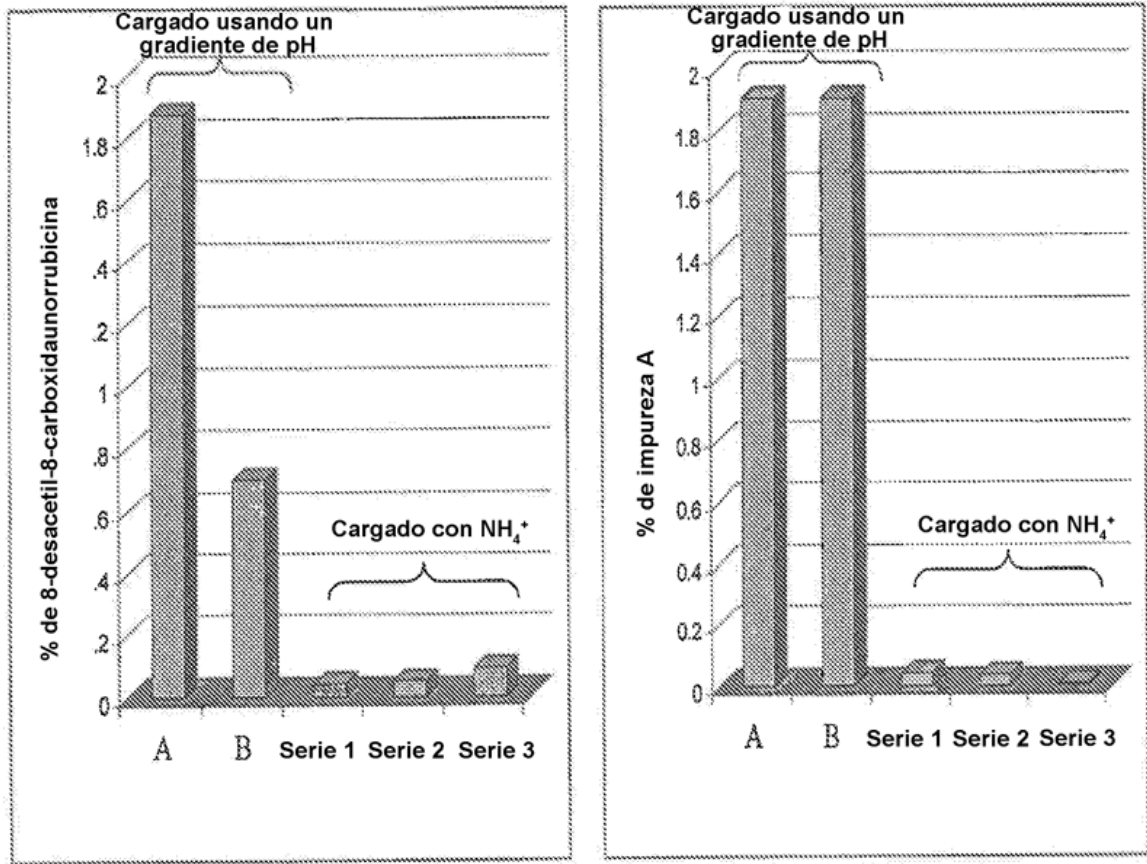


FIG. 9

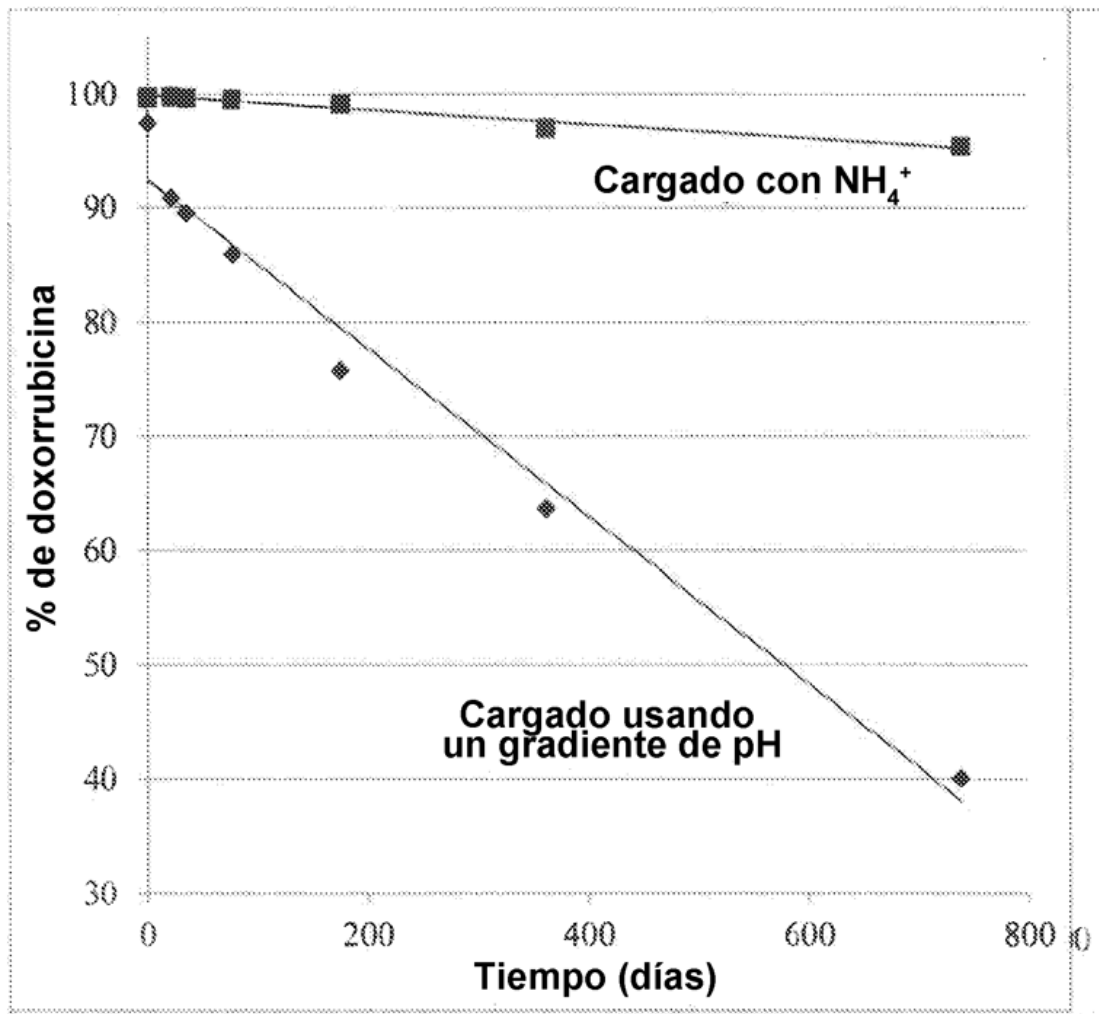


FIG. 10

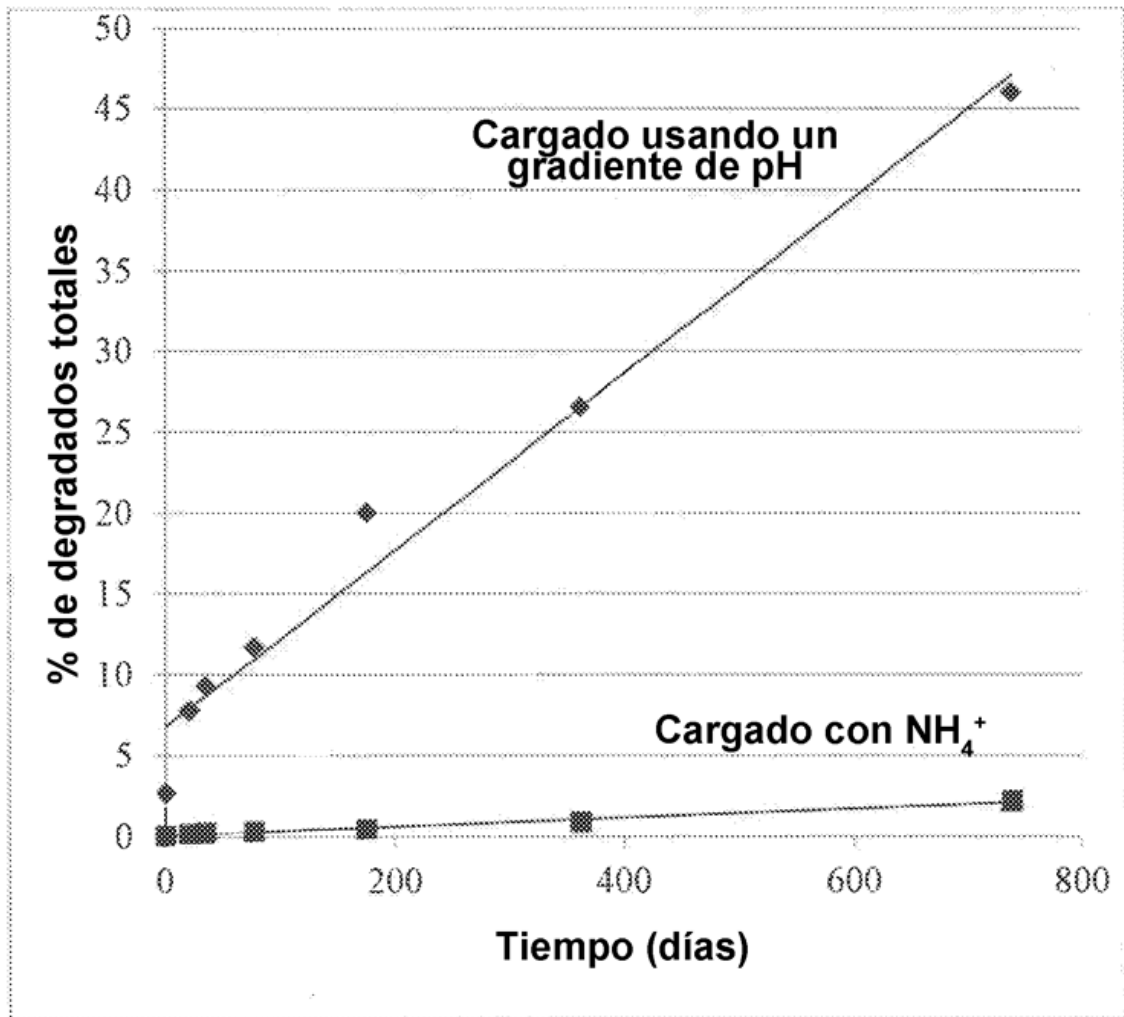


FIG. 11

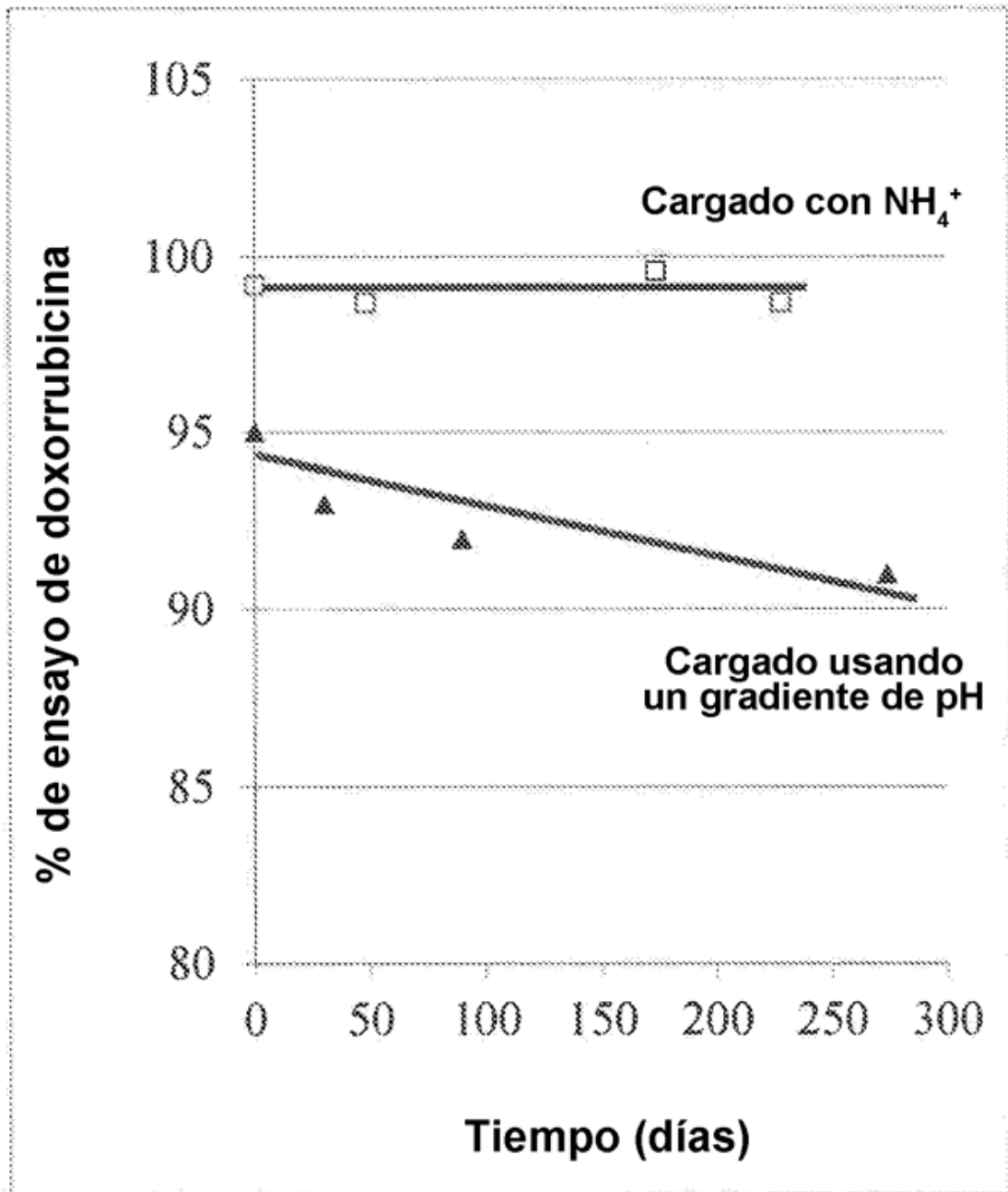


FIG. 12

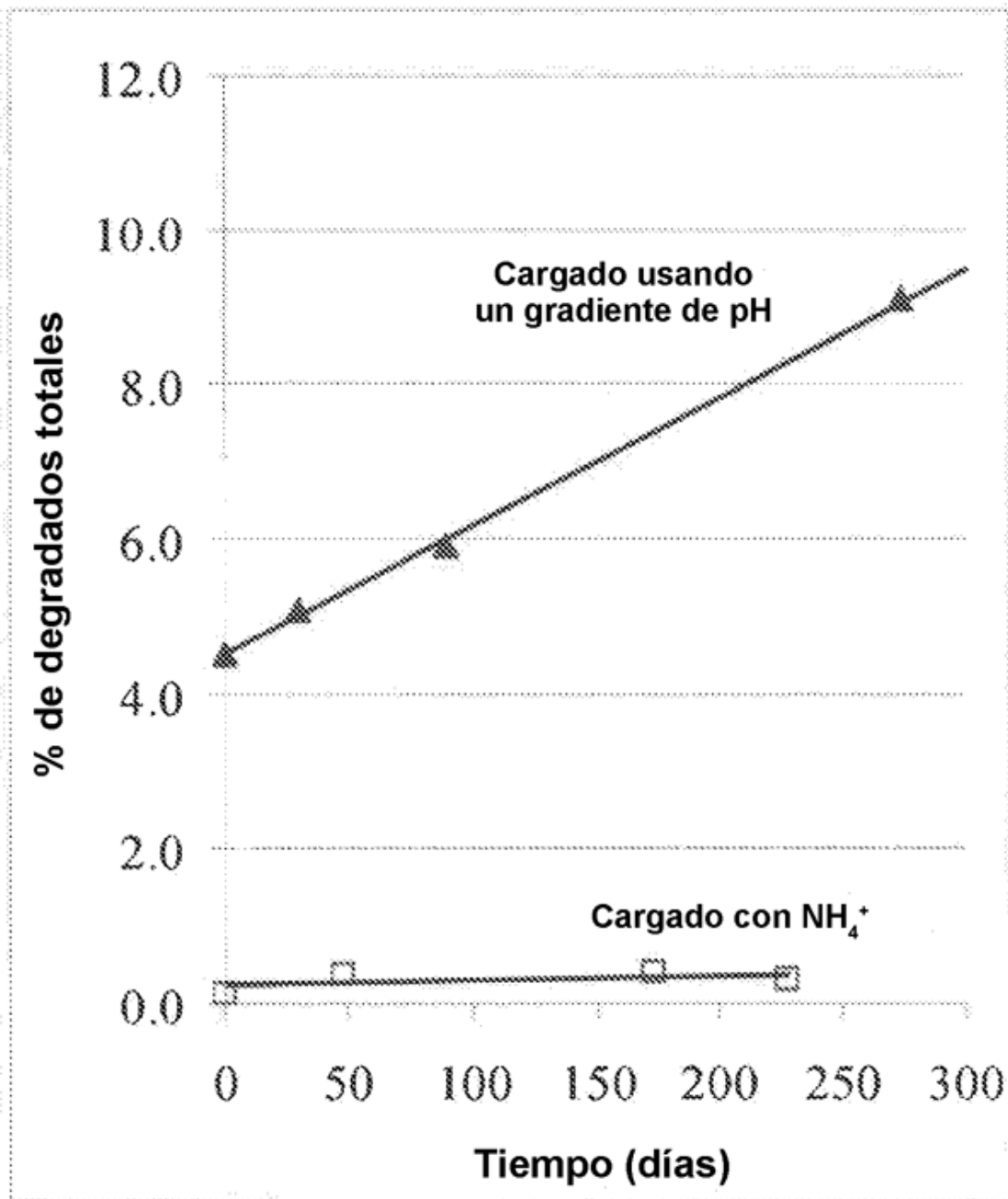


FIG. 13