



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 347 534**

(51) Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02766998 .5**

(96) Fecha de presentación : **03.10.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1432403**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2004**

(54) Título: **Carga de liposomas con iones metálicos.**

(30) Prioridad: **03.10.2001 US 326671 P**
17.12.2001 US 341529 P
15.02.2002 US 356759 P
07.03.2002 US 362074 P
09.07.2002 US 394273 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2010

(73) Titular/es: **Celator Pharmaceuticals, Inc.**
303B College Road East
Princeton, New Jersey 08540, US

(72) Inventor/es: **Tardi, Paul;**
Johnstone, Sharon;
Webb, Murray;
Bally, Marcel y
Abraham, Sheela

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 347 534 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).

Campo Técnico

5

10

30

Puesto que los liposomas consisten en lípidos atóxicos, generalmente tienen baja toxicidad y por lo tanto son útiles en una variedad de aplicaciones farmacéuticas. En particular, los liposomas son útiles para incrementar la vida en circulación de agentes que tienen una semivida corta en la corriente sanguínea. Los fármacos encapsulados en liposomas tienen a menudo biodistribuciones y toxicidades que difieren mucho de las de los fármacos libres. Para el aporte in vivo específico, los tamaños, las cargas eléctricas y las

propiedades superficiales de estos vehículos pueden cambiarse al variar los métodos de preparación y al ajustar la constitución lipídica del vehículo. Por ejemplo, los liposomas pueden elaborarse para liberar un fármaco más rápidamente al disminuir la longitud de la cadena de acilo de un lípido que constituye el vehículo.

Liposomas que contienen iones metálicos encapsulados en el interior de la vesícula se han usado en aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo, se han usado liposomas para el aporte de agentes de contraste con el objetivo de acumular un agente de contraste en una zona deseada dentro del cuerpo de un sujeto. En la última aplicación, los liposomas se han usado principalmente para el aporte de radionucleótidos e iones metálicos paramagnéticos diagnósticos en obtención de imágenes gamma y por resonancia magnética, respectivamente. Esto incluye la encapsulación liposomal de radionucleótidos tales como ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{67}Ga e iones paramagnéticos tales como Gd, Mn y óxido de manganeso. Típicamente, se emplean dos métodos para preparar liposomas con propósitos de obtención de imágenes. En el primer método, el metal se convierte en un quelato soluble y a continuación se introduce en el interior acuoso de un liposoma. En el segundo método, un agente quelante derivado con un grupo lipófilo se ancla a la superficie del liposoma durante o después de la preparación del liposoma.

Iones manganeso y de metales que no son de transición también han estado implicados en métodos para la encapsulación de agentes ionizables en liposomas que contienen un ionóforo insertado en la membrana del liposoma (véanse la patente de EE. UU. N° 5837282 y Fenske et ál., Biochim. Biophys. Acta (1998) 1414: 188-204). En este método, el ionóforo trasloca el ion metálico a través de la membrana del liposoma en un intercambio por protones, estableciendo así un gradiente de pH. El establecimiento de un gradiente de pH apropiado a través de la bicapa del liposoma permite que el agente ionizable se encapsule, ya que el agente puede cruzar fácilmente la bicapa liposomal en forma neutra y subsiguientemente queda encapsulado y atrapado dentro del

interior acuoso del liposoma debido a la conversión en la forma cargada eléctricamente (véanse Mayer et ál., Patentes de EE. UU. 6083530, 5616341, 5795589 y 5744158; Mayer et ál., Biochimica et Biophysica Acta (1986) 857:123). Este trabajo surge de estudios mecánicos completados por Deamer et ál. (Biochimica et Biophysica Acta (1976) 455:269-271) que demostraron que los liposomas concentraban eficazmente varias catecolaminas (dopamina, norepinefrina y epinefrina) en respuesta a un gradiente de pH de transmembrana).

La presencia de un interior liposomal ácido y un ambiente exterior de básico a neutro permite que agentes que están principalmente en forma neutra a pH de neutro a básico y principalmente en forma cargada eléctricamente a pH ácido sean atrapados fácilmente dentro de un liposoma. Fármacos que contienen restos ionizables, tales como grupos amina, son fácilmente encapsulados y retenidos en liposomas que contienen un interior ácido. Este método, en el que se usa un ionóforo (A23187) para generar un gradiente de pH a través de un liposoma que contiene manganeso, se ha usado para cargar topotecán en liposomas libres de colesterol que comprenden un conjugado PEG-lípido insertado en la membrana (véase el documento WO/0185131). Sin embargo, la carga y la retención satisfactorias usando un gradiente de pH de transmembrana se consigue aunque se mantenga el pH interno del liposoma. Puesto que el gradiente de pH sólo puede mantenerse durante cortos períodos de tiempo, la formulación clínica de fármacos en liposomas requiere la generación de un gradiente de pH en los liposomas justo antes de la carga del fármaco. Una segunda desventaja de este método resulta de la inestabilidad del lípido, y algunos fármacos, a pH ácido, que impide la necesidad del almacenamiento a largo plazo del liposoma cargado con fármaco. La congelación de formulaciones liposomales frena la velocidad de hidrólisis pero las formulaciones liposomales convencionales a menudo agregan y pierden componentes durante la descongelación a no ser que se usen crioprotectores apropiadamente seleccionados.

Se han presentado complejos entre fármacos tales como doxorubicina o ciprofloxacina e iones metálicos divalentes

tales como Mn^{2+} (Bouma, J., et ál. (1986) Pharm. Weekbl. Sci. Edn. 16:109-133; Riley, C.M., et ál. (1993) J. Pharm. Biomed. Anal. 11:49-59; y Fenske, D.B. (1998) Biochim. Biophys. Acta. 1414:188-204). Recientemente, se presentó que la captación de doxorubicina (pero no ciprofloxacina) dentro de LUV de esfingomielina/colesterol podría llevarse a cabo con manganeso en el medio interno de carga sin la presencia de un ionóforo (Cheung et ál., Biochimica et Biophysica Acta (1998) 1414:205). Se sugirió que un procedimiento que implicaba tanto la formación de complejo entre doxorubicina e iones manganeso como la protonación de doxorubicina dentro del liposoma daba como resultado la captación de este fármaco particular en presencia de iones manganeso. Se presentó el atrapamiento estable de doxorubicina, pero este trabajo se basaba en el uso de liposomas de esfingomielina/colesterol, una formulación señalada para la retención óptima de fármaco. La metodología presentada por Cheung, et ál., que implicaba el uso de $MnSO_4$ en tampón de HEPES de pH 7,4, no es reproducible debido a que el metal precipita en tal tampón.

Diversos grupos han investigado la interacción de iones metálicos con liposomas con el objetivo de evaluar los efectos de cationes metálicos sobre membranas de vesículas (Steffan et ál. (1994) Chem. Phys. Lipids 74(2): 141-150). Cationes metálicos divalentes tales como Ca^{2+} se han relacionado con la formación desfavorable de reticulación inducida por metales de liposomas que contienen fosfatidilglicerol (PG) debido a la carga eléctrica negativa de la superficie del liposoma. Los iones metálicos también se han relacionado con el incremento de la temperatura de transición de fase de sistemas membranosos modelados negativamente (Borle, et ál., (1985) Chemistry and Physics of Lipids 36: 263-283; Jacobson, et ál., (1975) Biochemistry 14(1):152-161). Estos estudios revelaban que la adición de calcio a membranas de dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) daba como resultado un incremento de la temperatura de transición de fase de aproximadamente 50°C.

Estos resultados indican que el uso de lípidos con carga eléctrica negativa junto con iones metálicos dará como

resultado liposomas que exhiben características inferiores para aplicaciones in vivo.

Sumario de la Invención

5 Esta invención se basa en el descubrimiento de que las propiedades de eficacia de carga y retención de un liposoma usando procedimientos basados en metales llevados a cabo en ausencia de un ionóforo en el liposoma dependen sorprendentemente del metal empleado en la constitución
10 lipídica del liposoma. Al seleccionar la constitución lipídica y una composición metálica, las propiedades de carga o retención pueden ajustarse para alcanzar una carga o liberación deseada de un agente seleccionado desde un liposoma. Por otra parte, la precipitación no deseable de
15 metal en soluciones empleadas en la formulación de liposomas encapsulados con iones metálicos puede evitarse mediante el uso de soluciones compatibles con metales, y la carga también puede mejorarse mediante la retirada o la complejación rigurosa de iones metálicos de una solución externa que
20 contiene tales liposomas.

 Esta invención proporciona así una composición liposómica que comprende liposomas que contienen una solución interna, comprendiendo la solución interna iones cobre y uno o más agentes terapéuticos encapsulados, agente que es un
25 fármaco o un agente antineoplástico; y en la que:

- (a) los liposomas no comprenden un ionóforo;
- (b) dicho agente terapéutico se ha cargado en liposomas preformados que contienen dichos iones cobre en dicha solución interna;
- 30 (c) la solución interna comprende una solución compatible con iones cobre; y
- (d) la composición comprende los liposomas en una solución externa a los liposomas.

 Preferiblemente, después de la encapsulación del
35 fármaco, un liposoma de esta invención o usado en métodos de esta invención tiene un pH extraliposomal que es sustancialmente similar al pH intraliposomal. Más preferiblemente, el pH extraliposomal e intraliposomal está a

aproximadamente pH 3,5 a pH 9,0, más preferiblemente, está entre aproximadamente pH 6,0 y pH 8,5, aún más preferiblemente, está entre aproximadamente 6,5 y 8,5, y, lo más preferiblemente, está entre aproximadamente pH 6,5 y pH 7,5. La invención también proporciona un método para cargar un agente terapéutico en un liposoma en una composición liposómica, comprendiendo el método:

- i) proporcionar una composición liposómica que comprende un liposoma en una solución externa, conteniendo el liposoma una solución interna que comprende iones cobre encapsulados;
 - ii) añadir uno o más agentes terapéuticos a la solución externa; y
 - iii) mantener el agente en la solución externa durante un tiempo suficiente para cargar el agente en el liposoma,
- en el que los liposomas no contienen un ionóforo, y la solución interna comprende una solución compatible con iones cobre.

Preferiblemente, habrá poca o ninguna diferencia de pH entre el interior y el exterior del liposoma. Más preferiblemente, el pH será comparable al pH de los fluidos fisiológicos o un pH aproximadamente neutro. Preferiblemente, la solución externa tendrá menos, más preferiblemente sustancialmente menos, iones metálicos. Preferiblemente, la solución externa y la superficie de los liposomas estarán esencialmente libres de iones metálicos en estado no complejoado.

Adicionalmente, la presente invención proporciona composiciones que se preparan de acuerdo con este método así como liposomas que contienen metales encapsulados adecuados para el uso en este método. En particular, la invención proporciona una composición liposómica que comprende liposomas que comprenden uno o más agentes terapéuticos producidos mediante el método de la invención.

También se describen en la presente memoria métodos para cargar agentes en liposomas, que comprenden las etapas de:

- i) preparar un liposoma que comprende un ion de metal

de transición encapsulado y

- ii) añadir a la solución externa de dicho liposoma un agente de modo que dicho agente se encapsule en el liposoma.

5 El ion de metal de transición puede seleccionarse de uno o más de Fe, Co, Ni, Cu, Zn, V, Ti, Cr, Rh, Ru, Mo y Pd y puede encapsularse en un liposoma en el que también se encapsula Mn.

También se describen en la presente memoria
10 composiciones que se preparan de acuerdo con este método así como liposomas que contienen un ion de metal de transición o dos o más de tales iones diferentes, adecuados para el uso en el método.

También se describe en la presente memoria un método
15 para cargar liposomas usando un ion metálico en una solución "compatible con el metal", según se describe en la presente memoria, para minimizar la precipitación del metal y para mantenerlo en solución durante un tiempo suficiente para preparar el liposoma. Así, también se describe en la presente
20 memoria un método para cargar un agente en un liposoma, comprendiendo dicho método las etapas de:

- i) preparar un liposoma que tiene un medio encapsulado que comprende un ion metálico y una solución compatible con el metal; y
- 25 ii) añadir a la solución externa de dicho liposoma un agente de modo que dicho agente se encapsule en el liposoma.

Adicionalmente, se describen en la presente memoria
composiciones que se preparan de acuerdo con este método así
30 como liposomas que contienen un ion metálico y soluciones compatibles con el metal adecuadas para el uso en este método.

Esta invención se basa además en el hallazgo de que los liposomas preparados para ser de bajo contenido de colesterol
35 presentan propiedades de carga y retención inesperadas cuando se utiliza una carga basada en metales. Así, también se describe en la presente memoria un método para encapsular un agente en un liposoma, estando presente el liposoma en una

solución externa, comprendiendo dicho métodos las etapas de:

i) preparar un liposoma que comprende:

a) uno o más lípidos que forman vesículas, con tal de que el liposoma sea bajo en colesterol; y

5 b) un metal encapsulado en una solución compatible con el metal; y

ii) añadir a la solución externa un agente activo de modo que el agente se encapsule en el liposoma.

10 En un caso, la solución compatible con el metal incluye un metal de transición.

También se describe en la presente memoria un método para encapsular un agente en un liposoma, comprendiendo el método las etapas de:

15 i) proporcionar un liposoma de esta invención en una solución externa, en donde el liposoma no tiene un gradiente de pH de transmembrana; y

ii) añadir a la solución externa un agente de modo que el agente se encapsule en el liposoma.

20 También se describen en la presente memoria métodos para administrar liposomas a un mamífero y métodos para tratar a un mamífero afectado por o propenso a o que se sospecha que está afectado por un trastorno (p. ej. cáncer). En particular, se describe en la presente memoria un método para administrar un liposoma a un sujeto, que comprende
25 administrar una composición farmacéutica que comprende liposomas de la invención. Se entenderá generalmente que los métodos de tratamiento o de administración comprenden administrar la composición farmacéutica en una dosificación suficiente para mejorar dicho trastorno o sus síntomas. En un
30 aspecto, esta invención se basa en el hallazgo de que los liposomas cargados con agente activo usando un metal encapsulado presentan propiedades de carga y retención que son diferentes de las presentadas por el manganeso.

35 También se describe en la presente memoria una composición liposómica que comprende un liposoma que contiene una solución interna que comprende uno o más iones de metal de transición encapsulados y uno o más agentes terapéuticos, con tal de que si el liposoma tiene una composición lipídica

que consiste en esfingomielina y colesterol o si el uno o más agentes terapéuticos es solamente doxorubicina, el uno o más iones encapsulados no sea solamente manganeso. Esta invención también proporciona la composición liposómica mencionada
5 anteriormente en la que los liposomas están en una solución externa.

También se describe en la presente memoria un método para cargar liposomas con un agente, en el que la composición liposómica es una composición liposómica como la descrita
10 anteriormente, comprendiendo el método: seleccionar un agente que sea capaz de cruzar membranas de liposomas en la composición cuando esté presente en la solución externa de la composición pero incapaz de cruzar dichas membranas cuando esté en un complejo con uno o más iones metálicos en la
15 solución interna, añadir el agente seleccionado a la solución externa de la composición, y mantener el agente en la solución externa durante un tiempo suficiente para cargar el agente.

Esta invención también proporciona métodos para
20 preparar, seleccionar o diseñar liposomas, que comprenden seleccionar un ion metálico para encapsulación en un liposoma para alcanzar una retención deseada de un agente encapsulado en el liposoma. Así, un método para seleccionar una composición liposómica que tiene una propiedad de carga o
25 retención preferida para un agente de acuerdo con esta invención comprende:

- (a) proporcionar una primera composición liposómica que comprende un liposoma en una solución externa, conteniendo el liposoma una solución interna que
30 comprende uno o más iones de metales de transición;
- (b) añadir el agente a la solución externa de la composición de (a) durante un período de tiempo para cargar el agente en el liposoma de la primera composición;
- 35 (c) proporcionar una segunda composición liposómica que comprende un liposoma en una solución externa, conteniendo el liposoma una solución interna que comprende uno o más iones de metales de transición;

- (d) añadir el agente a la solución externa de la composición de (c) durante un período de tiempo para cargar el agente en el liposoma de la segunda composición;
- 5 (c) comparar la cantidad de agente cargado o la cantidad de agente retenido a lo largo del tiempo, para el liposoma de la composición resultante en (b) con el liposoma de la composición resultante en (d); y
- (f) seleccionar la composición liposómica resultante en
- 10 (b) o (d) que tenga una mayor cantidad de agente cargado o retenido;
- en el que:
- (I) las composiciones liposómicas de (a) y (c) difieren en uno o más de: (i) los iones metálicos
- 15 presentes en la solución interna; (ii) los lípidos en el liposoma de la composición liposómica; y (iii) la concentración de iones metálicos presente en la solución interna;
- (II) el período de tiempo en (b) es diferente del período de tiempo en (d); o
- 20 (III) la carga en (b) se realiza a una temperatura diferente que la carga en (d).

Breve Descripción de los Dibujos

25 FIGURA 1A: Una gráfica que muestra la carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20) como una función del tiempo usando gluconato de Cu(II) 100 mM tamponado hasta pH 7,4 con trietanolamina (TEA) como el medio interno y sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, EDTA 30 mM (SHE), pH

30 7,4, como el medio externo. La carga se llevó a cabo a 50°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 1B: Una gráfica que muestra la carga de daunorrubicina en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 90:10) como una función del tiempo usando CuSO₄ 150 mM,

35 histidina 20 mM ajustada hasta pH 7,4 con TEA como el medio interno y SHE, pH 7,4, como el medio externo. La carga se llevó a cabo a 60°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 2: Una gráfica que muestra la carga de irinotecán en liposomas de DPPC/Col (relación molar 55:45) como una función del tiempo usando gluconato de Cu(II) 100 mM ajustado hasta pH 7,4 con TEA como el medio interno y SHE, pH 7,4, como el medio externo. La carga se llevó a cabo a 50°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 3: Una gráfica que muestra la carga de epirrubicina en liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) como una función del tiempo usando MnSO₄ 300 mM, imidazol 20 mM, pH 7,4, como el medio interno y SHE, pH 7,4, como el medio externo. La carga se llevó a cabo a 60°C a una relación molar de fármaco a lípido de aproximadamente 0,2:1.

FIGURA 4A: Una gráfica que muestra la carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG que contienen floxuridina (FUDR) en una relación molar 85:15 como una función del tiempo usando gluconato de Cu(II) 100 mM, TEA 220 mM, pH 7,4, como el medio interno y sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4, como la solución externa. La FUDR se encapsuló pasivamente y la carga de irinotecán se llevó a cabo a 50°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 4B: Una gráfica que muestra la carga de irinotecán en liposomas de DSPC/Col/DSPG (relación molar 70:10:20) que contienen FUDR como una función del tiempo usando gluconato de Cu(II) 100 mM, TEA 220 mM, pH 7,4, como el medio interno y bien HEPES 20 mM, bien NaCl 150 mM (HBS), pH 7,4, (●) o bien sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4, (○) como el tampón externo. La FUDR se encapsuló pasivamente y la carga de irinotecán se llevó a cabo a 50°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 5: Una gráfica que muestra la carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20) que contienen carboplatino como una función del tiempo usando CuSO₄ 150 mM ajustado hasta pH 7,4 con TEA como el medio interno y SHE, pH 7,4, como el tampón externo. El carboplatino se encapsuló pasivamente y la carga de irinotecán se llevó a cabo a 60°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 6: Una gráfica que muestra la carga de

daunorrubicina en liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45) que contienen cisplatino como una función del tiempo usando CuCl_2 150 mM ajustado hasta pH 7,4 con NaOH como el medio interno y HBS, pH 7,4, como el medio externo. El
5 cisplatino se encapsuló pasivamente y la carga de daunorrubicina se llevó a cabo a 60°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 7: Una gráfica que muestra la carga de doxorubicina en liposomas de DPPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) como una función del tiempo utilizando MnSO_4 300 mM (●) o citrato 300 mM, pH 3,5, (■) como el medio interno. La carga de doxorubicina se llevó a cabo a relaciones en peso de fármaco a lípido de 0,1:1 (Panel A), 0,2:1 (Panel B) o 0,3:1 (Panel C) a 37°C. Los puntos de datos representan la
10 media de tres experimentos repetidos y las barras de error representan la desviación estándar.

FIGURA 8A: Una gráfica que muestra la carga de doxorubicina en liposomas de DMPC/Col (relación molar 55:45) como una función del tiempo usando MnSO_4 300 mM (●), citrato
20 300 mM, pH 3,5, (■) o MnCl_2 300 mM (▲). La doxorubicina se cargó a una relación molar de fármaco a lípido de 0,2:1 a 60°C. Los puntos de datos representan la media de tres experimentos repetidos y las barras de error representan la desviación estándar.

FIGURA 8B: Un histograma que muestra gradientes de pH de transmembrana medidos antes y después de la carga de doxorubicina bajo diversas condiciones. Las muestras incluyen las basadas en el método de carga de citrato antes de (columna 1) y después de la carga de doxorubicina
25 (columna 2 el método de carga de MnSO_4 antes de (columna 3) y después de la carga de doxorubicina (columna 4); y el método de carga de MnCl_2 antes de (columna 5) y después de la carga de doxorubicina (columna 6). Los resultados representan el gradiente de pH medio de tres experimentos separados y las
30 barras de error indican la desviación estándar.

FIGURA 9: Una gráfica que muestra la carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) utilizando bien MnSO_4 300 mM (○) o bien CuSO_4 300 mM (●) como

el medio de carga interno. El irinotecán se cargó a 60°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 10A: Una gráfica que muestra la carga de daunorrubicina en liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) como una función del tiempo usando MnSO₄ 300 mM como el medio interno. La carga se llevó a cabo a 23°C (●), 37°C (○) y 60°C (▼) a una relación en peso inicial de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 10B: Una gráfica que muestra la carga de daunorrubicina en liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) como una función del tiempo usando CoCl₂ 150 mM, como el medio interno. La carga se llevó a cabo a 23°C (●), 37°C (○) y 60°C (▼) a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 10C: Una gráfica que muestra la carga de daunorrubicina en liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) como una función del tiempo usando NiSO₄ 300 mM como el medio interno. La carga se llevó a cabo a 60°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,2:1.

FIGURA 11: Una gráfica que muestra la carga de epirubicina en liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) como una función del tiempo usando CuSO₄ 300 mM a 60°C. La epirubicina se cargó para alcanzar una relación en peso de fármaco a lípido de 0,2:1.

FIGURA 12A: Una gráfica que muestra la carga de doxorubicina en liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45) como una función del tiempo usando CoCl₂ 300 mM como el medio interno y SHE, pH 7,5, como el tampón externo. La carga se llevó a cabo a 60°C a una relación en peso de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 12B: Una gráfica que muestra la carga de daunorrubicina en liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45) como una función del tiempo usando CuSO₄ 300 mM como el medio interno y HBS, pH 7,4, como el tampón externo. La daunorrubicina se cargó a 60°C a una relación en peso de fármaco a lípido de 0,1:1 (●), 0,2:1 (○) y 0,4:1 (▼).

FIGURA 12C: Una gráfica que muestra la carga de topotecán en liposomas de DSPC/DSPE-PEG (relación molar 95:5)

como una función del tiempo a 37°C. Una solución de CuSO₄ 300 se usó como el medio de carga interno. El topotecán se cargó a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 13A: Una gráfica que muestra la carga de daunorrubicina en liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) que contienen cisplatino como una función del tiempo usando MnCl 150 mM, como el medio interno, y HBS, pH 7,4, como la solución externa. El cisplatino se encapsuló pasivamente y la carga de daunorrubicina se llevó a cabo a 60°C a una relación de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 13B: Una gráfica que muestra la carga de daunorrubicina en liposomas de DMPC/Col (relación molar 55:45) que contienen cisplatino como una función del tiempo usando CuCl₂ 150 mM como el medio interno y HBS, pH 7,4, como la solución externa. El cisplatino se encapsuló pasivamente y la carga de daunorrubicina se llevó a cabo a 60°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 13C: Una gráfica que muestra la carga de daunorrubicina en liposomas de DPPC/Col (relación molar 55:45) que contienen carboplatino como una función del tiempo usando NiSO₄ 300 mM como el medio interno y sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4, como la solución externa. El carboplatino se encapsuló pasivamente y la carga de daunorrubicina se llevó a cabo a 37°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 13D: Una gráfica que muestra la carga de irinotecán en liposomas de DPPC/Col (relación molar 55:45) que contienen cisplatino como una función del tiempo usando CuCl₂ 75 mM + CuSO₄ 150 mM como el medio interno y SHE, pH 7,4, como la solución externa. El cisplatino se encapsuló pasivamente y la carga de irinotecán se llevó a cabo a 60°C a una relación de fármaco a lípido de 0,1:1.

FIGURA 14: Una gráfica que muestra las relaciones de vincristina/lípido y doxorubicina/lípido en diversos puntos temporales durante la carga de vincristina a 50°C en liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45) precargados con doxorubicina. Los liposomas que contenían MnSO₄ 300 mM se precargaron con doxorubicina (●) a 50°C a una relación de

fármaco a lípido de 0,2:1 p/p. La carga de vincristina (■) se llevó a cabo con la ayuda del ionóforo A23187 a una relación de fármaco a lípido de 0,05:1 p/p. Las barras de error representan la desviación estándar entre tres experimentos repetidos.

FIGURA 15: Un histograma que muestra la carga secuencial con metal de irinotecán y doxorubicina en liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45) que contienen CuSO_4 300 mM como el medio interno. Los liposomas se precargaron con irinotecán a 60°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,2:1 hasta aproximadamente 100% seguido por encapsulación de doxorubicina, cargada a una relación molar de fármaco/lípido de 0,15:1. Como control, se midió separadamente la captación liposomal de cada fármaco en liposomas cargados individualmente. Las barras de error representan la desviación estándar entre tres experimentos repetidos.

FIGURA 16: Un histograma que muestra la relación de fármaco a lípido en plasma de liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) que contienen daunorrubicina 24 horas después de la administración intravenosa a ratones Balb/c. La daunorrubicina se cargó a una relación de fármaco a lípido de 0,1:1 a 60°C en liposomas que comprendían bien CuSO_4 300 mM; bien citrato 150 mM, pH 4; o bien MnSO_4 300 mM como el medio interno. Las barras de error representan la desviación estándar entre tres experimentos repetidos.

FIGURA 17: Una gráfica que muestra la carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20) en respuesta a CuSO_4 encapsulado después de paso de los liposomas a través de una columna Chelex-100™ equilibrada con NaCl 150 mM. Los liposoma se intercambiaron subsiguientemente en sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4. La carga se llevó a cabo mediante incubación a 37°C (●), 50°C (○) y 60°C (▼).

FIGURA 18: Una gráfica que muestra la carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20) en respuesta a CuSO_4 encapsulado a 37°C (●), 50°C (○) y 60°C (▼). La solución externa del liposoma se sometió a intercambio de tampón por solución salina y se sometió a intercambio adicionalmente por sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM,

pH 7,4 (sin EDTA externo) antes de la carga.

FIGURA 19: Una gráfica que muestra la carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20) en respuesta a gluconato de cobre encapsulado después del intercambio de tampón de la solución externa por sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, EDTA 30 mM, pH 7,4. La carga se llevó a cabo mediante incubación a 37°C(●), 50°C (○) y 60°C(▼).

FIGURA 20: Una gráfica que muestra la carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20) en respuesta a gluconato de cobre encapsulado después del paso de las preparaciones liposómicas a través de una columna Chelex-100™ equilibrada con sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4. La carga de irinotecán se llevó a cabo mediante incubación a 37°C(●), 50°C (○) y 60°C(▼).

FIGURA 21: Una gráfica que muestra niveles de lípido en plasma de liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20), DSPC/SM/DSPG (relación molar 75:5:20) y DSPC/SM/DSPG (relación molar 70:10:20) cocargados con daunorrubicina y carboplatino representados por ●, ○ y ▼, respectivamente. El carboplatino fue atrapado pasivamente y la daunorrubicina se cargó activamente en respuesta a CuSO₄ encapsulado.

FIGURA 22: Una gráfica que muestra niveles de daunorrubicina en plasma de liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20), DSPC/SM/DSPG (relación molar 75:5:20) y DSPC/SM/DSPG (relación molar 70:10:20) cocargados con daunorrubicina y carboplatino representados por ●, ○ y ▼, respectivamente. El carboplatino fue atrapado pasivamente y la daunorrubicina se cargó activamente en respuesta a CuSO₄ encapsulado.

FIGURA 23: Una gráfica que muestra niveles de carboplatino en plasma de liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20), DSPC/SM/DSPG (relación molar 75:5:20) y DSPC/SM/DSPG (relación molar 70:10:20) cocargados con daunorrubicina y carboplatino representados por ●, ○ y ▼, respectivamente. El carboplatino fue atrapado pasivamente y la daunorrubicina se cargó activamente en respuesta a CuSO₄ encapsulado.

Descripción Detallada de la Invención**Preparación de liposomas**

El término "liposoma", según se usa en la presente memoria, significa vesículas comprendidas por una o más bicapas lipídicas ordenadas concéntricamente que encapsulan una fase acuosa. La formación de tales vesículas requiere la presencia "lípidos formadores de vesículas" que son lípidos anfipáticos capaces bien de formar o bien de incorporarse en una estructura de bicapa. El último término incluye lípidos que son capaces de formar una bicapa por sí mismos o cuando están en combinación con otro lípido o lípidos. Un lípido anfipático se incorpora en una bicapa lipídica al tener su resto hidrófobo en contacto con la región hidrófoba interior de la bicapa de la membrana y su resto de cabeza polar orientado hacia una superficie polar externa de la membrana. La hidrofilia surge de la presencia de grupos funcionales tales como grupos hidroxilo, fosfato, carboxilo, sulfato, amino o sulfhidrilo. La hidrofobia resulta de la presencia de una cadena larga de grupos hidrocarbonados alifáticos.

Se apreciará que cualquier lípido formador de vesículas adecuado puede utilizarse en la práctica de esta invención, a juicio de un experto en la especialidad. Esto incluye fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS); glicolípidos; y esfingolípidos tales como esfingosina, ceramidas, esfingomielina, y glicoesfingolípidos (tales como cerebrósidos y gangliósidos). Los fosfolípidos preferidos comprenden dos cadenas acílicas de 6 a 24 átomos de carbono seleccionadas independientemente entre sí y con diversos grados de insaturación.

Los liposomas preparados de acuerdo con esta invención pueden generarse mediante técnicas convencionales usadas para preparar vesículas. Estas técnicas incluyen el método de inyección de éter (Deamer et ál., Acad. Sci. (1978) 308: 250), el método del tensioactivo (Brunner et ál., Biochim. Biophys. Acta (1976) 455: 322), el método de congelación-descongelación (Pick et ál., Arch. Biochim. Biophys. (1981)

212: 186), el método de evaporación en fase inversa (Szoka et ál., Biochim. Biophys. Acta. (1980) 601: 559-71), el método de tratamiento ultrasónico (Huang et ál., Biochemistry (1969) 8: 344), el método de inyección de etanol (Kremer et ál., Biochemistry (1977) 16: 3932), el método de extrusión (Hope et ál., Biochim. Biophys. Acta (1985) 812:55-65) y el método de la prensa francesa (Barenholz et ál., FEBS Lett. (1979) 99: 210). Todos los procedimientos anteriores son tecnologías básicas para la formación de vesículas liposómicas y estos procedimientos pueden usarse en combinaciones. Preferiblemente, las vesículas unilamelares pequeñas (SUV) se preparan mediante el método de tratamiento ultrasónico, el método de inyección de etanol y el método de la prensa francesa. Preferiblemente, las vesículas multilamelares (MLV) se preparan mediante el método de evaporación en fase inversa o mediante la adición simple de una solución acuosa a una película lipídica seguido por dispersión mediante agitación mecánica (Bangham et ál., J. Mol. Biol. (1965) 13: 238-252).

Preparaciones liposómicas particularmente adecuadas que pueden usarse en la práctica de esta invención son vesículas unilamelares grandes (LUV). Las LUV pueden prepararse mediante el método de inyección de éter, el método del tensioactivo, el método de congelación-descongelación, el método de evaporación en fase inversa, el método de la prensa francesa o el método de extrusión. Preferiblemente, las LUV se preparan de acuerdo con el método de extrusión. El método de extrusión implica combinar en primer lugar lípidos en cloroformo para dar una relación molar deseada. Un marcador lipídico puede añadirse opcionalmente a la preparación lipídica. La mezcla resultante se seca bajo una corriente de nitrógeno gaseoso y se pone en una bomba de vacío hasta que el disolvente se retira sustancialmente. Las muestras se hidratan a continuación en una solución acuosa apropiada, que puede contener una mezcla de agente o agentes terapéuticos. La mezcla se hace pasar a continuación a través de un aparato de extrusión (p. ej. un aparato de Northern Lipids, Vancouver, Canadá) para obtener liposomas de un tamaño definido. El tamaño promedio de los liposomas puede

determinarse mediante una variedad de métodos incluyendo difusión cuasielástica de luz usando, por ejemplo, un dimensionador de partículas submicrométricas NICOMP™ 370 a una longitud de onda de 632,8 nm.

5 En algunos aspectos de esta invención, los liposomas se preparan para ser de "bajo contenido de colesterol". Tales liposomas "sustancialmente no contienen colesterol" o "esencialmente no contienen colesterol". El término "sustancialmente sin colesterol" permite la presencia de una
10 cantidad de colesterol que es insuficiente para alterar significativamente las características de transición de fase del liposoma (típicamente menos de 20% en moles de colesterol). 20% en moles o más de colesterol amplía el intervalo de temperaturas a las que se produce la transición
15 de fase, desapareciendo la transición de fase a niveles de colesterol superiores (p. ej. más de 30% en moles). Preferiblemente, un liposoma que no tiene sustancialmente colesterol tendrá aproximadamente 15 o menos y más preferiblemente aproximadamente 10% en moles o menos de
20 colesterol. El término "esencialmente sin colesterol" significa aproximadamente 5% en moles o menos, preferiblemente aproximadamente 2% en moles o menos y aún más preferiblemente aproximadamente 1% en moles o menos de colesterol. Lo más preferiblemente, no estará presente o se
25 añadirá colesterol cuando se preparan liposomas "con bajo contenido de colesterol".

Los liposomas de esta invención pueden comprender un conjugado polímero hidrófilo-lípido tal como un conjugado polialquiléter-lípido. Se ha utilizado el injerto de un
30 polímero hidrófilo tal como un polialquiléter en la superficie de liposomas para "estabilizar estéricamente" los liposomas, incrementando de ese modo la longevidad en circulación de los liposomas. Esto da como resultado una estabilidad en sangre aumentada y un tiempo de circulación
35 incrementado, una captación reducida en tejidos sanos y un aporte incrementado a zonas enfermas tales como tumores sólidos (véanse: las Patentes de EE. UU. 5013556 y 5593622; y Patel et ál., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst (1992) 9: 39-

90). Típicamente, el polímero se conjuga a un componente lipídico del liposoma. El término "conjugado polímero hidrófilo-lípido" se refiere a un lípido formador de vesículas conectado covalentemente en su resto de cabeza polar a un polímero hidrófilo, y se elabora típicamente a partir de un lípido que tiene un grupo funcional reactivo en el resto de cabeza polar para ligarse al polímero. Grupos funcionales reactivos adecuados son, por ejemplo, grupos amino, hidroxilo, carboxilo o formilo. El lípido puede ser cualquier lípido descrito en la especialidad para el uso en tales conjugados. Preferiblemente, el lípido es un fosfolípido que tiene dos cadenas acíclicas que comprenden entre aproximadamente 6 y aproximadamente 24 átomos de carbono de longitud con grados de insaturación variables. Lo más preferiblemente, el lípido en el conjugado es un PE, preferiblemente de forma diestearoílica. El polímero es un polímero biocompatible caracterizado por una solubilidad en agua que permite que las cadenas de polímero se extiendan eficazmente más allá de la superficie del liposoma con suficiente flexibilidad para que se produzca una cobertura superficial uniforme de un liposoma. Preferiblemente, tal polímero es un polialquiléter, incluyendo polietilenglicol (PEG), polimetilenglicol, polihidroxipropilenglicol, polipropilenglicol, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido acrílico) y sus copolímeros, así como los divulgados en las Patentes de EE. UU. 5.013.556 y 5.395.619. Preferiblemente, tal polímero tiene un peso molecular entre aproximadamente 350 y 5000 daltons. El conjugado puede prepararse para que incluya un enlace lípido-polímero liberable tal como un enlace peptídico, éster o disulfuro. El conjugado también puede incluir un ligando de orientación. Mezclas de conjugados pueden incorporarse en liposomas para el uso en esta invención.

Los lípidos con carga eléctrica negativa que se describen posteriormente pueden incorporarse en formulaciones liposómicas que encapsulan metales para incrementar la longevidad en circulación del vehículo. Estos lípidos pueden emplearse en lugar de los conjugados polímero hidrófilo-

lípidos como agentes estabilizantes de superficies. Realizaciones de esta invención pueden hacer uso de liposomas libres de colesterol que contienen tales lípidos con carga eléctrica negativa para evitar la agregación, incrementando de ese modo el tiempo de permanencia en sangre del vehículo. Tales realizaciones se cargan idealmente después de la retirada rigurosa de iones metálicos de la superficie del liposoma y la solución externa de los liposomas.

El término "lípidos con carga eléctrica negativa" se refiere a un lípido formador de vesículas que tiene una o más cargas eléctricas negativas a pH fisiológico, incluyendo fosfolípidos y esfingolípidos. Los lípidos con carga eléctrica negativa pueden incorporarse en un liposoma de esta invención en 5 a 95% en moles, más preferiblemente en 10 a 50% en moles y lo más preferiblemente en 15 a 30% en moles.

Preferiblemente, un lípido que tiene carga eléctrica negativa a pH fisiológico para usar en esta invención comprenderá un "resto no zwitteriónico", que se refiere a un resto que no tiene cargas eléctricas opuestas a pH fisiológico. Tales lípidos imparten al liposoma propiedades de circulación deseables para usos in vivo. La carga eléctrica negativa neta sobre el lípido puede surgir solamente de la presencia de la carga eléctrica negativa sobre el lípido (p. ej. de un grupo fosfato) o, cuando el lípido tiene más de una carga eléctrica, la carga eléctrica negativa adicional puede deberse a la presencia de un resto no zwitteriónico con carga eléctrica negativa. Preferiblemente, sin embargo, la carga eléctrica negativa surge solamente del componente lipídico, en cuyo caso el resto no zwitteriónico es un grupo neutro. Preferiblemente, el resto no zwitteriónico comprende 2 a 6 átomos de carbono.

Restos no zwitteriónicos adecuados contienen grupos funcionales ávidos de electrones que imparten al grupo de cabeza características hidrófilas. Tales grupos funcionales pueden seleccionarse del grupo que consiste en alcoholes, ácidos, cetonas, ésteres, éteres, amidas y aldehídos. Pueden utilizarse restos no zwitteriónicos de las siguientes fórmulas:

Alcoholes

P-R o POR o $\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}$ donde R es $-(\text{CH}_2)_v(\text{CH})_w(\text{C})_x(\text{OH})_y(\text{CH}_3)_z$
 en donde el número de carbonos $(v+w+x+z)$ es 2-6, lo más
 preferiblemente 3-5
 5 donde el número de grupos OH es 1-3 ($y = 1-3$), p. ej.
 DPPG

Cetonas

P-R o POR o $\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}$ donde R es $-(\text{CH}_2)_v(\text{C})_x(\text{CO})_y(\text{CH}_3)_z$
 10 donde el número de carbonos $(v+x+y+z)$ es 2-6, lo más
 preferiblemente 3-5
 donde el número de grupos cetona es 1-2 ($y = 1-2$), p.
 ej. N-butiril-DPPE, N-valeril-DPPE

15 Ácidos Carboxílicos

P-R o POR o $\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}$ donde R es $-(\text{CH}_2)_u(\text{CH})_v(\text{C})_x(\text{COOH})_y(\text{CH}_3)_z$
 donde el número de carbonos $(u+v+x+y+z)$ es 2-6, lo más
 preferiblemente 3-5
 donde el número de grupos ácido carboxílico es 1-2 ($y =$
 20 1-2)

Ésteres

P-R o POR o $\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}$ donde R es $-(\text{CH}_2)_v(\text{C})_x(\text{COO})_y(\text{CH}_3)_z$
 donde el número de carbonos $(v+x+y+z)$ es 2-6, lo más
 25 preferiblemente 3-5
 donde el número de grupos éster es 1-2 ($y = 1-2$)

Éteres

P-R o POR o $\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}$ donde R es $-(\text{CH}_2)_v(\text{C})_x(\text{O})_y(\text{CH}_3)_z$
 30 donde el número de carbonos $(v+x+z)$ es 2-6, lo más
 preferiblemente 3-5
 donde el número de grupos éter es 1-2 ($y = 1-2$)

Aminas

35 Aminas Primarias:
 P-R o POR o $\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}$ donde R es $-(\text{CH}_2)_v(\text{C})_w(\text{CH})_x(\text{NH}_2)_y(\text{CH}_3)_z$
 - donde el número de carbonos $(v+w+x+z)$ es 2-6, lo más
 preferiblemente 3-5

- 23 -

- donde el número de grupos amino es 1-2 ($y = 1-2$)

Aminas Secundarias:

P-R o POR o $\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}$ donde R es $-(\text{CH}_2)_v(\text{C})_w(\text{CH})_x(\text{NH}_x)_y(\text{CH}_3)_z$

- donde el número de carbonos ($v+w+x+z$) es 2-6, lo más
5 preferiblemente 3-5

- donde el número de grupos amina es 1-2 ($y = 1-2$)

Aminas Terciarias:

P-R o POR o $\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}$ donde R es $-(\text{CH}_2)_v(\text{CH})_w(\text{C})_x(\text{N})_y(\text{CH}_3)_z$

- donde el número de carbonos ($v+w+x+z$) es 2-6, lo más
10 preferiblemente 3-5

- donde el número de grupos amina es 1 ($y = 1$)

El resto no zwitteriónico también puede estar
comprendido por combinaciones de grupos funcionales; por
ejemplo un compuesto de fórmula:

15

Ácidos Carboxílicos y Cetonas

P-R o POR o $\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}$ donde R es
 $-(\text{CH}_2)_u(\text{CH})_v(\text{C})_w(\text{COOH})_x(\text{CO})_y(\text{CH}_3)_z$

donde el número de carbonos ($u+v+w+x+y+z$) es 2-6, lo más
20 preferiblemente 3-5

donde el número de grupos ácido carboxílico es 1-2 ($x =$
1-2)

donde el número de grupos cetona es 1-2 ($y = 1-2$), p. ej.
N-succinil-DPPE, N-glutaril-DPPE

25 P-R o POR o $\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}$ donde R es
 $-(\text{CH}_2)_s(\text{CH})_t(\text{C})_u(\text{COOH})_v(\text{CO})_x(\text{OH})_y(\text{CH}_3)_z$

Ácidos Carboxílicos, Cetonas y Alcoholes

donde el número de carbonos ($s+t+u+v+x+z$) es 2-6, lo más
30 preferiblemente 3-5

donde el número de grupos ácido carboxílico es 1-2 ($v =$
1-2)

donde el número grupos cetona es 1-2 ($x = 1-2$)

donde el número de grupos hidroxilo es 1-2 ($y = 1-2$), p.
35 ej. N-tartaril-DPPE

Estructuras Anulares

P-R o POR o $\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{NHR}$ donde R es un anillo de 5 ó 6 miembros

que contiene 1-5 o 1-6 grupos alcohol (ciclitóles), respectivamente (p. ej. fosfatidilinositol).

Carbohidratos

5 Monosacáridos que pueden usarse en la práctica de esta invención incluyen arabinosa, fucosa, galactosa, glucosa, lixosa, ribosa y xilosa. Disacáridos incluyen sacarosa, lactosa, trehalosa, celobiosa, gentiobiosa y maltosa. Con el objeto de prolongar la vida en circulación del liposoma, se
10 prefieren monosacáridos y disacáridos que no se unan a receptores celulares (p. ej. manosa).

En caso de que el resto no zwitteriónico sea neutro, el grupo de cabeza consiste en grupos que son neutros a pH fisiológico, incluyendo alcoholes, cetonas, ésteres, éteres,
15 amidas y aldehídos.

En realizaciones preferidas de la invención, el resto no zwitteriónico es un alcohol de cadena corta, conteniendo un alcohol preferido dos o más grupos hidroxilo. El alcohol puede ser un poliol de cadena lineal del cual es un ejemplo
20 el glicerol. El glicerol puede constituir el grupo de cabeza de un fosfoesfingolípido o un fosfolípido a través del enlace de uno de los grupos hidroxilo al grupo fosfato del lípido. Lo más preferiblemente, el glicerol está ligado al fosfato a través de un grupo hidroxilo terminal de la molécula de
25 glicerol, denominándose la molécula resultante fosfatidilglicerol (PG). Preferiblemente, las cadenas de ácido graso del fosfatidilglicerol se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en caproílo (6:0), octanoílo (8:0), caprílo (10:0), lauroílo
30 (12:0), miristoílo (14:0), palmitoílo (16:0), estearoílo (18:0), araquidoílo (20:0), behenoílo (22:0), lingnoceroílo (24:0) y fitanoílo, incluyendo las versiones insaturadas de estas cadenas de ácido graso en las configuraciones cis o trans, tales como oleoílo (18:1), linoleoílo (18:2),
35 araquidonoílo (20:4) y docosahexaenoílo (22:6). Se prefieren fosfolípidos que tienen dos cadenas acíclicas de 14 a 18 átomos de carbono.

En otra realización preferida de la invención, el resto

no zwitteriónico es una estructura anular. Lo más preferiblemente, la estructura anular es un ciclitol, que es un cicloalcano que contiene un grupo hidroxilo en cada uno de tres o más átomos de anillo. Tales compuestos pueden derivarse con diversos grupos para impartir a la molécula una solubilidad en agua deseada. Preferiblemente, el ciclitol es un inositol ligado a un fosfolípido a través del grupo fosfato, siendo el compuesto resultante fosfatidilinositol (PI). Preferiblemente, las cadenas de ácido graso del fosfatidilinositol se seleccionan independientemente entre sí del grupo que consiste en caproílo (6:0), octanoílo (8:0), caprílo (10:0), lauroílo (12:0), miristoílo (14:0), palmitoílo (16:0), estearoílo (18:0), araquidoílo (20:0), behenoílo (22:0), lingnoceroílo (24:0) y fitanoílo, incluyendo las versiones insaturadas de estas cadenas de ácido graso en las configuraciones cis o trans, tales como oleoílo (18:1), linoleoílo (18:2), araquidonoílo (20:4) y docosaheptaenoílo (22:6). Se prefieren fosfatidilinositoides que tienen dos cadenas acíclicas de 14 a 18 átomos de carbono.

Los lípidos con carga eléctrica negativa pueden obtenerse de fuentes naturales o pueden sintetizarse químicamente. Métodos para ligar covalentemente compuestos al grupo de cabeza de un lípido son bien conocidos en la especialidad e implican generalmente hacer reaccionar grupos funcionales de la porción terminal del grupo de cabeza de lípido con grupos funcionales del resto que ha de ligarse. Lípidos adecuados para la ligación química de un resto hidrófilo incluyen lípidos que tienen un grupo de cabeza polar que termina con un grupo funcional reactivo tal como una amina o un ácido carboxílico. Un ejemplo de un lípido particularmente adecuado es la fosfatidiletanolamina, ya que contiene un grupo amino reactivo. Métodos para preparar derivados de fosfatidiletanolamina se han descrito en Ahl, P., et ál. (1997) Biochimica et Biophysica Acta 1329: 370-382.

Ejemplos de lípidos con carga eléctrica negativa obtenidos de fuentes naturales incluyen fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol obtenidos de fuentes de huevo y plantas, respectivamente.

Encapsulación de agentes activos y metales en liposomas

Esta invención proporciona un método para cargar un agente en un liposoma que comprende un metal de transición encapsulado. Dentro de esta memoria descriptiva, el término "agente" se refiere a sustancias que son capaces de ser encapsuladas en liposomas de acuerdo con esta invención. Preferiblemente, tal agente será un "agente terapéutico" capaz de ejercer un efecto sobre un objetivo, in vitro o in vivo. Agentes activos adecuados incluyen, por ejemplo, profármacos, agentes diagnósticos, agentes terapéuticos, agentes farmacéuticos, fármacos, moléculas orgánicas sintéticas, proteínas, péptidos, vitaminas, esteroides y análogos de esteroides. El agente, al menos cuando no está complejoado con un metal de transición, debe ser permeable a través de una membrana liposomal para alcanzar la carga.

Metales de transición descritos en la presente memoria incluyen los elementos de los Grupos 1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 7B y 8B (grupos 3-12). Metales preferidos incluyen los seleccionados del grupo que consiste en Fe, Co, Ni, Cu, Zn, V, Ti, Cr, Rh, Ru, Mo, Mn y Pd. Más preferiblemente, el metal es Fe, Co, Ni, Cu, Mn o Zn. Aún más preferiblemente, el metal es Zn, Mn, Co o Cu. Aún más preferiblemente, el metal es Zn, Co o Cu.

Los iones de metales de transición pueden encapsularse en liposomas de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la especialidad. Esto incluye las técnicas de encapsulación pasiva conocidas en la especialidad y descritas posteriormente.

Preferiblemente, los liposomas se forman en una solución que comprende un metal de transición en una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 1 M, preferiblemente de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 800 mM y más preferiblemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 350 mM.

Diversas sales de metales pueden emplearse en la práctica de esta invención. Preferiblemente, la sal es farmacéuticamente aceptable y soluble en un disolvente acuoso. Sales preferidas pueden seleccionarse del grupo que

consiste en cloruros, sulfatos, tartratos, citratos, fosfatos, nitratos, carbonatos, acetatos, glutamatos, gluconatos, glicinatos, histidinatos, lisinatos y similares.

Preferiblemente, un agente terapéutico que ha de
5 encapsularse en un liposoma de esta invención es uno que es capaz de coordinarse con un metal encapsulado en el liposoma.

Agentes que son capaces de coordinarse con un metal de transición comprenden típicamente sitios de coordinación tales como aminas, grupos carbonilo, éteres, cetonas, grupos
10 acilo, acetilenos, olefinas, tioles, hidroxilo, haluros u otros grupos adecuados capaces de donar electrones al metal de transición formando de ese modo un complejo con el metal. Ejemplos de agentes que se unen a metales de transición incluyen quinolonas tales como fluoroquinolonas, quinolonas
15 tales como ácido nalidíxico, antraciclinas tales como doxorubicina, daunorubicina idarrubicina y epirubicina, aminoglicósidos tales como kanamicina y otros antibióticos tales como bleomicina, mitomicina C y tetraciclina y mostazas nitrogenadas tales como ciclofosfamida, tiosemicarbazonas,
20 indometacina y nitroprusiato, camptotecinas tales como topotecán, irinotecán, lurtotecán, 9-aminocamptotecina, 9-nitrocamptotecina y 10-hidroxycamptotecina y podofilotoxinas tales como etopósido. Los agentes usados en esta invención pueden ser capaces de donar electrones de diferentes átomos
25 del agente y a diferentes sitios de la estructura geométrica del complejo. Tales agentes capaces de donar más de un par de electrones no enlazante también se conocen como multidentado. Preferiblemente, un agente terapéutico para el uso en esta invención es un agente antineoplástico.

30 Ejemplos no limitativos de agentes activos que se complejan con metales de transición son proporcionados en la Tabla I.

TABLA I
EJEMPLOS DE AGENTES ACTIVOS BASADOS EN METALES

METAL (ES)	AGENTE (S)	REFERENCIA
Cu	etopósido	Tawa et ál. (1997) Biol. Pharm. Bull. 20: 1002-1005
Fe (III)	dexrrazoxano, losoxantrona, piroxantrona	Hasinoff et ál. (1999) Journal of Inorganic Biochemistry 77: 257-259
Zn, Cu(II), Fe(III), Co(III)	bleomicina	Wenbao et ál (2001) Biochemistry 40: 7559-7568
Fe(III)	antraciclinas	Fiatlo et ál. (1999) Journal of Inorganic Biochemistry 75: 105-115
Bi(III)	quinolonas	Turel et ál. (1997) Journal of Inorganic Biochemistry 66: 241-245
Cu(II)	L-lisina L-arginina	Chikira et ál. (1997) Journal of Inorganic Biochemistry 66: 131-139
Cu(II), Ni(II), Zn(II), Mo(VI)	desfemoxamina B	Farkas et ál. (1997) Journal of Inorganic Biochemistry 65: 281-286
Cu(II)	cinamilo derivado de rafamicina	Bontchev et ál, (1997) Journal of Inorganic Biochemistry 65: 175
Fe(III)	adriamicina	Capolongo et ál. (1997) Journal of Inorganic Biochemistry 65: 115-122
Cu(II), Ni(II)	cinoxacina	Ruiz et ál. (1997) Journal of Inorganic Biochemistry 65: 87-96

Métodos para determinar si se produce coordinación entre

un agente y un metal de transición incluyen técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la especialidad. Técnicas preferidas implican medir los espectros de absorción o usar NMR según se describe por
5 Greenaway y Dabrowiak (J. Inorg. Biochem. (1982) 16(2): 91). Si se desea, un agente activo puede probarse antes de la encapsulación para determinar si se produce coordinación y el pH óptimo para la complejación.

Una técnica preferida para preparar liposomas con un
10 metal encapsulado implica combinar en primer lugar lípido en cloroformo para dar una relación molar deseada. Un marcador lipídico puede añadirse opcionalmente a la preparación lipídica. La mezcla resultante se seca bajo una corriente de nitrógeno gaseoso y se pone en una bomba de vacío hasta que
15 el disolvente se retira. Subsiguientemente, las muestras se hidratan en una solución que comprende un metal de transición (que puede comprender más de un metal, por ejemplo Cu y Mn, o un metal, pero diferentes sales del metal). La mezcla se hace pasar a continuación a través de un aparato de extrusión para
20 obtener una preparación de liposomas de un tamaño definido. El tamaño promedio de los liposomas puede determinarse mediante difusión cuasielástica de luz usando un dimensionador de partículas submicrométricas NICOMP™ 370 a una longitud de onda de 632,8 nm. Subsiguientemente a la
25 extrusión, la solución externa puede tratarse o reemplazarse a fin de retirar iones metálicos de la solución externa y la superficie de los liposomas.

Esta invención hace uso preferiblemente de liposomas con un medio encapsulado o "interno" que comprende un metal de
30 transición en una "solución compatible con el metal". El uso de una solución compatible con el metal evita la precipitación del metal o minimiza la precipitación hasta un punto suficiente para permitir el uso farmacéutico de los liposomas.

35 Una solución compatible con el metal se define como una que consiste en un metal en solución que no hace que se produzca una precipitación inaceptable durante al menos el tiempo requerido para formular los liposomas.

Preferiblemente, la solución de metal debe ser transparente y soluble, libre de agregación, precipitación o floculación durante al menos aproximadamente 4 horas. A modo de ejemplo, una solución 300 mM de MnSO_4 en tampón de HEPES de pH 7,4 como la descrita en Cheung, et ál. [anteriormente] no es una solución compatible con el metal ya que produce un precipitado pardo obvio de Mn(OH)_2 que comprende aproximadamente 6-7% molar del manganeso añadido a la solución.

Se conocen en la especialidad diversos métodos, y pueden usarse para determinar si la solución de metal está formando un precipitado, tales como centrifugación de la solución y una evaluación de si se forma una pella o una observación de turbidez en la solución. La absorbancia de la solución también puede verificarse mediante espectroscopía (p. ej. incremento en la absorbancia a 690 nm), donde un incremento sustancial en la absorbancia es indicativo de inestabilidad de la solución y precipitación. El método más simple es filtrar la solución y buscar la presencia de un precipitado sobre el filtro. Por ejemplo, una muestra de 50 ml puede hacerse pasar a través de papel de filtro Whatman(tm) N° 2 y el filtro observarse con respecto a un sedimento visible.

Un método preferido para determinar si una solución es compatible con metal es verificar la absorbancia a 690 nm. La adición de metal no debe dar como resultado un incremento de más de aproximadamente 0,1 unidades de absorción y preferiblemente no más de aproximadamente 0,05 unidades.

Un método preferido alternativo para determinar si una solución de metal es compatible con metal es mediante centrifugación (p. ej., una muestra de 100 ml a 1000 rpm durante 10 minutos) para recoger cualquier precipitado, medir la cantidad de precipitado recogida y determinar la proporción del metal añadida a la solución original presente en el precipitado. La cantidad de metal en el precipitado no debe superar aproximadamente 1% molar de la cantidad de metal añadida a la solución original.

Soluciones compatibles con metales preferidas son aquellas se también son farmacéuticamente aceptables, tales

como las que comprenden trietanolamina (TEA), cloruro sódico, acetato sódico/ácido acético, citrato sódico/ácido cítrico o azúcares tales como sacarosa, dextrosa y lactosa. Las soluciones basadas en fosfato y carbonato (aunque farmacéuticamente aceptables) tendrán un uso limitado, excepto a pH fuera de intervalos fisiológicos normales, debido a la probabilidad de precipitación del metal. Preferiblemente, la solución compatible con metal está tamponada y tiene un pH en un intervalo fisiológico.

En la práctica de esta invención, puede ser ventajoso que la solución externa de la preparación liposómica se reemplace o se trate para que la solución externa resultante no contenga sustancialmente iones metálicos no complejados antes de la carga de un agente. Para los propósitos de esta memoria descriptiva, "iones metálicos no complejados" incluye iones metálicos libres en la solución externa e iones metálicos unidos a (o asociados de otro modo con) la superficie externa de los liposomas. A la inversa, un ion metálico complejo es uno que ya no es libre de interactuar con el agente terapéutico o la superficie del liposoma debido a que está presente en la solución externa en un complejo con un resto tal como un agente quelante. Así, es preferible que la superficie de los liposomas y la solución externa estén sustancialmente libres de los iones metálicos o, si están presentes iones metálicos, que estén complejados con un agente quelante. Ejemplos de agentes quelantes catiónicos que pueden emplearse incluyen: EDTA y derivados; EGTA y derivados; histidina; Chelex(tm); TPEN y derivados; BAPTA y derivados; bisfosfonato; o-fenantroleno (fenantrolina); citrato; InsP6; Diazo-2; e isocianato de DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético).

La sustitución de la solución externa para retirar iones metálicos puede efectuarse mediante varias otras técnicas, tales como mediante cromatografía de la preparación liposómica a través de una columna de filtración en gel intensiva equilibrada con una segunda solución acuosa tamponada, mediante centrifugación, diálisis intensiva o repetida, intercambio del medio externo, tratamiento de la

solución externa con agentes quelantes o mediante técnicas relacionadas. Un solo intercambio de solución o una ronda de diálisis sin el uso de un agente quelante típicamente es insuficiente para retirar iones metálicos de la superficie de liposomas con carga eléctrica negativa.

La solución externa también es preferiblemente una solución tamponada. Sin embargo, se aprecia que cualquier disolvente adecuado puede utilizarse en la práctica de esta invención. Una solución externa preferida tiene un pH a pH aproximadamente fisiológico y comprende un tampón que tiene un intervalo de tamponación que incluye pH fisiológico. Ejemplos no limitativos de tampones adecuados para la solución externa son HBS, pH 7,4 (NaCl 150 mM, HEPES 20 mM) y SHE, pH 7,4 (sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, EDTA 30 mM).

La captación de un agente puede establecerse mediante la incubación de la mezcla a una temperatura adecuada después de la adición del agente al medio externo. Dependiendo de la composición del liposoma, la temperatura y el pH del medio interno, y la naturaleza química del agente, la captación del agente puede producirse a lo largo de un período de tiempo de minutos u horas. La carga puede llevarse a cabo a temperaturas de, por ejemplo, 20°C a aproximadamente 75°C, preferiblemente de aproximadamente 30°C a aproximadamente 600 C.

La retirada de agente no encapsulado puede llevarse a cabo al hacer pasar una preparación liposómica a través de una columna de filtración en gel equilibrada con una segunda solución acuosa tamponada, o mediante centrifugación, diálisis o técnicas relacionadas. Preferiblemente, la segunda solución es una que es fisiológicamente compatible pero no necesita ser "compatible con metales". Después de la retirada del agente activo no encapsulado, la extensión de la carga de agente puede determinarse mediante la medida de los niveles de fármaco y lípido de acuerdo con técnicas convencionales. Las concentraciones de lípido y fármaco pueden determinarse empleando técnicas tales como conteo por centelleo, ensayos espectrofotométricos, ensayos fluorescentes y cromatografía líquida de alta resolución. La elección del análisis depende

de la naturaleza del fármaco y si los liposomas contienen un marcador lipídico radioetiquetado. Un ejemplo de cuantificación utilizando un marcador radioetiquetado se indica en los Ejemplos de la presente memoria, aunque se
5 apreciará que puede usarse cualquier método adecuado para determinar la extensión de la carga.

Antes de la carga de un agente en un liposoma usando un metal de transición encapsulado, el liposoma puede coencapsularse pasivamente con un agente y un metal. Usando
10 este sistema, dos o más agentes pueden incorporarse en el liposoma al combinar métodos de carga pasivos y activos.

Subsiguientemente a la carga de un agente en un liposoma, un ionóforo puede incubarse con la mezcla de modo que se produzca la inserción del ionóforo en la bicapa. El
15 término "ionóforo" se refiere a un compuesto que forma un complejo con un ion metálico y ayuda al ion a cruzar la bicapa lipídica mientras que ayuda además al transporte de H^+ en la dirección contraria. Ejemplos de ionóforos adecuados para la presente invención incluyen nigericina, monensina,
20 dianemicina, A23187, 4-BrA23187, ionomicina y X-537A. Los ionóforos pueden ser específicos para iones metálicos monovalentes o divalentes. Ejemplos de ionóforos específicos para iones metálicos monovalentes incluyen nigericina, monensina y dianemicina. La captación del ionóforo se
25 establece mediante la adición del ionóforo a la mezcla y la incubación a una temperatura adecuada para la incorporación del ionóforo a la bicapa liposomal. La cantidad de ionóforo usada dependerá típicamente de la naturaleza y el tipo de la formulación liposómica. La adición del ionóforo al liposoma
30 después de la carga del agente puede llevarse a cabo para imponer subsiguientemente un gradiente de pH a través de la bicapa liposomal para alterar las propiedades de retención del agente en el liposoma o para proteger a agentes que son afectados por ambientes neutros o alcalinos tales como
35 topotecán e irinotecán.

Soluciones compatibles con metales preferidas pueden incluir componentes tales como tampones que pueden utilizarse entre pH 6,0 y 8,5. Preferiblemente, el tampón no precipita

sustancialmente a lo largo de un período de tiempo de dos días a 4°C con un ion metálico encapsulado a pH 6,0 a 8,0 y más preferiblemente pH 6,5 a 7,5. Puede probarse la capacidad de un tampón para evitar la precipitación al inspeccionar visualmente la aparición de turbidez en la solución, que es indicativa de la formación de un precipitado. Un ejemplo de un método para determinar si un tampón es compatible con un metal de transición particular se esboza en el Ejemplo 3. Después de la encapsulación de un metal de transición en una solución compatible con el metal, un agente puede añadirse al medio externo de modo que el agente se encapsule en el liposoma. Los liposomas que encapsulan un metal de transición y una solución compatible con el metal pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la especialidad incluyendo las técnicas descritas anteriormente. Sin embargo, se aprecia que puede utilizarse cualquier metal en este aspecto. Preferiblemente, el liposoma con el agente o los agentes encapsulados tiene un pH extraliposomal que es sustancialmente similar al pH intraliposomal. Lo más preferiblemente, el pH extraliposomal e intraliposomal es aproximadamente pH 6,0 a pH 8,0, lo más preferiblemente, está entre aproximadamente pH 6,5 y pH 7,5.

También se describe en la presente memoria un método para diseñar liposomas, comprendiendo dicho método seleccionar un ion metálico para la encapsulación en un liposoma para alcanzar una retención deseada de un agente encapsulado. Se apreciará que cualesquiera liposoma y agente adecuados pueden utilizarse en la práctica de este aspecto. Otras características y condiciones preferidas de este aspecto son como se describen en general anteriormente.

Para determinar la velocidad de liberación de un agente de un liposoma, el liposoma puede administrarse intravenosamente y los niveles en plasma de agente y lípido medirse después de la administración. Por ejemplo, el componente lipídico puede etiquetarse radiactivamente y el plasma someterse a conteo por centelleo de líquido. La cantidad de fármaco puede determinarse mediante ensayos espectrofotométricos, de HPLC u otros. De forma similar, la

prueba con respecto a la retención del agente en el liposoma puede llevarse a cabo in vitro en plasma o un tampón adecuado. A modo de ejemplo, un liposoma que comprende un agente y un metal de transición encapsulados puede probarse in vitro o in vivo con respecto a la retención del agente. Si no se alcanza una retención deseada del agente, un metal diferente puede seleccionarse y probarse con respecto a su capacidad para retener el agente de interés.

10 **Administración de Liposomas**

También se describen en la presente memoria métodos para administrar liposomas a un mamífero y métodos para tratar a un mamífero afectado por o propenso a o que se sospecha que está afectado por un trastorno (p. ej. cáncer). Se entenderá generalmente que los métodos de tratamiento o de administración comprenderán administrar la composición farmacéutica en una dosificación suficiente para mejorar dicho trastorno o sus síntomas.

Para el tratamiento de dolencias humanas, puede esperarse que un médico cualificado determine cómo deben utilizarse las composiciones de la presente invención con respecto a la dosis, el esquema y la ruta de administración usando protocolos establecidos. Tales aplicaciones también pueden utilizar un aumento a escala de la dosis si los agentes activos encapsulados en las composiciones de vehículo de aporte de la presente invención exhiben toxicidad reducida para los tejidos sanos del sujeto.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran parenteralmente, es decir, intraarterialmente, intravenosamente, intraperitonealmente, subcutáneamente o intramuscularmente o a través de un aerosol. Métodos de administración con aerosol incluyen la administración intranasal y pulmonar. Más preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran intravenosamente o intraperitonealmente mediante una inyección o infusión en bolo. Por ejemplo, véanse Rahman et ál., Pat. EE. UU. N° 3.993.754; Sears, Pat. EE. UU. N° 4.145.410; Papahadjopoulos et ál., Pat. EE. UU. N° 4.235.871; Schneider, Pat. EE. UU. N°

4.224.179; Lenk et ál., Pat. EE. UU. N° 4.522.803; y Fountain et ál., Pat. EE. UU. N° 4.588.578. Formulaciones particulares que son adecuadas para este uso se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17^a ed. (1985).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se dan con propósitos de ilustración y no son de ningún modo una limitación del alcance de la invención. A no ser que se especifique otra cosa, el pH se ajustó usando trietanolamina (TEA) y los resultados mostrados en los dibujos son de un solo ejemplo representativo. Los Ejemplos 3, 4, 5, 7 y 11 se proporcionan solo con propósitos comparativos.

15

Métodos para la preparación de liposomas unilamelares grandes

Los lípidos se disolvieron en solución de cloroformo y subsiguientemente se secaron bajo una corriente de nitrógeno gaseoso y se pusieron en una bomba de vacío para retirar el disolvente. A no ser que se especifique otra cosa, se añadieron niveles traza de lípido radiactivo ³H-CHE para cuantificar el lípido durante el procedimiento de formulación. La película lipídica resultante se puso bajo alto vacío durante un mínimo de 2 horas. La película lipídica se hidrató en la solución indicada para formar vesículas multilamelares (MLV). La preparación resultante se extruyó 10 veces a través de filtros de policarbonato apilados con un aparato de extrusión (Lipex Biomembranes, Vancouver, BC) para alcanzar un tamaño medio de los liposomas entre 80 y 150 nm. Todos los lípidos constituyentes de los liposomas se presentan en % en moles.

30

Métodos para la cuantificación de la carga de fármaco

En diversos puntos temporales después del inicio de la carga de fármaco, se retiraron partes alícuotas y se pasaron a través de una columna giratoria Sephadex G-50 para separar fármaco libre de encapsulado. A un volumen especificado de eluyente se añadió Triton X-100 o N-octil-beta-D-

35

glucopiranosido (OGP) para solubilizar los liposomas. Después de la adición de detergente, la mezcla se calentó hasta el punto de turbidez del detergente y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente antes de la medida de la absorbancia o la fluorescencia. Las concentraciones de fármaco se calcularon mediante comparación con una curva estándar. Los niveles de lípidos se midieron mediante conteo por centelleo de líquido.

10

Ejemplo 1La carga con metal puede producirse en ausencia de un gradiente de pH

Se investigó la capacidad para cargar fármaco de liposomas que contienen metal con soluciones interna y externa tamponadas hasta pH 7,4. Estos estudios se realizaron para determinar si la carga basada en metal de fármaco podía producirse independientemente de la presencia de un gradiente de pH. Las técnicas convencionales para cargar activamente fármacos en liposomas a menudo requieren la presencia de un gradiente de pH de transmembrana.

Para determinar si podía producirse la carga con cobre de irinotecán en ausencia de un gradiente de pH usando una formulación libre de colesterol, liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20) que contenían gluconato de cobre (II) se prepararon con un pH externo e interno de 7,4. Películas lipídicas de DSPC/DSPG en una relación molar de 80:20 se prepararon como se describe anteriormente en la sección de métodos. Las películas lipídicas se hidrataron en gluconato de Cu(II) 100 mM ajustado hasta pH 7,4 con trietanolamina (TEA) y se extruyeron a 70°C. Los liposomas se sometieron a intercambio de tampón por sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, EDTA 30 mM (tampón de SHE), pH 7,4, mediante diálisis de flujo tangencial y subsiguientemente se lavaron tres veces en 6 ml de SHE, pH 7,4, para retirar cualquier gluconato de cobre(II) de la solución extraliposomal. Se añadió irinotecán a la preparación liposómica a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1 y se incubaron a 50°C. La extensión de la carga de fármaco se determinó como se describe en los métodos

al medir la absorbancia a 370 nm y los niveles de lípidos se determinaron mediante conteo por centelleo de líquido.

Los resultados representados en la Figura 1A muestran que la carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20) sin gradiente de pH a 50°C era esencialmente completa aproximadamente a los 5 minutos después del comienzo de la carga.

También se investigó la carga de daunorrubicina en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 90:10) que contenían CuSO₄ encapsulado tamponado hasta pH 7,4. Se prepararon películas lipídicas de acuerdo con los métodos, excepto que el DSPG se disolvió en cloroformo/metanol/agua (50:10:1 v/v). Una solución de CuSO₄ 150 mM, histidina 20 mM (ajustada hasta pH 7,4 usando TEA) se empleó como el medio de hidratación y las MLV se extruyeron a 70°C. Los liposomas se sometieron a intercambio por SHE, pH 7,4, usando una columna de diálisis de flujo tangencial manual. Se cargó daunorrubicina a una relación en peso fármaco/lípido de 0,1:1. Se determinó una relación de fármaco a lípido en diversos puntos temporales durante la carga al medir la absorbancia a 480 nm después de la solubilización en detergente para cuantificar la daunorrubicina según se describe; los niveles de lípido se determinaron mediante conteo por centelleo de líquido.

Según se resume en la Figura 1B, la captación de daunorrubicina en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 90:10) en ausencia de un gradiente de pH era 100% en todos los puntos temporales medidos.

La carga con cobre de irinotecán en liposomas que contienen colesterol que no exhiben gradiente de pH se investigó empleando liposomas de DPPC/Col (relación molar 55:45). Los liposomas se prepararon como se describe en los métodos al hidratar las películas lipídicas en una solución de gluconato de cobre(II) 100 mM ajustada hasta pH 7,4 con TEA. Los liposomas se extruyeron a 65°C y el tampón externo de los liposomas se intercambió por SHE, pH 7,4, mediante diálisis de flujo tangencial. Los liposomas se incubaron con irinotecán a una relación en peso de fármaco a lípido de 0,1:1 a 50°C y la extensión de la carga de fármaco se

determinó según se describe al medir la absorbancia a 370 nm después de la solubilización mediante detergente.

La carga de irinotecán en liposomas de DPPC/Col (relación molar 55:45) en ausencia de un gradiente de pH
5 revelaba que se observaba una carga casi completa después de aproximadamente 60 minutos de incubación (Figura 2).

Además de la carga con cobre, también se investigó la carga de fármaco usando liposomas que contienen MnSO_4 en ausencia de un gradiente de pH. Se prepararon liposomas de
10 DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) con una solución de MnSO_4 interna hasta pH 7,4 y una solución externa tamponada hasta pH 7,4 con SHE. Se prepararon películas lipídicas según se describe y se hidrataron en MnSO_4 300 mM tamponado hasta
15 pH 7,4 con imidazol 20 mM (el pH inicial se ajustó hasta 7,4 con HCl concentrado) y la extrusión se llevó a cabo a 70°C. Las muestras se pasaron descendentemente por una columna Sephadex G-50 para intercambiar el tampón exterior por SHE, pH 7,4. Se cargó epirubicina a una relación molar de fármaco a lípido de 0,2:1 y la carga se llevó a cabo a 60°C. La
20 extensión de la carga de fármaco se midió según se describe en los métodos al medir la absorbancia de fármaco a 480 nm.

Los resultados resumidos en la Figura 3 revelan que la carga con manganeso de epirubicina en liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) a 60°C no requiere la
25 presencia de un gradiente de pH ya que la encapsulación eficaz de fármaco se producía en cada punto temporal medido.

Ejemplo 2

Carga con metal de un segundo fármaco en liposomas tamponados
30 que contienen un primer fármaco encapsulado pasivamente

Aunque los ejemplos anteriores describen la carga inducida por metal de un fármaco en liposomas, la técnica puede emplearse para cargar dos o más fármacos en un solo liposoma. Una técnica implica en primer lugar atrapar
35 pasivamente al menos un fármaco junto con un metal durante la preparación del liposoma seguido por la carga activa con metal de otro fármaco. En este ejemplo, los liposomas se prepararon de modo que no hubiera gradiente de pH a través de

la membrana, asegurando así la carga del segundo fármaco mediante el procedimiento de esta invención.

La carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG y DSPC/Col/DSPG, que contienen floxuridina (FUDR) encapsulada pasivamente, se investigó usando diversas condiciones, así como la carga de irinotecán en liposomas que contienen carboplatino y la carga de daunorrubicina en liposomas que contienen cisplatino.

Se prepararon liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 85:15) que contienen FUDR al disolver DSPC en cloroformo y DSPG en cloroformo/metanol/agua (50:10:1 v/v). A continuación, los lípidos se combinaron entre sí en una relación molar 85:15 y se etiquetaron con cantidades traza de ^{14}C -CHE. Las muestras se hidrataron en gluconato de cobre(II) 100 mM, TEA 220 mM, pH 7,4, que contenía 24,62 mg/ml (100 mM) de FUDR con niveles traza de ^3H -FUDR a 70°C. Las MLV resultantes se extruyeron a 70°C, a continuación se sometieron a intercambio de tampón en primer lugar por solución salina y a continuación por SHE, pH 7,4, usando una columna de diálisis de flujo tangencial manual. A continuación, esta muestra se intercambió en sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4, para retirar cualquier EDTA del tampón exterior.

Se añadió irinotecán a la preparación liposómica resultante a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1 a 50°C. Se generó una relación de fármaco a lípido para el eluyente de la columna giratoria usando conteo por centelleo de líquido para determinar las concentraciones de lípido y FUDR, y la absorbancia a 370 nm para determinar las concentraciones de irinotecán. Antes de la medida de la absorbancia, los liposomas se solubilizaron en una solución que contenía Triton X-100. La relación molar inicial de fármaco FUDR a lípido era 0,09:1, y 0,06:1 después de que se produjera la carga de irinotecán.

La Figura 4A muestra que la carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 85:15) libres de colesterol que contienen FUDR y metal encapsulados no requiere la presencia de un gradiente de pH ya que la carga

eficaz del fármaco se producía a lo largo de todo el experimento.

Liposomas de DSPC/Col/DSPG (relación molar 70:10:20) que contenían FUDR y gluconato de cobre(II) se prepararon como se describió anteriormente. Para medir los efectos del tampón externo sobre la carga, la mitad de las LUV resultantes se sometieron a intercambio de tampón por SHE, pH 7,4, y a continuación por HEPES 20 mM, NaCl 150 mM (HBS), pH 7,4, mientras que la otra mitad se intercambió adicionalmente por sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4, usando una columna de diálisis de flujo tangencial manual. Se añadió irinotecán a los liposomas que contienen FUDR, y subsiguientemente se midió, según se describe anteriormente. Las relaciones molares de fármaco FUDR a lípido iniciales eran 0,1:1 y 0,09:1 para muestras que contenían respectivamente HBS (círculos cerrados) o sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM (círculos abiertos) como el tampón externo. Después de la carga de irinotecán, las mismas muestras tenían relaciones de fármaco FUDR/lípido de 0,09:1 y 0,08:1, respectivamente.

Los resultados resumidos en la Figura 4B muestran que el irinotecán se carga eficazmente en liposomas con bajo contenido de colesterol con FUDR encapsulada independientemente del tampón externo empleado. La carga en ausencia de un gradiente de pH apoya adicionalmente que este grado de captación de irinotecán se produce a través de la técnica de carga con metal de esta invención.

Los presentes inventores han mostrado además varios otros fármacos capaces de carga con metal en ausencia de un gradiente de pH en liposomas que contienen fármaco encapsulado pasivamente; ejemplos se detallan como sigue:

La carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20) con carboplatino encapsulado pasivamente se midió usando liposomas preparados como se describió anteriormente, excepto que las películas lipídicas se hidrataron en CuSO₄ 150 mM (ajustado hasta pH 7,4 usando TEA), que contenían 25 mg/ml de carboplatino. Las muestras se extruyeron y los tampones externos se intercambiaron por SHE, pH 7,4, usando una columna de diálisis de flujo tangencial

manual. Se añadió irinotecán 60°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1 y la captación se midió como se describió previamente. Se usó espectrometría de absorción atómica (AA) para determinar las concentraciones de carboplatino y la absorbancia a 370 nm se midió para determinar las concentraciones de irinotecán. La relación en peso de fármaco carboplatino a lípido inicial era 0,030, y 0,025 después de que se produjera la carga de irinotecán.

Según se observa en la gráfica de la Figura 5, el irinotecán se carga hasta un alto grado en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20) que contienen carboplatino y metal en ausencia de un gradiente de pH.

Para medir la carga de daunorrubicina en liposomas que contienen cisplatino encapsulado, se prepararon liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45) como se describió para la Figura 4B, excepto que las películas lipídicas se hidrataron con una solución de cisplatino. Se disolvió cisplatino sólido (40 mg/ml) en CuCl₂ 150 mM, pH 7,4 (pH ajustado con NaOH) con la adición de DMSO al 4% a 80°C añadido a continuación a las películas lipídicas y se dejaron hidratar a 80°C con turbulencia frecuente. Al enfriar, las muestras se centrifugaron sobre una centrífuga de sobremesa para nodulizar cualquier cisplatino no encapsulado, y el sobrenadante se recogió. Los liposomas se aplicaron a continuación a una columna Sephadex G-50 preequilibrada con HBS, pH 7,4, para retirar iones metálicos en exceso del exterior de los liposomas.

Se añadió daunorrubicina a los liposomas a una relación en peso de 0,1:1 y la carga se llevó a cabo a 60°C. Se retiraron partes alícuotas en diversos puntos temporales y se aplicaron a una columna giratoria Sephadex G-50. Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo a 480 nm y se usaron para determinar las concentraciones de daunorrubicina y los niveles de cisplatino se midieron usando AA. La relación de fármaco cisplatino a lípido inicial era 0,044:1.

La Figura 6 muestra que los liposomas de DSPC/Col que contienen cisplatino encapsulado pasivamente cargan eficazmente daunorrubicina en ausencia de un gradiente de pH.

Esto apoya adicionalmente la carga de un segundo agente, en los liposomas, a través de la complejación con una carga de metal.

5

Ejemplo 3El efecto de la composición del tampón sobre la precipitación de ion metálico

Se prepararon soluciones de cobalto, níquel, manganeso, cadmio, zinc y cobre a concentraciones de 150 y 300 mM en histidina 20 mM. Se añadió gota a gota trietanolamina (1,13 g/ml) hasta que la solución resultante estaba a pH 7,4 o hasta que la solución tenía una apariencia turbia (a lo largo de un período de observación de 10 minutos). Típicamente, se añadían menos de 500 µml de 1,13 g/ml de trietanolamina. Subsiguientemente a la adición de trietanolamina, las soluciones se inspeccionaron visualmente para determinar si se había producido la precipitación del metal. Una apariencia turbia de la solución indicaba la presencia de un precipitado, mientras que la transparencia de la solución indicaba falta de precipitación. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Metal	Concentración (mM)	Sulfato	Cloruro	Nitrato
Cobalto	300	sin ppt	sin ppt	-----
	150	sin ppt	sin ppt	-----
Níquel	300	sin ppt	sin ppt	-----
	150	sin ppt	sin ppt	-----
Manganeso	300	sin ppt	ppt	-----
	150	sin ppt	ppt	-----
Cadmio	300	sin ppt	ppt	-----
	150	sin ppt	ppt	-----
Zinc	300	ppt	ppt	-----
	150	ppt	ppt	-----
Cobre	300	sin ppt	sin ppt	sin ppt
	150	sin ppt	sin ppt	-----

ppt representa que se producía la formación de un precipitado después de la adición de trietanolamina en un espacio de tiempo de 10 minutos

5 sin ppt: representa que no se producía la formación de un precipitado después de la adición de trietanolamina para alcanzar un pH de 7,4 y en un espacio de tiempo de 10 minutos.

línea de puntos: no medido

10 Las concentraciones del metal indicado son concentraciones antes de la adición de trietanolamina.

Ejemplo 4

La carga con metal es diferente de la carga basada en citrato

Se comparó la capacidad de la doxorubicina para
 15 acumularse en liposomas de DPPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) de acuerdo con los procedimientos de carga basados en MnSO_4 y citrato. Las películas lipídicas se hidrataron con solución de MnSO_4 300 mM o citrato 300 mM, pH 3,5, y se hicieron pasar a través de un aparato de extrusión a 55°C.
 20 Los liposomas resultantes se pasaron descendentemente por una columna Sephadex G-50 equilibrada con una solución tamponadora de SHE, pH 7,5, para liposomas que contienen MnSO_4 y HBS, pH 7,5, para liposomas que contienen citrato. Después del intercambio de tampón, los liposomas se
 25 combinaron con doxorubicina para dar una relación en peso de fármaco:lípido final de aproximadamente 0,1:1, 0,2:1 ó 0,3:1.

La mezcla resultante se incubó a 37°C durante 80 minutos. La extensión de carga de fármaco se determinó según se describió en los métodos al medir la absorbancia a 480 nm para cuantificar el fármaco; los niveles de lípido se midieron mediante conteo por centelleo de líquido.

Los resultados resumidos en la Figura 7 muestran que se alcanzaban eficacias de carga de doxorrubicina de >95%, >90% y >80% en liposomas libres de colesterol que contenían MnSO₄ (300 mM) cuando las relaciones fármaco/lípido iniciales eran 0,1:1 (panel A), 0,2:1 (panel B) y 0,3:1 (panel C), respectivamente. En contraste, liposomas libres de colesterol cargados con doxorrubicina de acuerdo con el procedimiento de carga de citrato (citrato 300 mM, pH 4,0) con gradiente de pH bajo las mismas condiciones presentaban una reducción sustancial en la eficacia de encapsulación ya que la relación en peso doxorrubicina/lípido se incrementaba desde 0,1 hasta 0,3. El último método podía alcanzar una relación en peso de fármaco a lípido máxima de <0,075. Estos resultados demuestran que los liposomas libres de colesterol pueden cargarse eficazmente con doxorrubicina hasta relaciones de fármaco a lípido tan altas como 0,3:1 (p/p) usando carga con metal mientras que los procedimientos de carga basados en citrato solo pueden alcanzar relaciones de fármaco a lípido máximas de 0,1:1 (p/p). Estos datos muestran que los mecanismos de carga basados en metales son diferentes de los que confían en mantener un gradiente de pH estable. Los puntos de datos representan la relación de fármaco a lípido media y las barras de error representan la desviación estándar.

Ejemplo 5

La carga de metal no tamponado provoca un colapso del gradiente de pH de transmembrana

El efecto de la carga de doxorrubicina sobre el gradiente de pH de transmembrana de liposomas de DMPC/Col se comparó usando técnicas de carga con citrato y manganeso al medir gradientes de pH antes de y subsiguientemente a la carga de fármaco. Películas lipídicas de DMPC/Col (relación

molar 55:45) se hidrataron con tampón de citrato 300 mM, pH 3,5, MnSO_4 300 mM o MnCl_2 300 mM. Las MLV resultantes se sometieron a 5 ciclos de congelación y descongelación (congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 40°C) seguido por extrusión a 40°C.

Para intercambiar las soluciones externas de los liposomas, las muestras se fraccionaron en columnas Sephadex G-50. Para liposomas con citrato encapsulado, el tampón externo se intercambió por HBS y para liposomas con MnSO_4 y MnCl_2 encapsulados, el tampón externo se intercambió por SHE, pH 7,5. Después del intercambio de tampón, se añadió doxorubicina en una relación en peso de 0,2:1 a 60°C. La absorbancia a 480 nm después de la solubilización en detergente se evaluó para cuantificar el fármaco y los niveles de lípido se determinaron mediante conteo por centelleo de líquido.

Los resultados presentados en la Figura 8A muestran que la carga de doxorubicina en liposomas que contienen citrato (cuadrados) y MnSO_4 (círculos) encapsulados era esencialmente completa a los 5 minutos de incubación. La acumulación de doxorubicina empleando MnCl_2 (triángulos) era menos completa en relación con la carga de MnSO_4 y citrato. Los puntos de datos representan las relaciones de fármaco a lípido medias de al menos tres experimentos repetidos y las barras de error indican la desviación estándar.

Los gradientes de pH de transmembrana de las formulaciones antes y después de la carga de doxorubicina se midieron usando $[^{14}\text{C}]$ -metilamina. Brevemente, se añadió $[^{14}\text{C}]$ -metilamina (0,5 Ci/ml) a las soluciones liposómicas preparadas anteriormente. Después de 15 minutos, partes alícuotas de 150 ml se hicieron pasar descendentemente por columnas Sephadex G-50 de 1 ml equilibradas en HBS para retirar la metilamina no encapsulada. Las concentraciones de lípido y metilamina antes y después de la cromatografía en columna se determinaron mediante conteo por centelleo. El gradiente de pH de transmembrana se calculó de acuerdo con la relación:

$$\text{pH} = \log\{[\text{H}^+]_{\text{interior}}/[\text{H}^+]_{\text{exterior}} = \log\{[\text{metilamina}]_{\text{interior}}/[\text{metilamina}]_{\text{exterior}}\}.$$

Según se muestra en la Figura 8B, después del establecimiento del gradiente de pH, pero antes de la carga de doxorubicina, las formulaciones con citrato (columna 1), MnSO_4 (columna 3), MnCl_2 (columna 5) encapsulados exhibían gradientes de pH medidos de 3,4, 1,6 y menos de 0,18, respectivamente. Estos resultados indican que los gradientes de pH de transmembrana son menores cuando se utilizan soluciones de manganeso en relación con el citrato. Después de la adición de doxorubicina a liposomas que contienen citrato encapsulado, el gradiente de pH disminuía desde 3,4 (columna 1) hasta 2,3 (columna 2). Este resultado está de acuerdo con informes previos que demuestran el colapso mediado por doxorubicina del gradiente de pH en estas formulaciones. Después de la carga de doxorubicina, los liposomas que contenían manganeso no exhibían un gradiente de pH medible (columnas 4 y 6) demostrando así que estas formulaciones perdían su gradiente de pH durante la carga de fármaco. Los puntos de datos representan el gradiente de pH medio de tres experimentos separados y las barras de error indican la desviación estándar.

Ejemplo 6

La eficacia de carga depende del ion metálico empleado

La carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) que encapsulan soluciones de sulfato de manganeso o sulfato de cobre se llevó a cabo para comparar la eficacia de carga de los dos metales diferentes.

Las películas lipídicas se hidrataron en una solución bien de MnSO_4 300 mM o bien de CuSO_4 300 mM. Las vesículas multilamelares (MLV) resultantes se extruyeron a 60°C y las LUV se sometieron a intercambio de tampón por SHE, pH 7,4. La carga de fármaco se inició mediante la adición de irinotecán a la solución resultante a una relación en peso de fármaco a lípido de 0,1:1 a 60°C. La extensión de la carga de fármaco se midió según se describió y la absorbancia se midió a 370 nm.

Los resultados de la Figura 9 demuestran que la carga con manganeso de irinotecán era solo 10% completa en el punto temporal de 30 minutos, mientras que la carga de irinotecán en liposomas que contenían cobre daba como resultado más de 95% de carga a los 5 minutos. Estos resultados ilustran que las propiedades de carga de los liposomas dependen mucho de la identidad del ion metálico.

Ejemplo 7

Carga de fármaco en liposomas libres de colesterol usando manganeso, cobalto y níquel encapsulados

La captación de daunorrubicina en liposomas (DSPC/DSPE-PEG2000) libres de colesterol se investigó usando soluciones internas de MnSO_4 , CoCl_2 y NiSO_4 a diversas temperaturas de carga.

Liposomas (DSPC/DSPE-PEG2000, relación molar 95:5) libres de colesterol que encapsulan manganeso se prepararon mediante la hidratación de las películas lipídicas en MnSO_4 300 mM y la extrusión se llevó a cabo a 75°C. Las muestras se intercambiaron por HBS usando una columna de diálisis de flujo tangencial manual. El tampón externo contenía EDTA 1,67 mM para retirar cualquier catión divalente. Se cargó daunorrubicina a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1 y la carga se llevó a cabo a 23°C, 37°C o 60°C. La extensión de la carga de fármaco se midió al solubilizar los liposomas en detergente seguido por medir la absorbancia a 480 nm.

Los resultados de la Figura 10A muestran que la carga de daunorrubicina en liposomas que contienen MnSO_4 de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) es la más eficaz a 60°C, mientras que la carga a 23°C y 37°C se producía en una extensión menor. Pueden alcanzarse relaciones de daunorrubicina a lípido (mol:mol) de 0,07 cuando la temperatura de carga está a 60°C.

Se prepararon liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) que contenían cobalto mediante hidratación de películas lipídicas en CoCl_2 150 mM. Las MLV se extruyeron a 75°C y el tampón exterior se intercambió a continuación al

dializar frente a HBS durante la noche. A continuación, los liposomas se sometieron a intercambio adicionalmente por HBS usando una columna de diálisis de flujo tangencial manual para retirar cualquier CoCl_2 residual. Se cargó
5 daunorrubicina a 23, 37 y 60°C a una relación en peso de fármaco/lípido de 0,1:1. La extensión de la carga de daunorrubicina se determinó al medir la absorbancia a 480 nm después de la solubilización de los liposomas. Los niveles de lípidos se determinaron mediante conteo por centelleo de
10 líquido.

La daunorrubicina se cargó eficazmente en liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) que contenían CoCl_2 a 60°C (véase la Figura 10B). A 60°C, la carga daba como resultado >95% de encapsulación de daunorrubicina a los 5
15 minutos. La carga a 23°C y 37°C era menos eficaz y se requería una incubación de 60 minutos a 37°C para alcanzar 80% de encapsulación de fármaco.

Liposomas que contenía DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) y que encapsulaban NiSO_4 se prepararon como se describió en los ejemplos previos. Las películas lipídicas se hidrataron en NiSO_4 300 mM y el tampón externo de los liposomas se intercambió mediante el paso a través de una columna Sephadex G-50 equilibrada con SHE, pH 7,4. La daunorrubicina se añadió de modo que la relación en peso de
20 fármaco a lípido inicial (antes de la carga) fuera 0,2 a 1 y la carga se llevó a cabo a 60°C. Las eficacias de carga de daunorrubicina se midieron como se describió anteriormente mediante absorción.

Los resultados de la Figura 10C demuestran que la
30 incubación de daunorrubicina con liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 que contienen NiSO_4 a 60°C daba como resultado más de 75% de encapsulación de fármaco a los 5 minutos.

Ejemplo 8

35 Carga de fármaco en liposomas libres de colesterol empleando cobre encapsulado

También se examinó la carga con cobre de epirubicina en liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5).

Liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) que contenían cobre se prepararon según se describió en los ejemplos previos. Las películas lipídicas se hidrataron en CuSO_4 300 mM y la extrusión se llevó a cabo a 70°C. El tampón externo se reemplazó por SHE, pH 7,4, al hacer pasar los liposomas a través de una columna Sephadex G-50 equilibrada con tampón de SHE antes de la carga. Se añadió epirrubicina a los liposomas que contienen cobre a una relación molar de fármaco a lípido de aproximadamente 0,2:1 y la carga se llevó a cabo a 60°C. Los niveles de epirrubicina y lípido se ensayaron mediante espectrometría y conteo por centelleo, respectivamente. Para cuantificar la epirrubicina, la absorbancia se midió a 480 nm después de solubilizar la preparación liposómica con detergente.

La Figura 11 muestra que la carga de epirrubicina en liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) daba como resultado >95% de acumulación de fármaco a los 5 minutos cuando la captación se producía a 60°C.

Ejemplo 9

Carga con metal de liposomas que contienen colesterol

La captación de doxorrubicina, daunorrubicina y topotecán en liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45) se investigó usando liposomas preparados para encapsular cobre y cobalto.

Liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45) que encapsulaban cobalto se prepararon como se describió anteriormente mediante la hidratación de las películas lipídicas en una solución de CoCl_2 300 mM. El tampón externo se intercambió mediante cromatografía en columna por SHE, pH 7,5. La carga se inició mediante la adición de doxorrubicina a una relación molar de fármaco a lípido de aproximadamente 0,1:1. A continuación, los liposomas se incubaron a 60°C para facilitar la carga de fármaco. La extensión de la carga de fármaco se midió según se describió previamente mediante la solubilización de las muestras con detergente seguido por la medida de la absorbancia a 480 nm.

Los resultados de la Figura 12A muestran que a los 10

minutos, >90% del fármaco añadido estaba encapsulado.

Liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45) que
contenían sulfato de cobre se prepararon mediante la
hidratación de una película lipídica en CuSO_4 300 mM. Las MLV
5 resultantes se extruyeron a 70°C y la solución externa se
intercambió por HBS mediante el paso a través de una columna
giratoria Sephadex G-50. Los liposomas sometidos a
intercambio de tampón se cargaron a 60°C con daunorrubicina a
una relación en peso de fármaco a lípido de 0,1:1, 0,2:1 ó
10 0,4:1. Los liposomas se solubilizaron en detergente antes de
determinar los niveles de fármaco al medir la absorbancia a
480 nm.

Los resultados de la Figura 12B indican que la carga de
fármaco en liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45)
15 cargados usando CuSO_4 encapsulado era eficaz con >90% de los
fármacos añadidos encapsulados a los 5 minutos a 60°C.

Liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45) que
encapsulaban CuSO_4 300 mM se prepararon como se describió
para la Figura 12B, excepto que el tampón externo se
20 intercambiaba por SHE, pH 7,4. A continuación, los liposomas
se incubaron con topotecán a una relación en peso de
fármaco/lípido de 0,1:1 a 37°C. La extensión de la carga se
verificó durante 2 horas en los puntos temporales indicados
al cuantificar la absorbancia del fármaco a 380 nm y el
25 lípido mediante conteo por centelleo de líquido. El fármaco
se cuantificó al medir la absorbancia a 380 nm.

La Figura 12C indica que la carga de topotecán en
liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45) era
esencialmente 100% (>95%) completa a los 30 minutos.

30

Ejemplo 10

Carga con metal de un número de diferentes fármacos en liposomas no tamponados que contienen fármaco encapsulado pasivamente

35 La carga de daunorrubicina o irinotecán en diversos
liposomas que contienen un fármaco encapsulado pasivamente se
investigó bajo un número de condiciones.

La captación de daunorrubicina en liposomas que

contenían cisplatino se midió de acuerdo con los siguientes procedimientos. Liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) o DMPC/Col (relación molar 55:45) se prepararon de acuerdo con los materiales y métodos de los ejemplos
5 precedentes. Las películas lipídicas se hidrataron en MnCl_2 150 mM o CuCl_2 150 mM, respectivamente, con 8,5 mg/ml de cisplatino a 80°C. Las MLV se extruyeron a 75°C. El cisplatino precipitado se retiró mediante centrifugación y las muestras se dializaron a continuación frente a HBS
10 durante la noche. Las muestras que contenían CuCl_2 se intercambiaron adicionalmente por HBS usando una columna de diálisis de flujo tangencial manual para retirar cualquier CuCl_2 o cisplatino residual. La daunorrubicina se cargó en liposomas que contenían cisplatino/ MnCl_2 y cisplatino/ CuCl_2 a
15 una relación en peso fármaco/lípido de 0,1:1 a una temperatura de incubación de 60°C. La relación en peso de fármaco cisplatino/lípido inicial era 0,01:1 para ambas composiciones liposómicas. La extensión de la carga de fármaco se midió según se describió previamente mediante la
20 solubilización de las muestras con detergente seguido por la medida de la absorbancia a 480 nm.

Las Figuras 13A y 13B muestran que liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) y DMPC/Col (relación molar 55:45) precargados con cisplatino pueden cargarse con
25 un segundo fármaco (daunorrubicina) cuando se usa una carga activa basada bien en manganeso o bien en cobre, respectivamente. Por otra parte, la encapsulación de daunorrubicina no era tan eficaz usando MnCl_2 en comparación con CuCl_2 .

30 La carga de daunorrubicina o irinotecán en liposomas de DPPC/Col (relación molar 55:45) que contienen bien carboplatino o bien cisplatino atrapados pasivamente, respectivamente, se analizó usando carga con níquel o cobre. Las películas lipídicas se hidrataron en NiSO_4 300 mM o CuCl_2
35 75 mM + CuSO_4 150 mM con 40 mg/ml de carboplatino u 8,5 mg/ml de cisplatino, respectivamente. Las MLV se extruyeron a 70°C. Las muestras que contenían níquel se dializaron durante la noche frente a 1 l de sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4,

mientras que las muestras que contenían cobre se sometieron a intercambio por SHE, pH 7,4, mediante cromatografía en columnas Sepharose que contenían resina CL4B. La daunorrubicina se cargó a 37°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,1:1. El irinotecán se cargó en los liposomas según se describía previamente a 60°C a una relación en peso de fármaco a lípido de 0,1. Los niveles de fármaco y lípido se midieron usando procedimientos descritos previamente.

Los resultados resumidos en las Figuras 13C y 13D ilustran que liposomas de DPPC/Col (relación molar 55:45) preparados con soluciones de iones bien níquel o bien cobre que contienen un fármaco de platino cargan eficazmente un segundo fármaco.

Ejemplo 11

La carga con metal combinada con técnicas de carga mediadas por ionóforos da como resultado la encapsulación de múltiples agentes

Combinar la carga con metal con un mecanismo de carga activa adicional da como resultado la encapsulación eficaz tanto de doxorubicina como de vincristina en un solo liposoma. La carga con metal de doxorubicina seguida por la carga mediada por ionóforo de vincristina se detalla posteriormente.

Liposomas de DSPC/colesterol (relación molar 55:45) se prepararon como se describió en los ejemplos precedentes, excepto que las películas lipídicas se hidrataron en MnSO_4 300 mM y se usó el marcador lipídico 14C-CHE. Las MLV resultantes se extruyeron a 65°C y a continuación se hicieron pasar a través de una columna Sephadex G-50 que se había preequilibrado con sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM y EDTA 15 mM (pH 7,5). Se añadió a continuación doxorubicina en una relación en peso de fármaco a lípido de 0,2:1 y se incubó adicionalmente a 60°C durante 60 minutos.

Después de la carga de doxorubicina, el catión divalente ionóforo A23187 (1 g de ionóforo/mol de lípido) se añadió a los liposomas y la mezcla se incubó a temperatura

ambiente durante 3 minutos para facilitar la incorporación de A23187 en la bicapa. Subsiguientemente, se añadió vincristina a la mezcla y se incubó a 50°C durante 100 minutos. Una pequeña cantidad de vincristina radioetiquetada se añadió a la preparación de fármaco para facilitar la cuantificación del fármaco. La captación de fármaco se realizó a una relación en peso de vincristina a lípido de 0,05:1. La vincristina y el lípido se cuantificaron mediante conteo por centelleo después de la solubilización de los liposomas con detergente. La absorbancia a 480 nm se usó para cuantificar los niveles de doxorubicina.

La Figura 14 muestra que los liposomas precargados con doxorubicina (círculos) a través de la carga con metal presentan una encapsulación casi máxima de carga mediada por ionóforo de vincristina (cuadrados) después de 40 minutos de incubación a 50°C, sin pérdida significativa de doxorubicina durante la encapsulación de vincristina. Los puntos de datos representan relación de fármaco a lípido media de tres experimentos separados y las barras de error indican la desviación estándar.

Ejemplo 12

La carga con metal de dos fármacos en ausencia de ionóforo da como resultado una encapsulación eficaz de los dos agentes

Los ejemplos precedentes han hecho uso de procedimientos de carga bien pasivos o bien mediados por ionóforo en combinación con carga activa con metal para dar como resultado la encapsulación de dos fármacos en liposomas de diversas composiciones. El siguiente ejemplo demuestra que la carga con metal sola puede utilizarse para cargar activamente dos fármacos en un solo liposoma. Se cargaron doxorubicina e irinotecán en liposomas de DSPC/Colesterol como se describió anteriormente.

Liposomas de DSPC/Col (relación molar 55:45) se prepararon según se detalló previamente con CuSO₄ 300 mM encapsulado. Los liposomas extruidos se hicieron pasar a través de una columna Sephadex G-50 que se había preequilibrado con SHE, pH 7,5. En primer lugar, se cargó

irinotecán a una relación molar de fármaco a lípido de 0,2:1 a 60°C hasta aproximadamente 100% de encapsulación. Después de esto, se incubó doxorubicina a 60°C a una relación molar de fármaco a lípido de 0,15:1 con la formulación liposomal que contiene irinotecán para permitir una carga suficiente de doxorubicina. Los niveles de irinotecán se midieron al medir la absorbancia a 370 nm usando una curva estándar preparada en presencia de doxorubicina para dar cuenta de su absorbancia a 370 nm. De forma similar, las concentraciones de doxorubicina se determinaron midiendo la absorbancia a 480 nm usando una curva estándar preparada en presencia de irinotecán para dar cuenta de su absorbancia a 480 nm. Como un control, la captación individual de cada fármaco se midió separadamente en liposomas de la misma composición.

Los resultados resumidos en la Figura 15 ilustran que la doxorubicina y el irinotecán pueden cargarse eficazmente en un solo liposoma usando el procedimiento de carga activa con metal de la invención. Los resultados representan la relación de fármaco a lípido media de tres experimentos separados y las barras de error indican la desviación estándar.

Ejemplo 13

Las velocidades de liberación de fármaco in vivo dependen de la naturaleza del ion metálico

La capacidad de diferentes medios de carga internos para controlar la liberación de daunorrubicina de liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) in vivo se investigó usando citrato 150 mM, pH 4,0, CuSO₄ 300 mM y MnSO₄ 300 mM. Liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 se prepararon según se describió y se extruyeron a 75°C. La solución externa se intercambió por HBS mediante diálisis frente a HBS. Se cargó daunorrubicina a una relación molar de fármaco a lípido de aproximadamente 0,1:1 y la carga se llevó a cabo a 60°C. La carga de daunorrubicina se midió según se describió en los ejemplos precedentes usando EDTA en el tampón de solubilización. A continuación, los liposomas cargados con fármaco se administraron intravenosamente a ratones Balb/c a dosis de lípido de 100 mg/kg y dosis de daunorrubicina de 10

mg/kg. Se recuperó sangre 24 horas después de la administración mediante punción cardíaca (3 ratones por punto temporal) y se recogió en tubos que contenían EDTA. Las concentraciones de lípido en plasma se determinaron mediante
5 conteo por centelleo de líquido. La daunorrubicina se extrajo del plasma como sigue:

Un volumen definido de plasma se ajustó hasta 200 µl con agua destilada seguido por la adición de 600 µl de agua destilada, 100 µl de SDS al 10% y 100 µl de H₂SO₄ 10 mM. La
10 mezcla resultante se mezcló y 2 ml de isopropanol/cloroformo 1:1 se añadieron seguido por turbulencia. Las muestras se congelaron a -20°C durante la noche o -80°C durante 1 hora para promover la agregación de proteínas, se llevaron hasta temperatura ambiente, se sometieron a turbulencia y se
15 centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. La capa orgánica inferior se retiró y se ensayó con respecto a la intensidad de fluorescencia a 500 nm como la longitud de onda de excitación (paso de banda 2,5 nm) y 550 nm como una longitud de onda de emisión (paso de banda 10 nm) y usando una
20 longitud de onda de absorbancia de 480 nm.

La Figura 16 demuestra que liposomas de DSPC/DSPE-PEG2000 (relación molar 95:5) cargados con daunorrubicina empleando citrato encapsulado, pH 4,0, CuSO₄ y MnSO₄ presentan relaciones de fármaco a lípido en plasma diferentes 24 horas
25 después de la administración intravenosa. Estos resultados muestran así que la liberación de fármaco puede controlarse a través de la selección de un ion metálico apropiado. Los resultados representan la relación de fármaco a lípido media de al menos tres experimentos separados y las barras de error
30 indican la desviación estándar.

Ejemplo 14

Carga de liposomas en presencia y ausencia de iones metálicos no complejados

35 Se examinó la carga de fármaco basada en metal en presencia y ausencia de iones metálicos sobre la superficie externa de liposomas que contienen fosfatidilglicerol y los resultados se representan en las Figuras 17 y 18.

Liposomas compuestos por DSPC/DSPG (relación molar 80:20) se prepararon siguiendo los procedimientos que se describían en el Ejemplo 1. Los lípidos DSPC y DSPG se disolvieron en cloroformo y cloroformo/metanol/agua (50:10:1 v/v), respectivamente. A continuación, los lípidos se combinaron en cantidades apropiadas para cada formulación. El disolvente se retiró bajo una corriente estacionaria de N₂ gaseoso mientras se mantenía la temperatura a 70°C y se puso bajo vacío durante 5 minutos. Las películas lipídicas resultantes se redisolvieron en cloroformo para retirar adicionalmente cualquier metanol o agua y a continuación el disolvente se retiró como anteriormente y se secó bajo vacío para retirar cualquier disolvente residual. Las muestras se rehidrataron subsiguientemente en CuSO₄ 150 mM, pH 7,4 (pH ajustado con TEA) y las MLV resultantes se extruyeron a 70°C. Las muestras liposómicas bien se hicieron pasar descendentemente por una columna Chelex-100™ (BioRad) de 15 ml equilibrada con NaCl 150 mM a 0,5 ml/min o bien se sometieron a intercambio de tampón por solución salina y adicionalmente se sometieron a intercambio por sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4, usando flujo tangencial. Subsiguientemente, los liposomas que se hacían pasar a través de la columna Chelex-100™ se sometieron a intercambio por sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4, usando flujo tangencial.

Ambas preparaciones liposómicas se cargaron a continuación a 37, 50 y 60°C con irinotecán a una relación en peso de fármaco a lípido de 0,1:1 según se describió anteriormente. La captación de fármaco se ensayó usando conteo por centelleo de líquido para determinar las concentraciones de lípido y absorbancia a 370 nm para determinar las concentraciones de irinotecán después de la solubilización en detergente.

Los resultados representados en la Figura 17 revelan que la carga de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20) se potenciaba cuando la preparación liposómica se hacía pasar a través de una columna Chelex-100™ para retirar iones metálicos externos. En contraste, los

resultados mostrados en la Figura 18 demuestran que la carga de irinotecán en liposomas sometidos a intercambio por una solución que no contenía un agente quelante se producía a una velocidad reducida. Aunque sin querer limitarse por una teoría particular, la retirada de iones metálicos asociados con la superficie liposomal cargada negativamente al complejar los iones con un agente quelante puede reducir las interacciones metal-fármaco sobre la superficie externa de la membrana incrementando de ese modo la cantidad de fármaco libre que puede cruzar la membrana para quedar atrapado en el compartimento interno del liposoma.

Ejemplo 15

Métodos para la retirada de iones metálicos de la solución externa de liposomas

Se investigó la carga basada en cobre de irinotecán en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20) después de la retirada de Cu^{2+} de la solución externa usando dos técnicas diferentes, ambas basadas en la quelación del metal externo. La primera técnica implicaba la retirada del cobre mediante el paso a través de una columna Chelex™ y la segunda técnica implicaba someter los liposomas a intercambio por un tampón que contiene EDTA.

DSPC/DSPG (relación molar 80:20) se prepararon como en el Ejemplo 14, excepto que las muestras se rehidrataron en gluconato de cobre 150 mM, pH, 7,4 (pH ajustado con TEA). El cobre externo se retiró mediante: i) paso a través de una columna Chelex-100 de 15 ml equilibrada en sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4; o ii) mediante intercambio de tampón por solución salina y a continuación por sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM, EDTA 30 mM, pH 7,4 (tampón de SHE) usando flujo tangencial.

Ambas preparaciones liposómicas se cargaron a continuación a 37, 50 y 60°C con irinotecán a una relación en peso de fármaco a lípido 0,1:1 según se describía en el Ejemplo 14. Partes alícuotas (100 µL) se retiraron en diversos puntos temporales después del comienzo de la carga se aplicaron a una columna giratoria Sephadex G-50. A

continuación, las muestras se solubilizaron en detergente y la cuantificación de fármaco y lípido se realizó como se describió previamente en el Ejemplo 14.

La carga de irinotecán basada en metal después de la retirada del metal externo mediante el paso a través de una columna de quelación (Figura 20) es comparable a la carga después de someter a los liposomas a intercambio por una solución que contiene EDTA (Figura 19). Estos resultados demuestran así que pueden emplearse diversos medios para retirar iones metálicos exteriores de membranas cargadas negativamente sin afectar considerablemente a la capacidad de carga.

Ejemplo 16

Farmacocinética de liposomas que contienen fosfatidilglicerol cocargados con daunorrubicina y carboplatino

La retención de daunorrubicina y carboplatino coencapsulados en liposomas que contenían PG se investigó mediante carga pasiva de carboplatino seguida por carga con metal de daunorrubicina.

La daunorrubicina y el carboplatino se encapsularon en liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20), DSPC/SM/DSPG (relación molar 75:5:20) y DSPC/SM/DSPG (relación molar 70:10:20). Los liposomas se prepararon siguiendo los procedimientos que se describían en los ejemplos precedentes. El DSPG se disolvió en una solución de cloroformo/metanol/agua 50:10:1 (v/v) y el marcador radiactivo ^{14}C -CHE se añadió a la preparación para cuantificar el lípido. Las películas lipídicas se rehidrataron en CuSO_4 150 mM, histidina 20 mM, pH 7,4, que contenía 80 mg/ml de carboplatino (con DMSO al 4% para mejorar la solubilidad del carboplatino). Después de la extrusión, las muestras se centrifugaron para retirar carboplatino no encapsulado. Los liposomas sometidos a intercambio por tampón de SHE se cargaron con ^3H -daunorrubicina. Se les administraron los liposomas a ratones a una dosis de 100 mg/kg de lípido. Se usó conteo por centelleo de líquido para cuantificar la daunorrubicina y el

lípidos. Los niveles de carboplatino en plasma se determinaron mediante absorción atómica.

Los resultados de la Figura 21 indican que los liposomas de DSPC/DSPG (relación molar 80:20), DSPC/SM/DSPG (relación molar 75:5:20) y DSPC/SM/DSPG (relación molar 70:10:20) doblemente cargados presentan niveles de lípidos en plasma potenciados en diversos puntos temporales después de la administración intravenosa, aunque los liposomas preparados con 10% en moles de esfingomielina exhibían niveles de lípidos inferiores en relación con liposomas con 5% en moles de esfingomielina. Los liposomas alteraban eficazmente la farmacocinética del fármaco según se demostraba por los altos niveles de daunorrubicina y carboplatino que permanecían en el compartimento sanguíneo después de la administración (véanse las Figuras 22 y 23). Los liposomas preparados con DSPC/DSPG (relación molar 80:20) y DSPC/SM/DSPG (relación molar 75:5:20) exhibían los niveles de daunorrubicina y carboplatino más altos en relación con los liposomas de DSPC/SM/DSPG (relación molar 70:10:20).

Aunque la invención precedente se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplos con motivos de claridad y comprensión, será fácilmente evidente para los expertos en la especialidad a la luz de las enseñanzas de esta invención que pueden realizarse cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del espíritu y el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las patentes, solicitudes y publicaciones de patente mencionadas en la presente memoria se incorporan en la presente mediante referencia.

REIVINDICACIONES

1. Una composición liposómica que comprende liposomas que contienen una solución interna, comprendiendo la solución interna iones cobre y uno o más agentes terapéuticos encapsulados, agente que es un fármaco o un agente antineoplástico; y en la que:

(a) los liposomas no comprenden un ionóforo;

(b) dicho agente terapéutico se ha cargado en liposomas preformados que contienen dichos iones cobre en dicha solución interna;

(c) la solución interna comprende una solución compatible con iones cobre; y

(d) la composición comprende los liposomas en una solución externa a los liposomas.

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho agente terapéutico es una quinolona, una antraciclina, un antibiótico, una mostaza nitrogenada, una camptotecina o una podofilotoxina.

3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que la solución externa y las superficies externas de los liposomas no contienen sustancialmente iones metálicos no complejados.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la solución externa comprende un agente quelante de metales.

5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la solución externa y la solución interna tienen sustancialmente el mismo pH en el intervalo de 6,0-8,5.

6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que los liposomas contienen menos de 20% de colesterol.

7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que los liposomas comprenden uno o más lípidos que tienen carga eléctrica negativa a pH fisiológico.

8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el uno o más lípidos con carga eléctrica negativa se

seleccionan de fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilinositol (PI).

9. Un método para cargar un agente terapéutico en un liposoma en una composición liposómica, comprendiendo el
5 método:

- i) proporcionar una composición liposómica que comprende un liposoma en una solución externa, conteniendo el liposoma una solución interna que comprende iones cobre encapsulados;
- 10 ii) añadir uno o más agentes terapéuticos a la solución externa; y
- iii) mantener el agente en la solución externa durante un tiempo suficiente para cargar el agente en el liposoma,
- 15 en el que los liposomas no contienen un ionóforo, y la solución interna comprende una solución compatible con iones cobre.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que
20 la solución externa y las superficies externas del liposoma no contienen iones metálicos no complejados; y/o los iones metálicos no complejados se retiran de la solución externa antes de la etapa (ii) mediante cromatografía o mediante intercambio de solución intensivo o
25 diálisis; y/o

la solución interna y la solución externa tienen sustancialmente el mismo pH; y/o

los liposomas contienen menos de 20% en moles de colesterol.

30 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la solución externa comprende un agente quelante de metales.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los liposomas comprenden uno o más lípidos que tienen
35 carga eléctrica negativa a pH fisiológico.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el uno o más lípidos con carga eléctrica negativa se seleccionan de PG y PI.

14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que un segundo agente terapéutico se carga por medio de un gradiente de pH de transmembrana formado después de la etapa (iii).

5 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-14, en el que un segundo agente terapéutico se carga por medio de un gradiente de transmembrana establecido con un ionóforo presentado en el liposoma, en el que el gradiente de transmembrana se
10 establece después de la etapa (iii).

16. Una composición liposómica que comprende liposomas que comprenden uno o más agentes terapéuticos producidos mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-15.

15 17. Un método para seleccionar una composición liposómica que tiene una propiedad de carga o retención preferida para un agente, que comprende:

(a) proporcionar una primera composición liposómica que comprende un liposoma en una solución externa,
20 conteniendo el liposoma una solución interna que comprende uno o más iones de metales de transición;

(b) añadir el agente a la solución externa de la composición de (a) durante un período de tiempo para cargar el agente en el liposoma de la primera
25 composición;

(c) proporcionar una segunda composición liposómica que comprende un liposoma en una solución externa, conteniendo el liposoma una solución interna que comprende uno o más iones de metales de transición;

30 (d) añadir el agente a la solución externa de la composición de (c) durante un período de tiempo para cargar el agente en el liposoma de la segunda composición;

(e) comparar la cantidad de agente cargado o la cantidad de agente retenido a lo largo del tiempo, para el
35 liposoma de la composición resultante en (b) con el liposoma de la composición resultante en (d); y

(f) seleccionar la composición liposómica resultante en

(b) o (d) que tenga una mayor cantidad de agente cargado o retenido;

en el que:

5 (I) las composiciones liposómicas de (a) y (c) difieren en uno o más de: (i) los iones metálicos presentes en la solución interna; (ii) los lípidos en el liposoma de la composición liposómica; y (iii) la concentración de iones metálicos presente en la solución interna;

10 (II) el período de tiempo en (b) es diferente del período de tiempo en (d); o

(III) la carga en (b) se realiza a una temperatura diferente que la carga en (d).

15 18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que una de las composiciones primera y segunda comprende liposomas que contienen colesterol y la otra de dichas composiciones comprende liposomas de bajo contenido de colesterol.

20 19. El método de acuerdo con la reivindicación 17 ó 18, en el que al menos una de las composiciones primera y segunda comprende uno o más iones metálicos seleccionados de Cu, Co y Zn.

25 20. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17-19, en el que la solución interna de cada una de las composiciones primera y segunda comprende una solución compatible con metal.

30 21. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17-20, que comprende la etapa adicional de cargar un agente en liposomas de la composición que se observa que tiene la mayor cantidad de agente cargado o retenido.

1/24

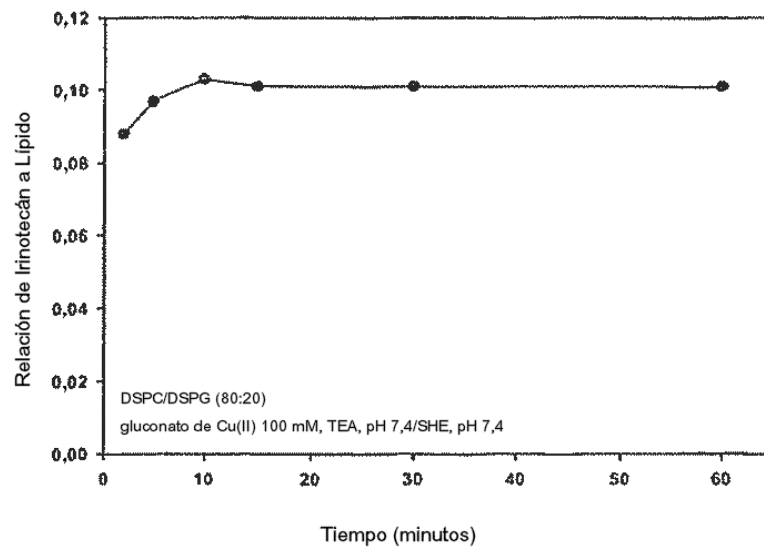


FIGURA 1A

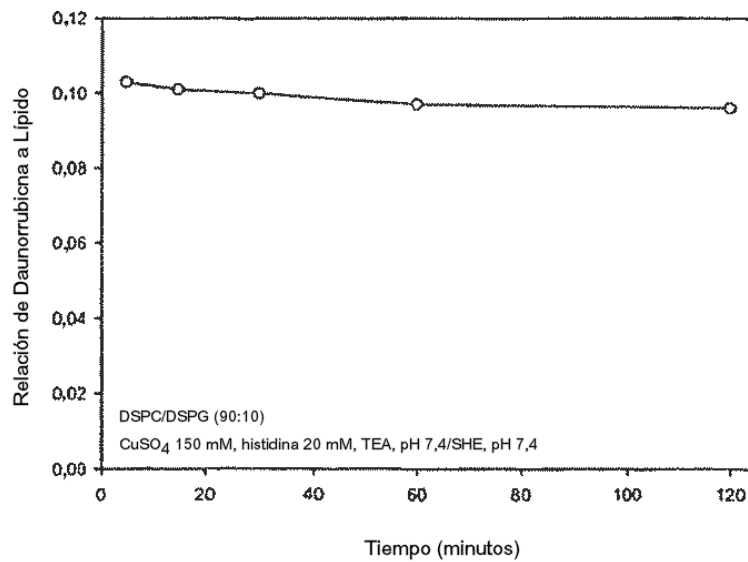


FIGURA 1B

2/24

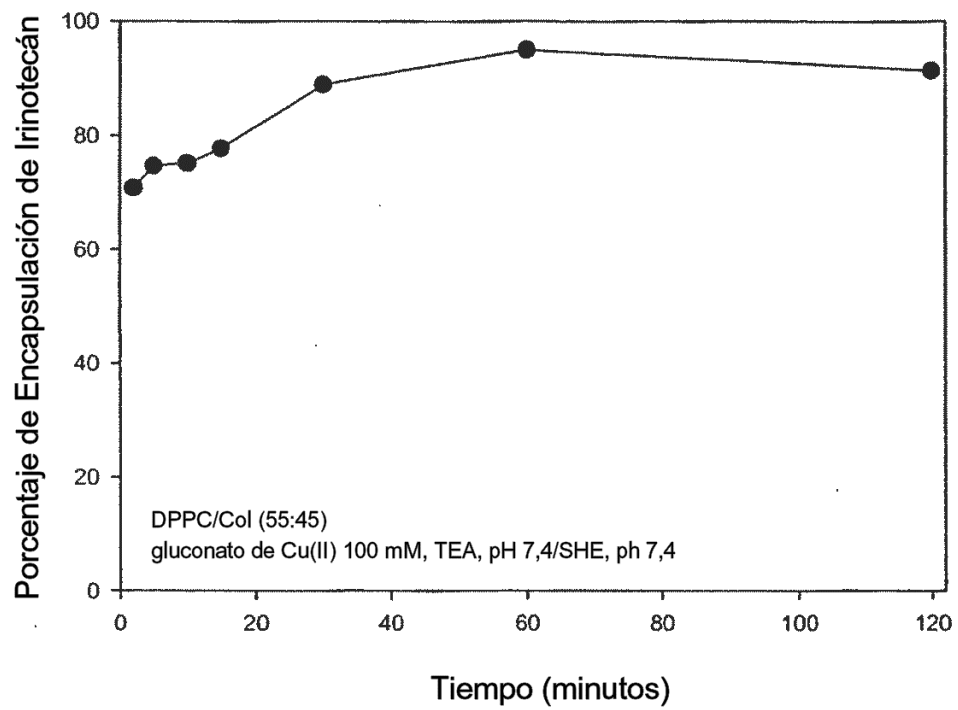


FIGURA 2

3/24

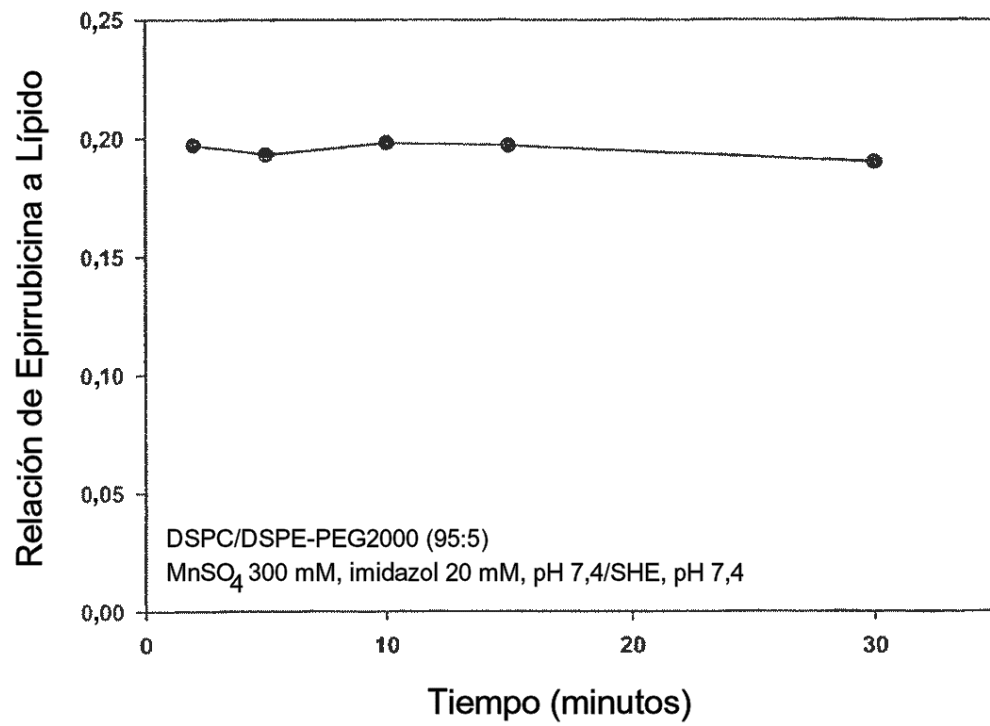


FIGURA 3

4/24

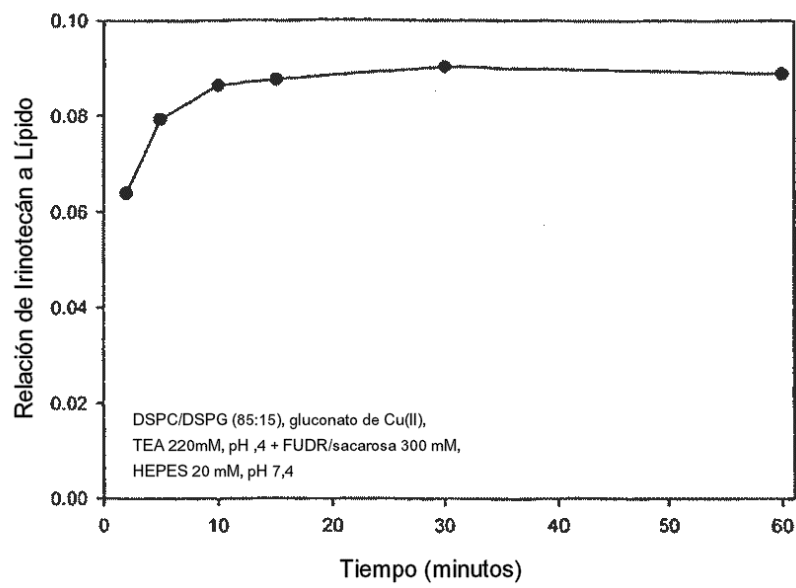


FIGURA 4A

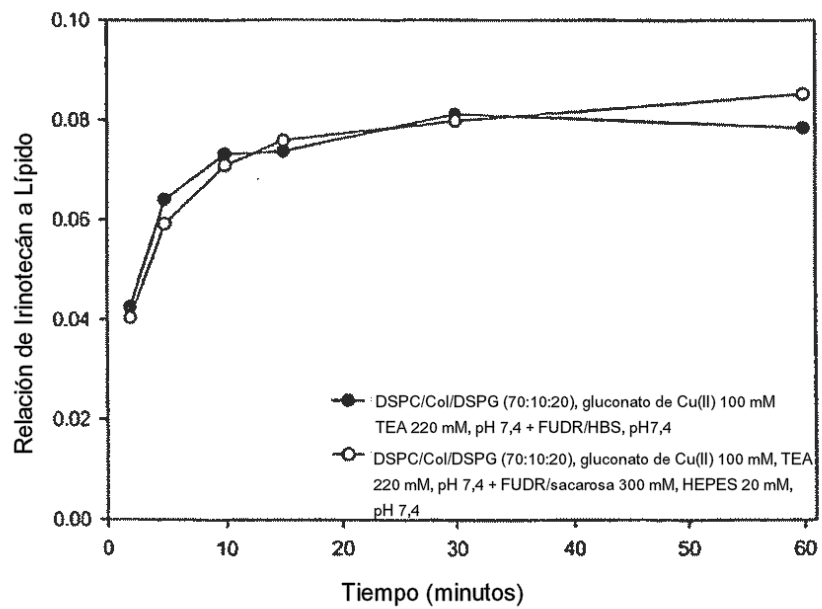


FIGURA 4B

5/24

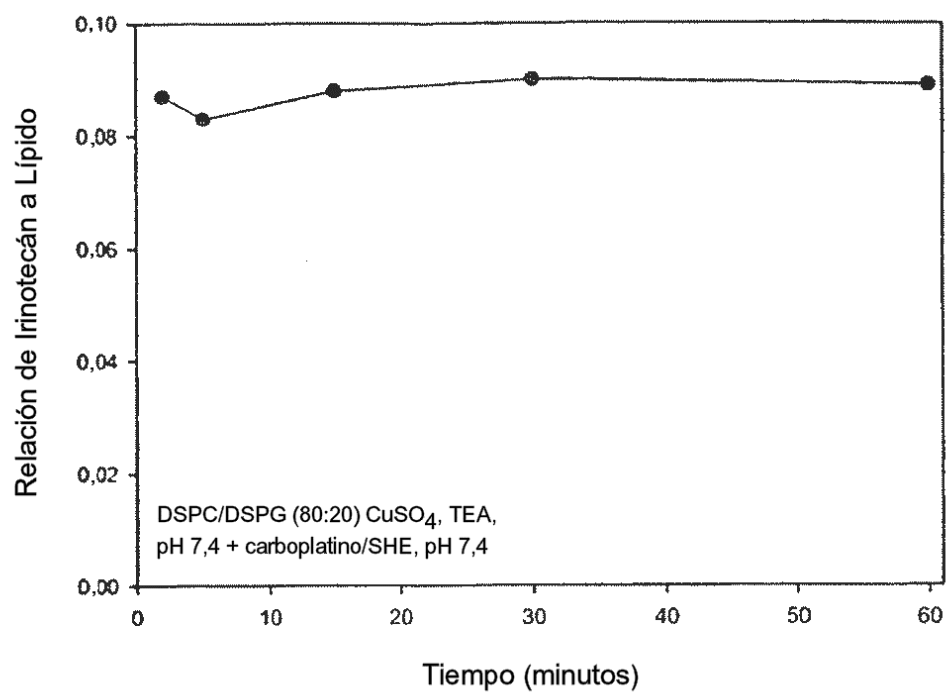


FIGURA 5

6/24

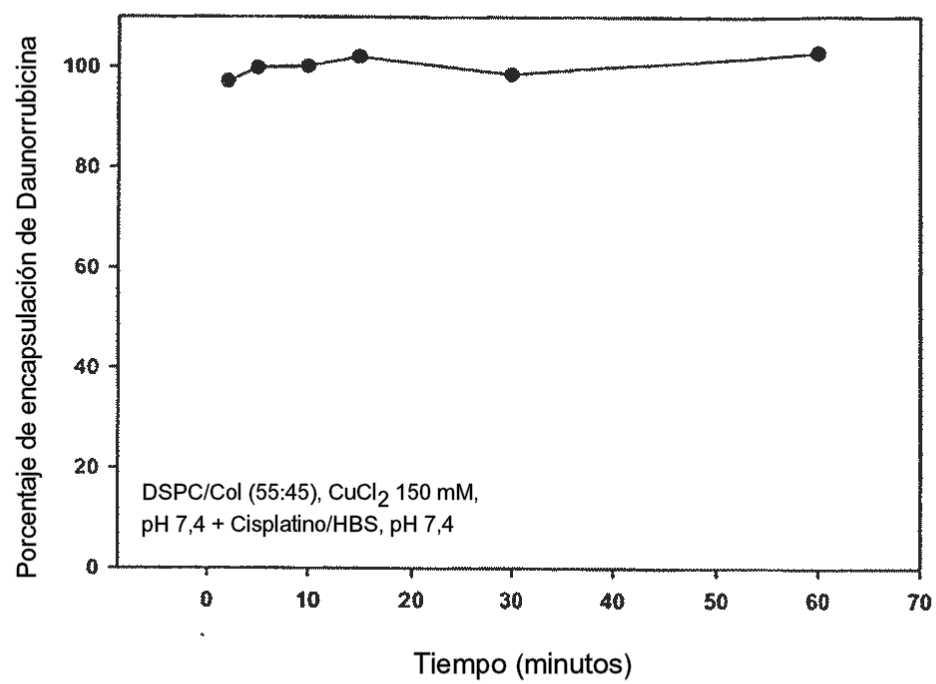


FIGURA 6

7/24

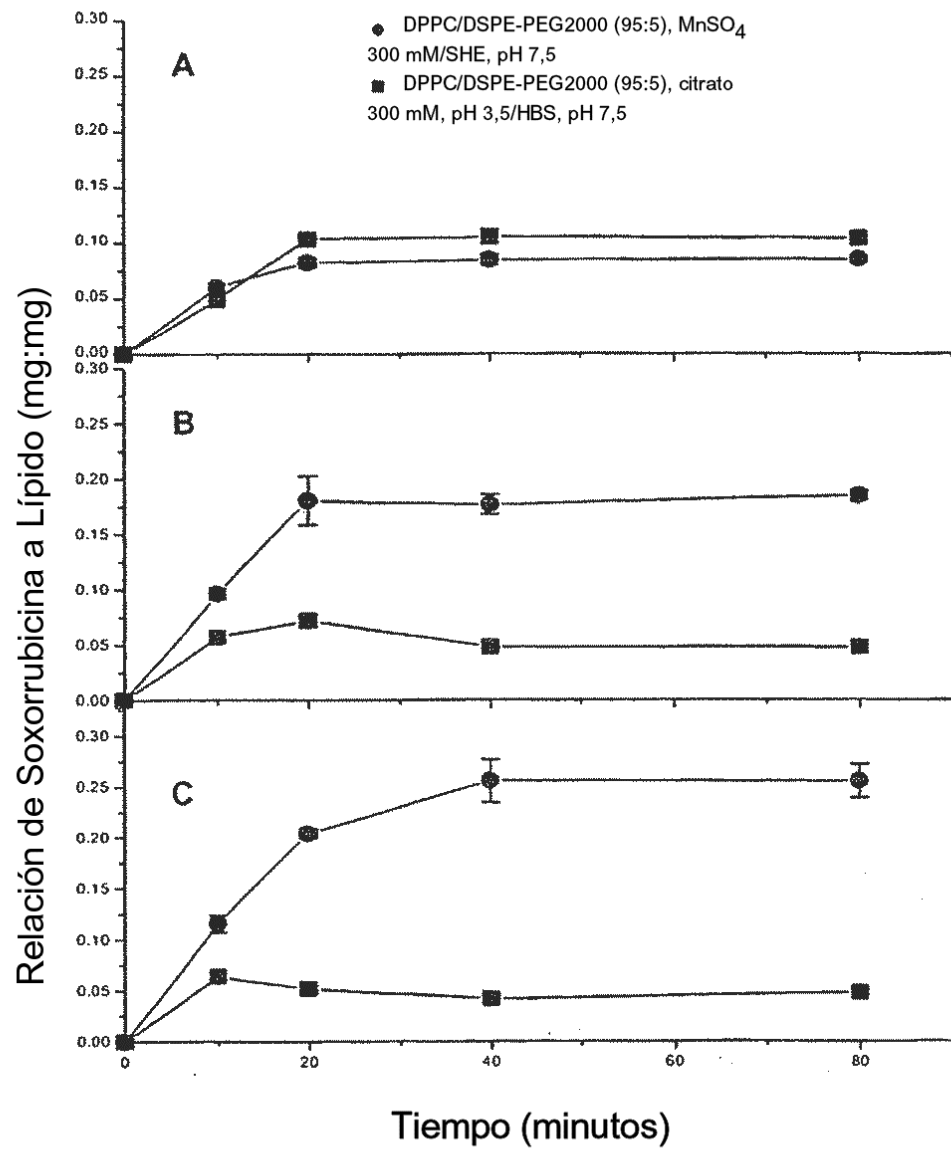


FIGURA 7

8/24

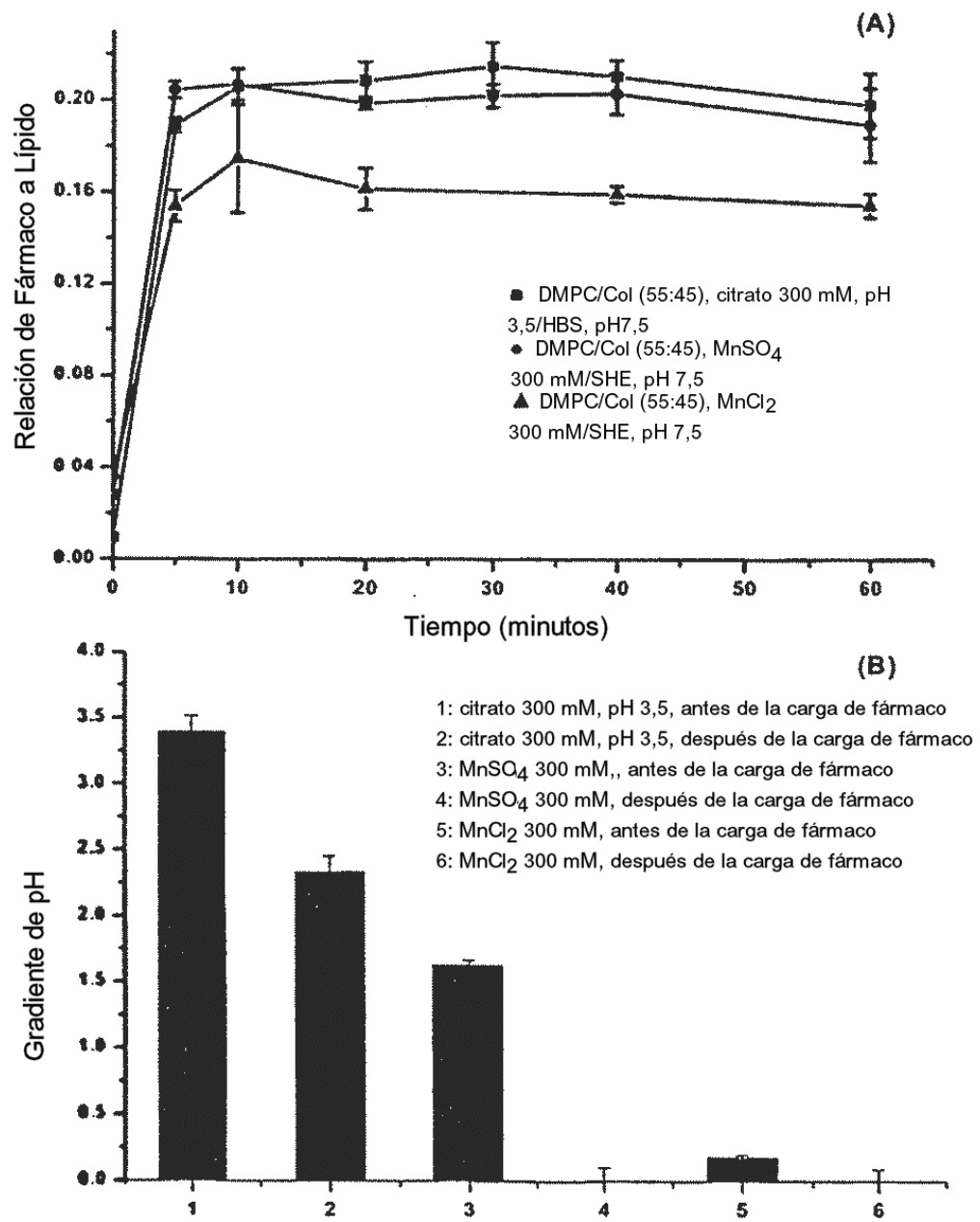


FIGURA 8

9/24

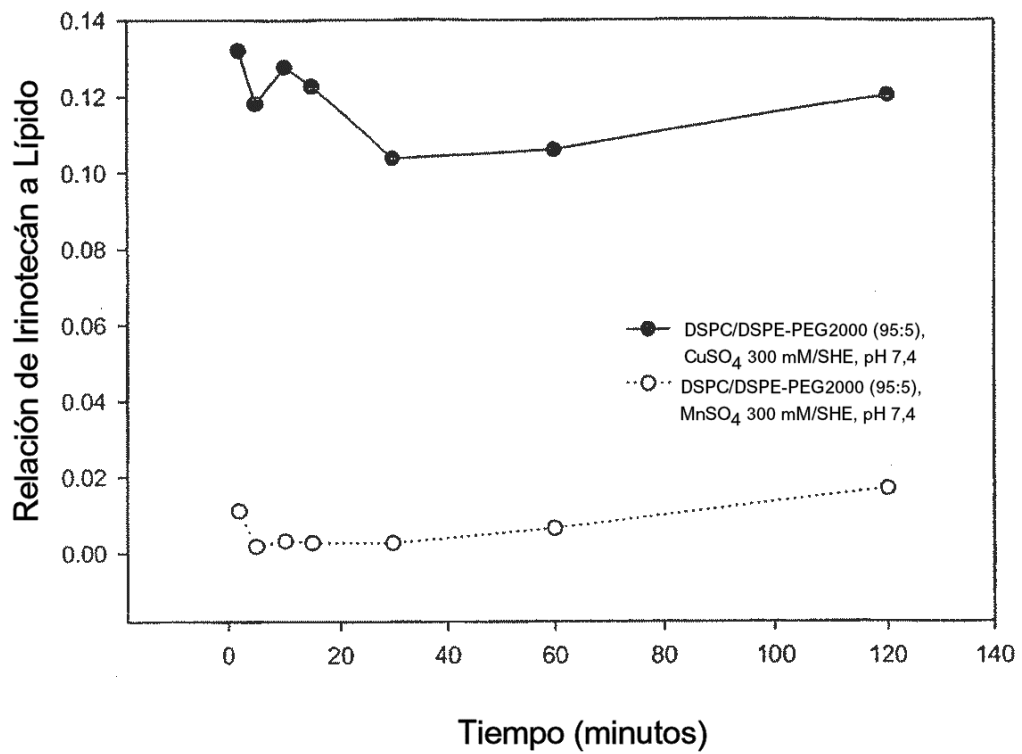


FIGURA 9

10/24

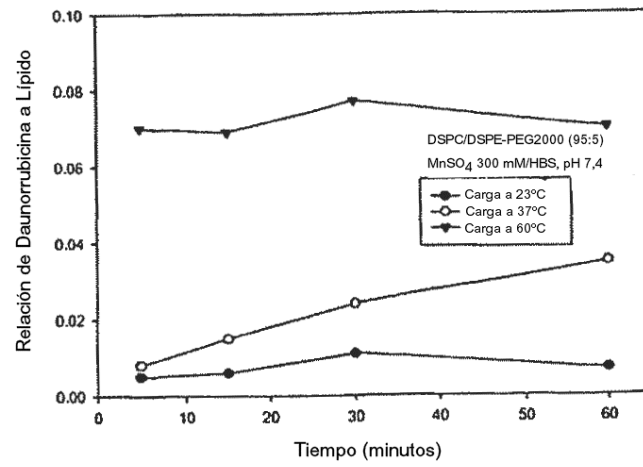


FIGURA 10A

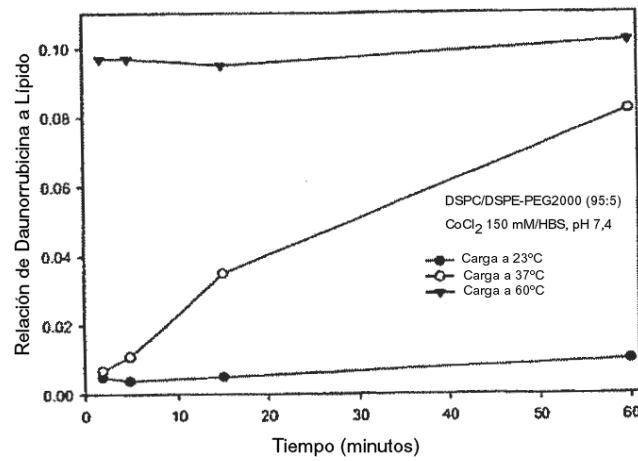


FIGURA 10B

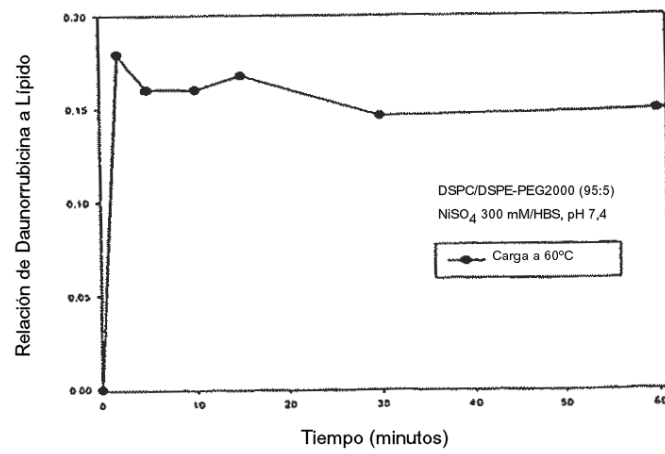


FIGURA 10C

11/24

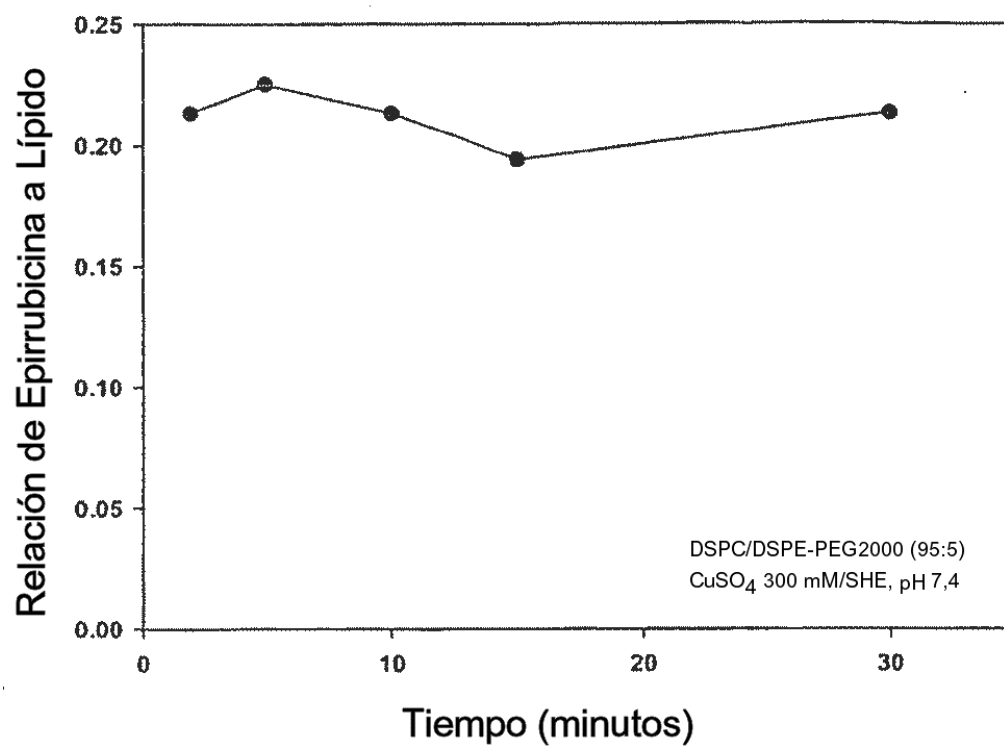


FIGURA 11

12/24

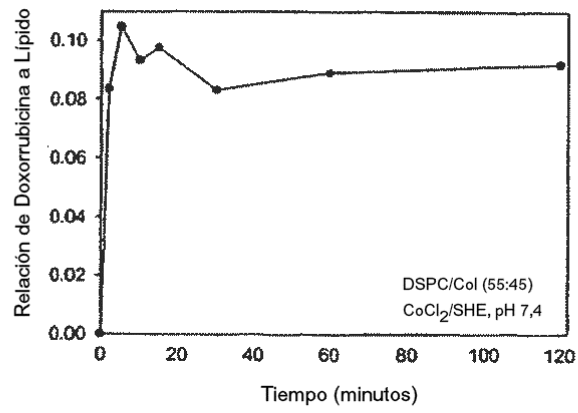


FIGURA 12A

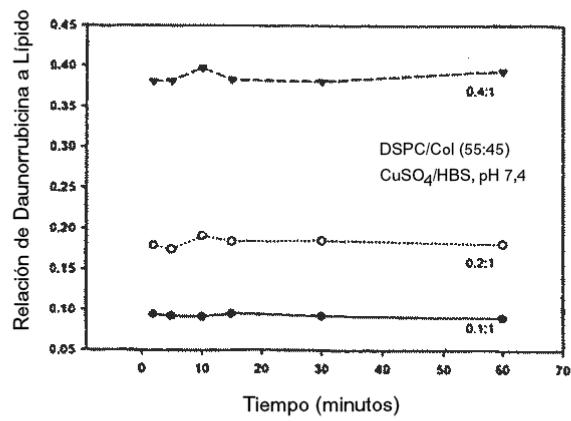


FIGURA 12B

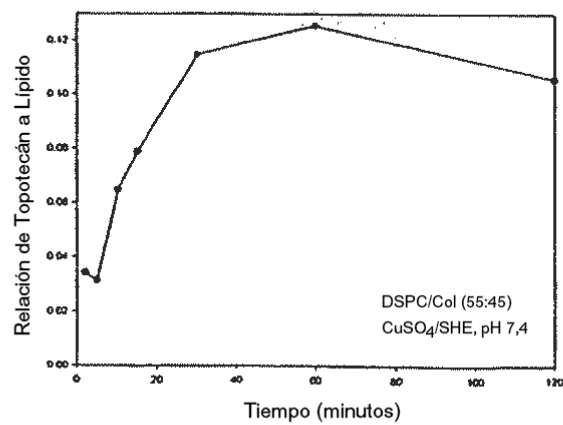


FIGURA 12C

13/24

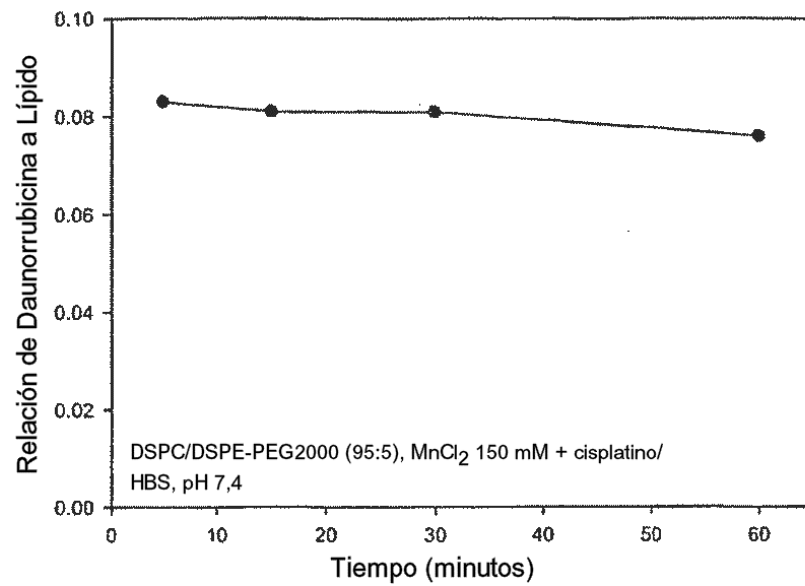


FIGURA 13A

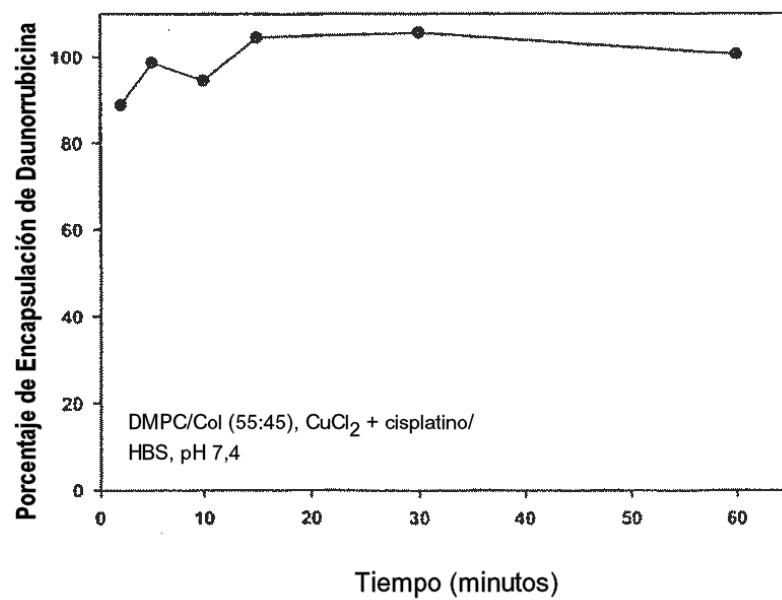


FIGURA 13B

14/24

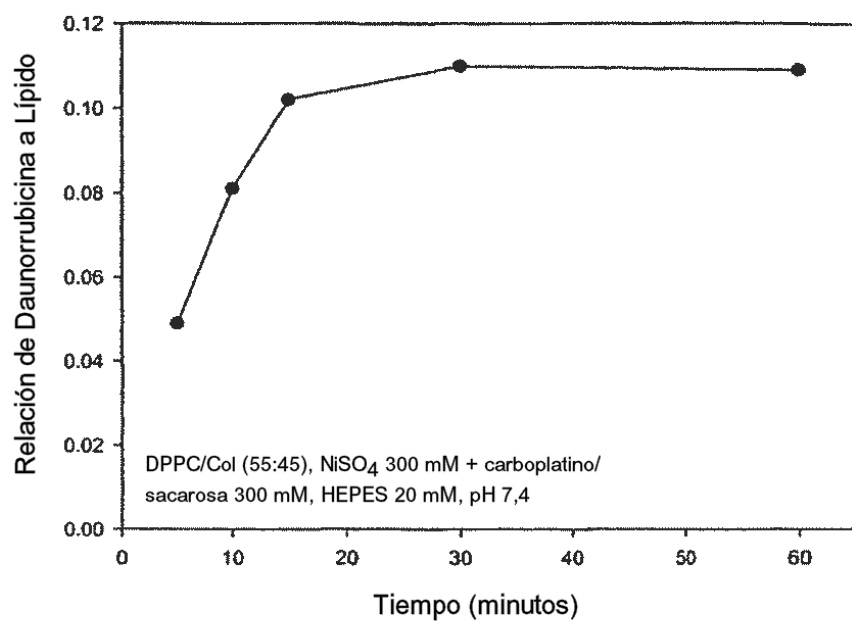


FIGURA 13C

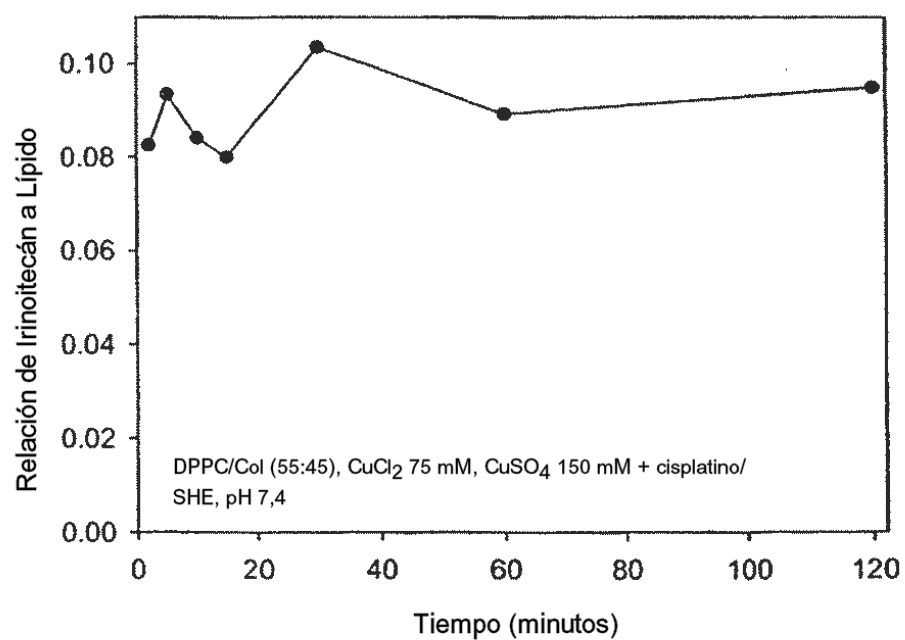


FIGURA 13D

15/24

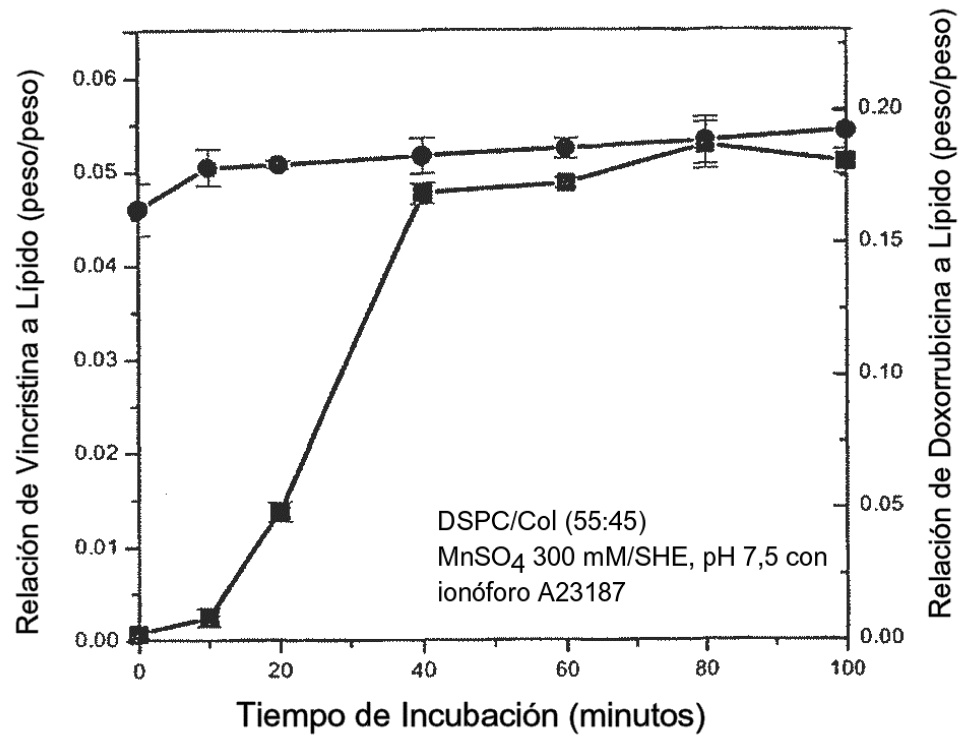


FIGURA 14

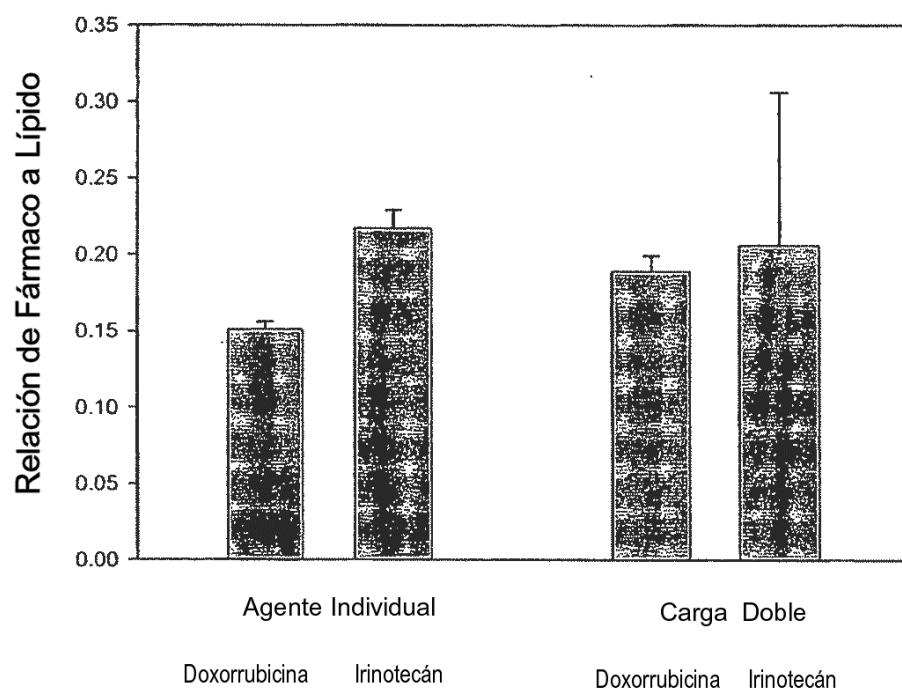


FIGURA 15

17/24

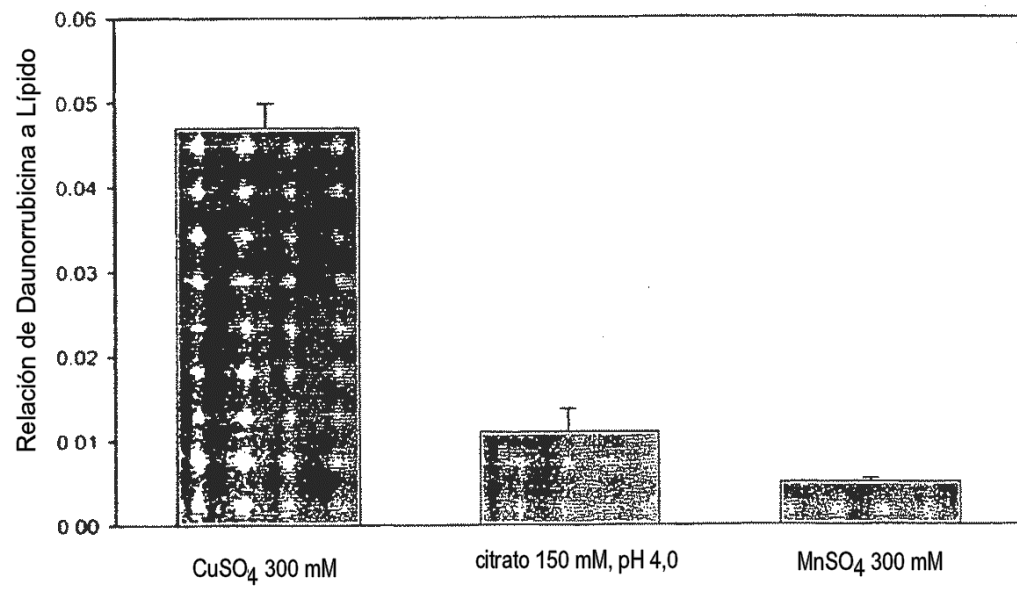


FIGURA 16

18/24

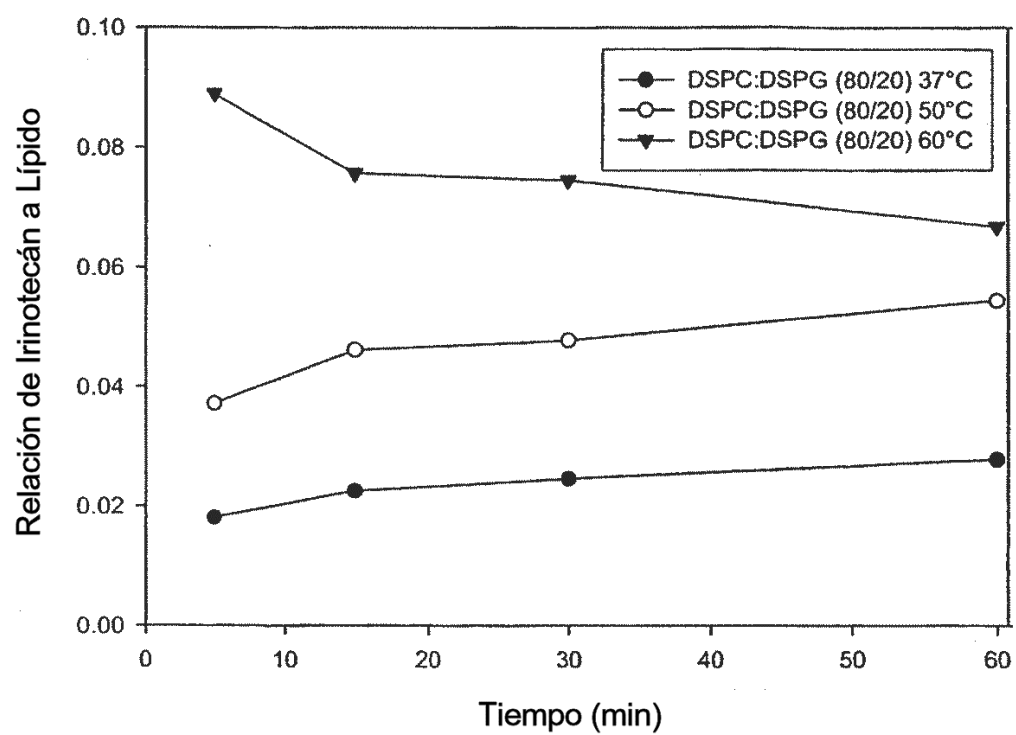


FIGURA 17

19/24

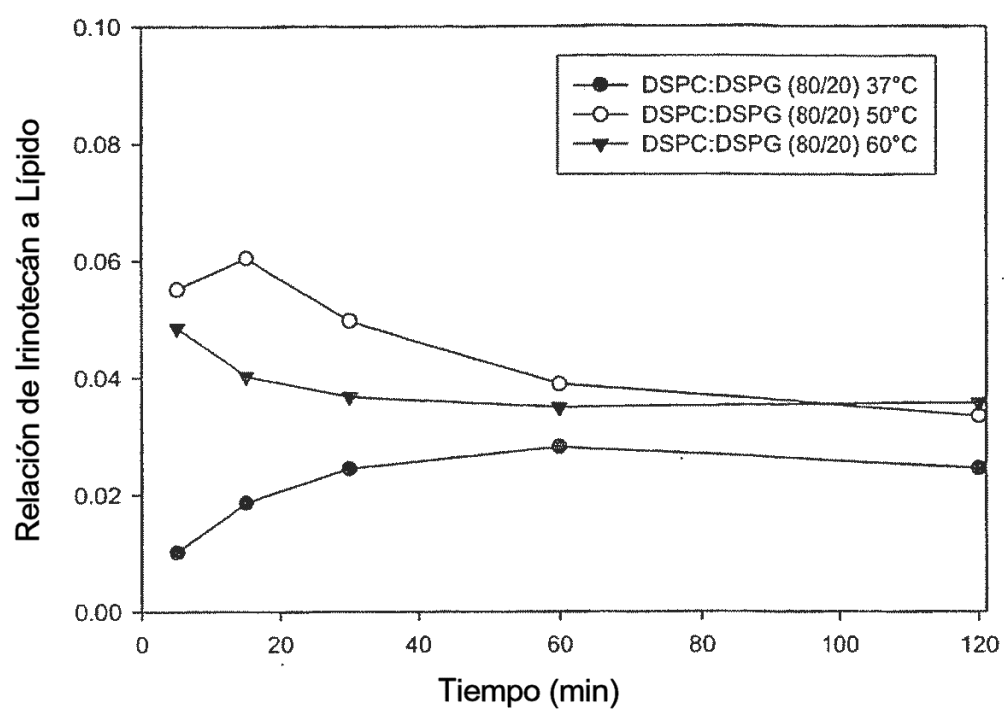


FIGURA 18

20/24

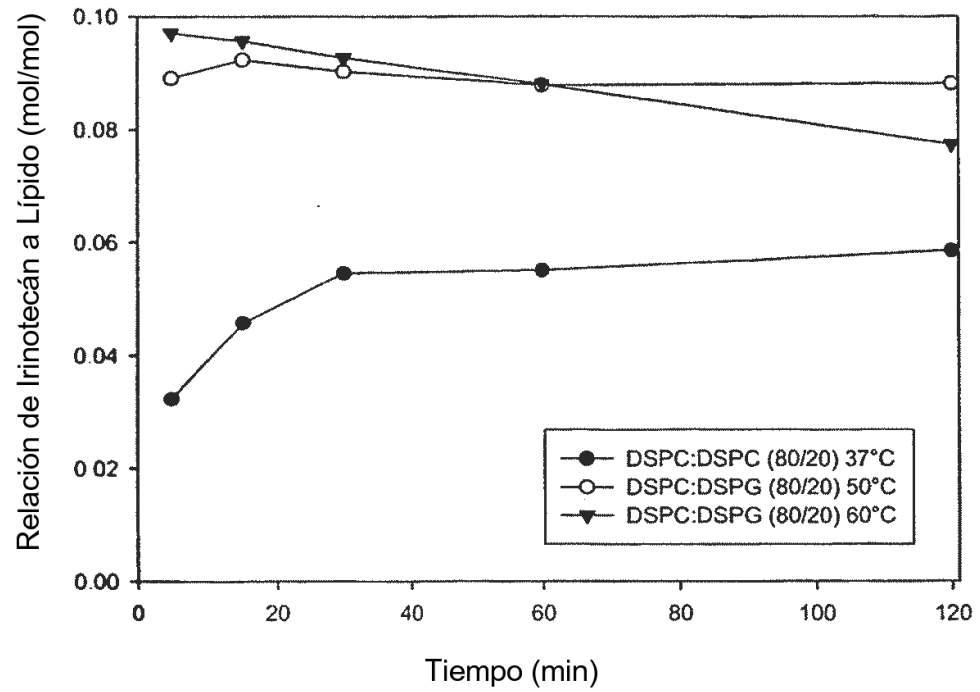


FIGURA 19

21/24

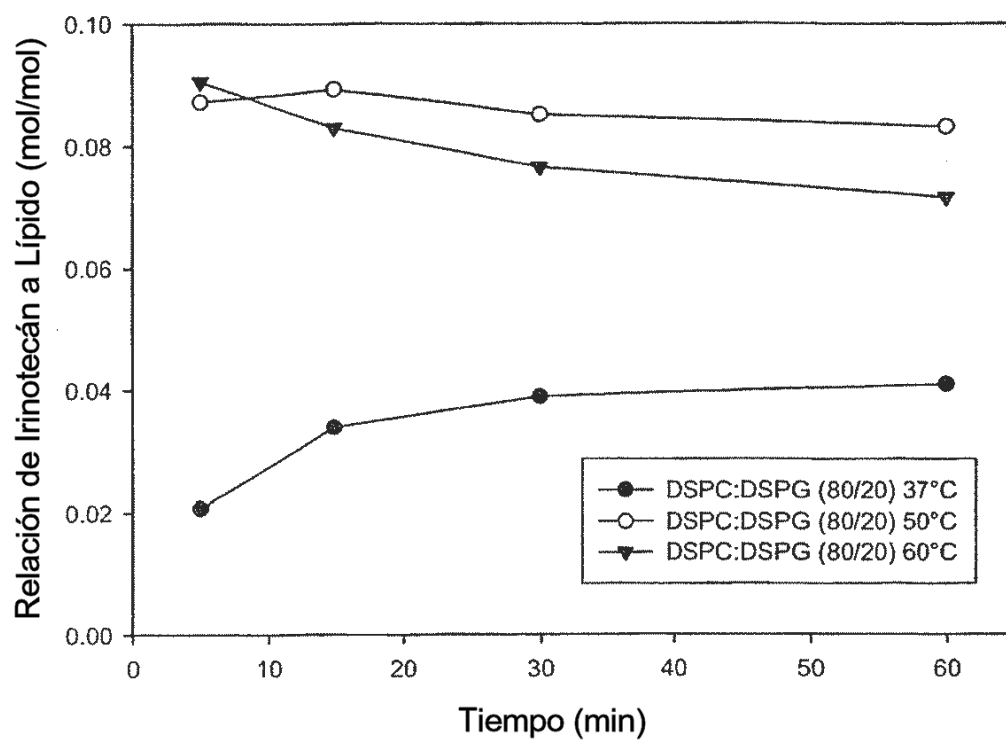


FIGURA 20

22/24

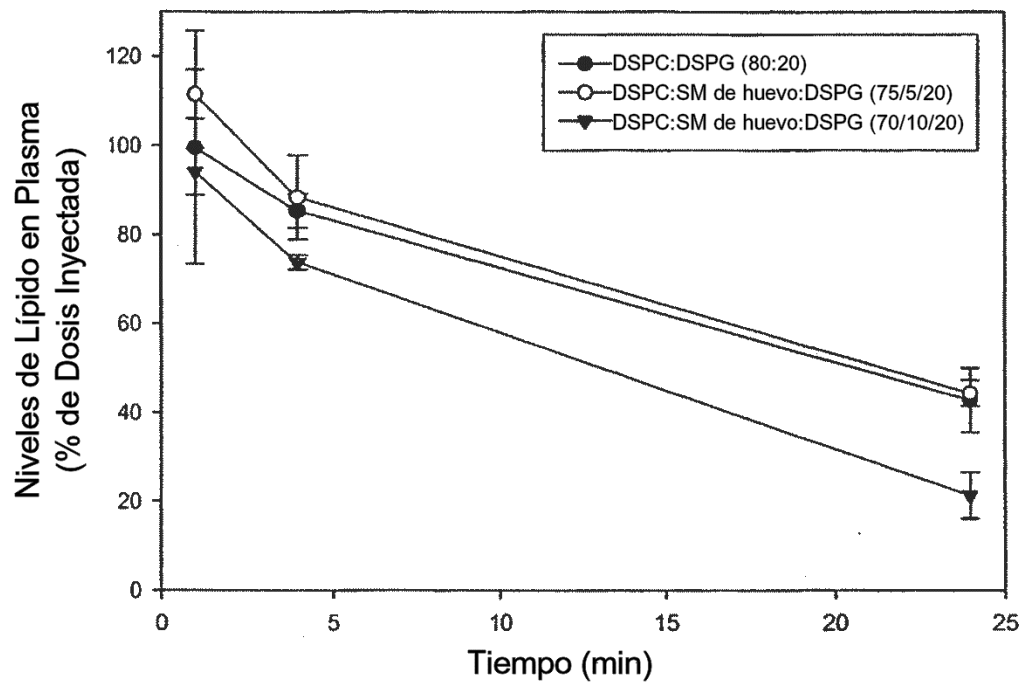


FIGURA 21

23/24

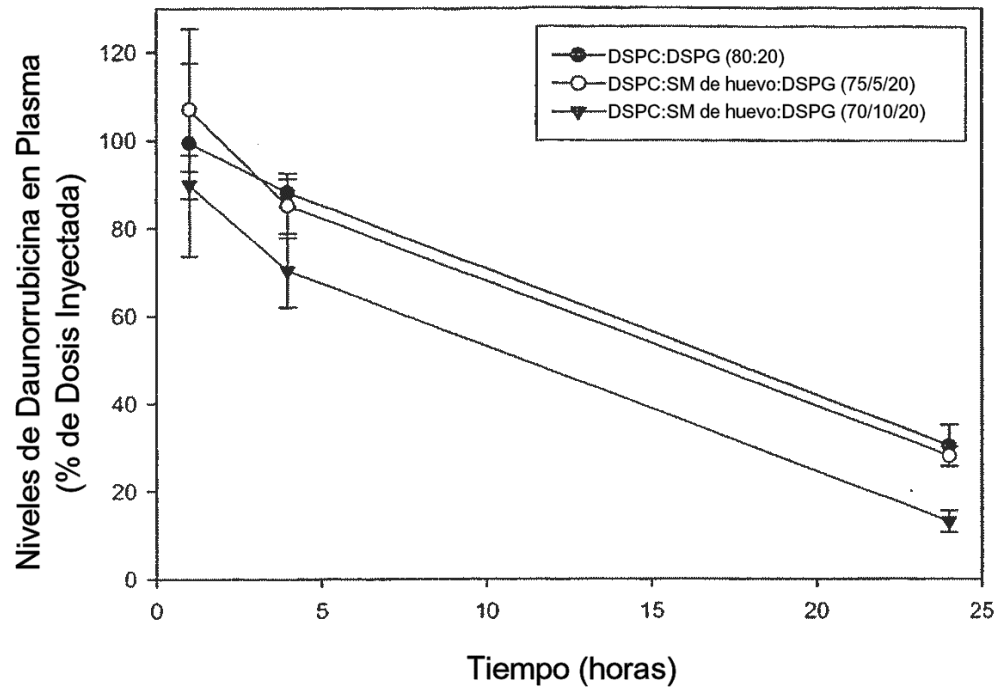


FIGURA 22

24/24

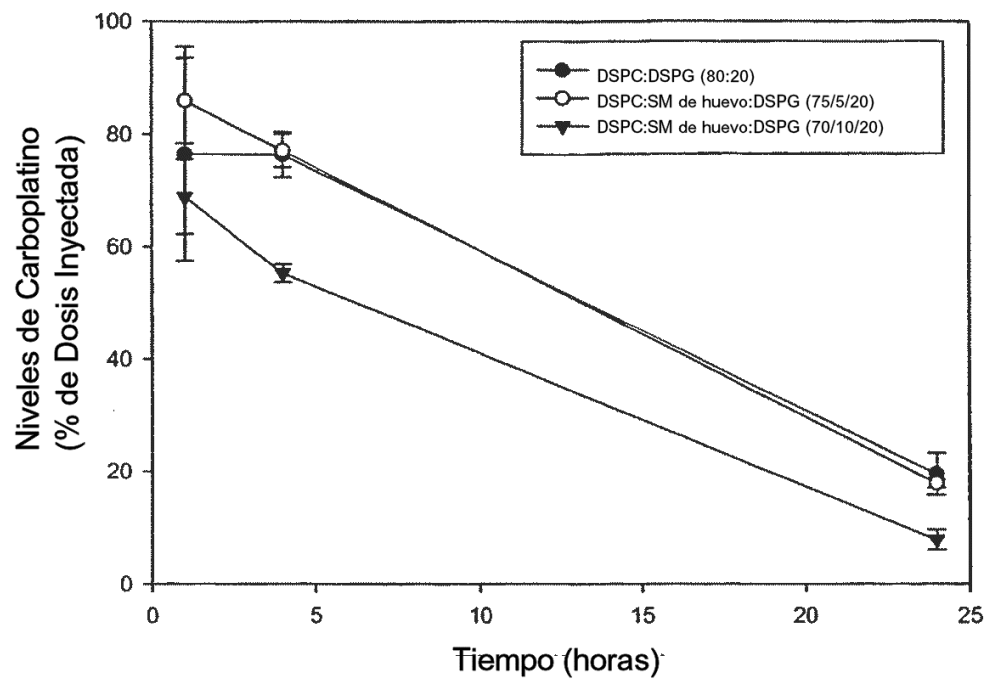


FIGURA 23