(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 689 259**

(51) Int. CI.:

A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2008 PCT/CN2008/001846**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2009 WO09062398**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2008 E 08850143 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2217209**

(54) Título: **Liposomas termosensibles novedosos que contienen agentes terapéuticos**

(30) Prioridad:

05.11.2007 WO PCT/CN2007/003128

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

MEI, XINGGUO;
JIANG, QINGWEI y
YU, WEIPING

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Liposomas termosensibles novedosos que contienen agentes terapéuticos

ANTECEDENTES

Los liposomas se han usado para entregar una amplia variedad de agentes terapéuticos. Por ejemplo, agentes antitumorales tales como actinomicina (patente de Estados Unidos n.º 3.993.754), antraciclinas (patente de Estados Unidos n.º 4.863.739) y alcaloides de la vinca (patente de Estados Unidos n.º 4.952.408) se han encapsulado en liposomas. Más recientemente, se han preparado liposomas termosensibles que contienen agentes activos y se han usado para entregar el agente activo a dianas específicas en un sujeto (patentes de Estados Unidos n.º 6.200.598 y 6.726.925, y Yatvin y col., Science 204:188 (1979). En uso, los liposomas termosensibles se entregan a un sujeto y se calienta un área diana del sujeto. Cuando el liposoma termosensible alcanza el área calentada, experimenta una transición de fase gel a líquida y libera el agente activo. El éxito de esta técnica requiere un liposoma con una temperatura de transición de fase gel a líquida comprendida en el intervalo de temperaturas alcanzables en el sujeto.

Sigue habiendo una necesidad en la técnica de liposomas formulados para encapsular un agente terapéutico tal como un agente antitumoral que pueda experimentar una transición de fase gel a líquida a una temperatura alcanzable en un sujeto. Esta necesidad y otras son satisfechas por la presente invención.

RESUMEN

La presente invención proporciona un liposoma termosensible como el presente en la reivindicación 1. Los liposomas termosensibles de la descripción comprenden al menos una fosfatidilcolina, al menos un fosfatidilglicerol y al menos un lisolípido. Los liposomas termosensibles de la descripción tienen una temperatura de transición de fase gel a líquida de 39,0 ºC a 45 ºC. Los liposomas termosensibles de la descripción comprenden un fosfolípido PEGilado. Un liposoma termosensible según la descripción también comprende uno o más agentes activos, por ejemplo, agentes terapéuticos, agentes para el diagnóstico por imágenes y combinaciones de los mismos.

La fosfatidilcolina es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), el fosfatidilglicerol es diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), el lisolípido es monoestearoilfosfatidilcolina (MSPC) y el liposoma termosensible comprende diestearoilfosfatidiletanolamina modificada con PEG-2000 (DSPE-PEG2000). Los liposomas termosensibles de la descripción pueden comprender una fosfatidilcolina, un fosfatidilglicerol, un lisolípido y un fosfolípido PEGilado en cualquier proporción siempre y cuando la temperatura de transición de fase gel a líquida esté en el intervalo de 39 ºC a 45 ºC. Los liposomas de la descripción comprenden las siguientes proporciones en peso de ingredientes en los intervalos siguientes, una fosfatidilcolina 60-80:un fosfatidilglicerol 6-12:un lisolípido 6-12:un fosfolípido PEGilado 4-15:un ingrediente activo 1-30. El liposoma termosensible de la descripción comprende una proporción en peso de DPPC 60-80:DSPG 6-12:MSPC 6-12:DSPE-PEG2000 4-15:ingrediente activo 1-30.

Los liposomas termosensibles de la descripción comprenden uno o más agentes activos. Se puede usar cualquier agente activo conocido por los expertos en la materia en combinación con los liposomas termosensibles de la descripción para entregar el agente activo a un sitio seleccionado en un sujeto. Como se usa en el presente documento, un sujeto es cualquier mamífero, en particular, humanos, gatos o perros. En una realización, los liposomas termosensibles de la descripción comprenden uno o más agentes anticancerígenos. Los ejemplos de agentes anticancerígenos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, antibióticos de antraciclina, alcaloides vegetales, derivados del taxol, inhibidores de topoisomerasas, anticuerpos monoclonales, fotosensibilizadores, inhibidores de quinasas y compuestos que contienen platino. En una realización concreta, los liposomas termosensibles de la descripción pueden comprender un antibiótico de antraciclina, por ejemplo, docetaxel. En otra realización concreta, los liposomas termosensibles de la descripción pueden comprender un compuesto de platino tal como carboplatino.

La presente descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden liposomas termosensibles de la descripción que comprenden un agente activo. En tales composiciones farmacéuticas, los liposomas termosensibles de la descripción comprenden al menos una fosfatidilcolina, al menos un fosfatidilglicerol, al menos un lisolípido y tienen una temperatura de transición de fase gel a líquida de 39,0 ºC a 45 ºC. Los liposomas termosensibles para uso en composiciones farmacéuticas de la descripción comprenden además un fosfolípido PEGilado.

En el liposoma termosensible para uso en las composiciones farmacéuticas de la descripción, la fosfatidilcolina es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), el fosfatidilglicerol es diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), el lisolípido es

monoestearoilfosfatidilcolina (MSPC) y el liposoma termosensible comprende un fosfolípido PEGilado, concretamente diestearoilfosfatidiletanolamina modificada con PEG-2000 (DSPE-PEG2000). Tales liposomas termosensibles comprenden las siguientes proporciones en peso de ingredientes en los intervalos siguientes: DPPC 60-80:DSPG 6-12:MSPC 6-12:DSPE-PEG2000 4-15:ingrediente activo 1-30.

Se puede incluir cualquier agente activo en las composiciones farmacéuticas de la descripción, por ejemplo, agentes terapéuticos y/o agentes para el diagnóstico por imágenes. En una realización de la descripción, un agente activo puede ser un agente anticancerígeno. Los ejemplos de agentes anticancerígenos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, antibióticos de antraciclina, alcaloides vegetales, derivados del taxol, inhibidores de topoisomerasas, anticuerpos monoclonales, fotosensibilizadores, inhibidores de quinasas y compuestos que contienen platino. En una concreta, los liposomas termosensibles de la descripción pueden comprender un antibiótico de antraciclina, por ejemplo, docetaxel. En otra realización concreta, los liposomas termosensibles de la descripción pueden comprender un compuesto que contiene platino, por ejemplo, carboplatino.

Los liposomas termosensibles de la invención son para uso en procedimientos de tratamiento de una enfermedad en un sujeto. Tales liposomas termosensibles habitualmente comprenderán uno o más agentes activos que puedan usarse para tratar la enfermedad. Un procedimiento de tratar una enfermedad en un sujeto con necesidad del mismo según la descripción puede comprender administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un liposoma sensible a la temperatura que comprende un agente activo, donde el liposoma comprende al menos una fosfatidilcolina, al menos un fosfatidilglicerol, al menos un lisolípido y tiene una temperatura de transición de fase gel a líquida de 39,0 ºC a 45 ºC. A continuación, la parte del sujeto que comprende algo de, o todo, el tejido enfermo se calienta a una temperatura suficiente para provocar la transición gel-líquido del liposoma, liberando de este modo el agente activo en estrecha proximidad al tejido enfermo. Los liposomas termosensibles para uso en los procedimientos de la descripción también comprenden un fosfolípido PEGilado, concretamente DSPE-PEG2000.

En los liposomas termosensibles para uso en los procedimientos de la descripción, la fosfatidilcolina es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), el fosfatidilglicerol es diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) y el lisolípido es monoestearoilfosfatidilcolina (MSPC). Tales liposomas termosensibles para uso en los procedimientos de la descripción comprenden una fosfatidilcolina, un fosfatidilglicerol, un lisolípido y un fosfolípido PEGilado en cualquier proporción siempre y cuando la temperatura de transición de fase gel a líquida esté en el intervalo de 39 ºC a 45 ºC. Los liposomas para uso en los procedimientos de tratamiento de la descripción comprenden una proporción en peso de DPPC 60-80:DSPG 6-12:MSPC 6-12:DSPE-PEG2000 4-15:ingrediente activo 1-30.

En una realización, la presente descripción comprende una composición farmacéutica para uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer en un sujeto con necesidad del mismo que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un liposoma sensible a la temperatura que comprende un agente anticancerígeno, donde el liposoma comprende al menos una fosfatidilcolina, al menos un fosfatidilglicerol, al menos un lisolípido y tiene una temperatura de transición de fase gel a líquida de 39,0 ºC a 45 ºC. Los ejemplos de agentes anticancerígenos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, antibióticos de antraciclina, alcaloides vegetales, derivados del taxol, inhibidores de topoisomerasas, anticuerpos monoclonales, fotosensibilizadores, inhibidores de quinasas y compuestos que contienen platino. En una realización de la descripción, el agente anticancerígeno puede ser un antibiótico de antraciclina, por ejemplo docetaxel. En otra realización concreta, los liposomas termosensibles de la descripción pueden comprender un compuesto que contiene platino, por ejemplo, carboplatino.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una traza de calorimetría diferencial de barrido (DSC) que muestra la transición de fase gel-líquida de un liposoma termosensible ejemplar de la descripción.

La Figura 2 es un gráfico del tamaño de partícula en función de la cantidad de crioprotector en la preparación de liposoma liofilizada.

La Figura 3 es un gráfico del tamaño de partícula tras la rehidratación de liposomas liofilizados de la descripción en función del contenido de agua de los liposomas a diferentes velocidades de congelación.

La Figura 4A es un esquema del protocolo usado para ensayar los efectos del reposo sobre el tamaño de partícula de liposomas de la descripción rehidratados. La Figura 4B es un gráfico que muestra la distribución del tamaño de partícula de liposomas de la descripción rehidratados a lo largo de un periodo de tiempo de una hora.

La Figura 5 es un gráfico lineal de la distribución del tamaño de partícula de liposomas de carboplatino termosensibles.

La Figura 6 es un gráfico de barras de la distribución del tamaño de partícula de liposomas de carboplatino termosensibles.
La Figura 7 es un gráfico lineal del perfil de liberación de fármaco a 37 ºC (diamantes huecos) y 42 ºC (diamantes macizos) en función del tiempo.
La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra la liberación de carboplatino a diversas temperaturas a los 5 minutos (azul) y los 10 minutos (magenta).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención es como se define en las reivindicaciones.

Los liposomas termosensibles de la descripción habitualmente comprenden una o más fosfatidilcolinas. Los ejemplos adecuados de fosfatidilcolinas que se pueden usar en la puesta en práctica de la descripción incluyen, pero no se limitan a,1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) y 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC).

Los liposomas termosensibles de la descripción habitualmente comprenden uno o más fosfatidilgliceroles. Los ejemplos adecuados de fosfatidilgliceroles incluyen, pero no se limitan a, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (DMPG), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (DPPG), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (DSPG) y 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (POPG).

Los liposomas termosensibles de la descripción habitualmente comprenden uno o más lisolípidos. Como se usa en el presente documento, «lisolípido» se refiere a cualquier derivado del ácido fosfatídico (1,2-diacil-*sn*-glicerol-3-fosfato) que contiene solo una cadena acilo unida covalentemente al resto glicerol. Los derivados del ácido fosfatídico incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina. Cualquier lisolípido conocido por los expertos en la materia se puede usar en la puesta en práctica de la descripción.

Los liposomas termosensibles de la descripción habitualmente comprenden uno o más fosfolípidos PEGilados. Los ejemplos adecuados de fosfolípidos PEGilados incluyen, pero no se limitan a, 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-350] (mPEG 350 PE), 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-550] (mPEG 550 PE), 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-750] (mPEG 750 PE), 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-1000] (mPEG 1000 PE), 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (mPEG 2000 PE), 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-3000] (mPEG 3000 PE), 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-5000] (mPEG 5000 PE), diestearoilfosfatidiletanolamina modificada con PEG-2000 (DSPE-PEG2000) y diestearoilfosfatidiletanolamina modificada con PEG-5000 (DSPE-PEG5000).

Agentes activos

Los liposomas termosensibles de la descripción se formulan para que comprendan uno o más agentes activos. Como se usa en el presente documento, «agente activo» incluye cualquier compuesto que se desea entregar a un sitio específico en un sujeto. En la puesta en práctica de la descripción se puede usar cualquier agente activo.

Se pueden usar agentes anticancerígenos como agentes activos en los liposomas termosensibles de la descripción. Los ejemplos adecuados de agentes anticancerígenos incluyen:

agentes alquilantes, por ejemplo, mostazas nitrogenadas (p. ej., clorambucilo, clormetina, ciclofosfamida, Ifosfamida, melfalán, nitrosoureas (p. ej., carmustina, fotemustina, lomustina, estreptozocina), compuestos que contienen platino (p. ej., carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, BBR3464), busulfán, dacarbazina, mecloretamina, procarbazina, temozolomida, tiotepa y uramustina;

antimetabolitos que se dirigen a, por ejemplo, el ácido fólico (p. ej., aminopterina, metotrexato, pemetrexed, raltitrexed), el metabolismo de la purina (p. ej., cladribina, clofarabina, fludarabina, mercaptopurina, pentostatina, tioguanina), el metabolismo de la pirimidina (p. ej., capecitabina, citarabina, fluorouracilo, floxuridina, gemcitabina);

alcaloides vegetales antimitóticos, por ejemplo, taxanos (p. ej., docetaxel, paclitaxel) y alcaloides de la vinca (p. ej., vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina);

antibióticos citotóxicos/antitumorales, por ejemplo, antibióticos de antraciclina (p. ej., daunorubicina, doxorubicina,

epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, valrubicina, carinomicina, nacetiladriamicina, rubidazona, 5-imidodaunomicina, N30 acetildaunomicina y epirubicina), bleomicina, hidroxiurea, mitomicina y actinomicina;

inhibidores de topoisomerasas, por ejemplo, camptotecinas (p. ej., camptotecina, topotecán, irinotecán), podofilinas (p. ej., etopósido, tenipósido);

anticuerpos monoclonales, por ejemplo, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, panitumumab, rituximab, tositumomab y trastuzumab;

fotosensibilizadores, por ejemplo, ácido aminolevulínico, aminolevulinato de metilo, porfímero sódico y verteporfina; inhibidores de quinasa, por ejemplo, dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib, sunitinib y vandetanib;

enzimas, por ejemplo, asparaginasa, pegaspargasa e inhibidores de enzimas, por ejemplo, hidroxiurea;

inductores de la apoptosis, por ejemplo, trióxido arsénico, velcade y genasense;

modificadores de la respuesta biológica, por ejemplo, denileukin diftitox;

antihormonas, por ejemplo, acetato de goserelina, acetato de leuprolida, pamoato de triptorelina, acetato de megestrol, tamoxifeno, toremifeno, fulvestrant, testolactona, anastrozol, exemestano y letrozol; y

retinoides, por ejemplo, ácido 9-*cis*-retinoico y ácido *trans*retinoico.

En formas de realización adicionales, los liposomas termosensibles de la descripción pueden comprender más de un agente antineoplásico, o se puede usar más de un liposoma termosensible en los procedimientos de la descripción, cada uno de los cuales comprende diferentes agentes activos, por ejemplo, diferentes agentes anticancerígenos.

Los agentes activos adicionales que se pueden usar en la puesta en práctica de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, antifúngicos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores, agentes antiinfecciosos, antivirales, antihelmínticos y compuestos antiparasitarios.

El liposoma termosensible de la descripción que comprende un agente activo puede comprender los lípidos y el agente activo en cualquier proporción siempre y cuando el liposoma permanezca térmicamente sensible y pueda liberar el agente activo a una temperatura adecuada, concretamente entre 39 ºC y 45 ºC. Los intervalos de proporciones en peso adecuadas de una fosfatidilcolina:un fosfatidilglicerol:un fosfolípido PEGilado:un ingrediente activo son 60-80:6-12:6-12:4-15: 1-10. Los ejemplos de proporciones en peso adecuadas de una fosfatidilcolina:un fosfatidilglicerol:un fosfolípido PEGilado:un ingrediente activo incluyen, pero no se limitan a, 70:8:8:8:4, 71:8:8:8:4, 72:8:8:8:4, 73:8:8:8:4, 74:8:8:8:4, 75:8:8:8:4, 70:8:8:6:4, 71:8:8:6:4, 72:8:8:6:4, 73:8:8:6:4, 74:8:8:6:4, 75:8:8:6:4, 70:8:8:4:4, 71:8:8:4:4, 72:8:8:4:4, 73:8:8:4:4, 74:8:8:4:4, 75:8:8:4:4, 70:9:9:8:4, 71:9:9:8:4, 72:9:9:8:4, 73:9:9:8:4, 74:9:9:8:4, 75:9:9:8:4, 70:9:9:6:4, 71:9:9:6:4, 72:9:9:6:4, 73:9:9:6:4, 74:9:9:6:4, 75:9:9:6:4, 70:9:9:4:4, 71:9:9:4:4, 72:9:9:4:4, 73:9:9:4:4, 74:9:9:4:4 y 75:9:9:4:4.

Procedimientos de uso

Los liposomas termosensibles de la descripción se pueden administrar a un sujeto usando cualquier vía adecuada, por ejemplo, administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración peritoneal, pulverizador nasal, inhalación pulmonar, así como otras adecuadas. Los tejidos que se pueden tratar usando los procedimientos de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, nasal, pulmonar, hepático, renal, óseo, tejido blando, músculo, tejido adrenal y mama. Los tejidos que se pueden tratar incluyen tanto tejido canceroso, o tejido enfermo o comprometido, así como tejido sano, si se desea. Cualquier tejido de fluido corporal que se pueda calentar a una temperatura superior a 39,5 ºC puede ser tratado con los liposomas de la descripción.

La dosis de agente activo administrada al sujeto usando los liposomas termosensibles de la descripción es fácilmente determinada por los expertos en la materia y se administra adecuadamente intravenosamente a lo largo de un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, a lo largo de aproximadamente 15 minutos a varias horas, por ejemplo, 2, 3, 4, 6 o más horas. Como se usa en el presente documento, «aproximadamente» indica una variabilidad del 10 % cuando se usa para modificar un valor numérico.

La dosis de agente activo se puede ajustar, como se sabe en la técnica, dependiendo del agente activo comprendido

en el vehículo.

El tejido diana del sujeto se puede calentar antes y/o durante y/o después de la administración de los liposomas termosensibles de la descripción. En una realización de la descripción, el tejido diana se calienta primero (por ejemplo durante de 10 a 30 minutos) y los liposomas de la descripción son entregados al sujeto tan pronto como es posible tras el calentamiento. En otra realización, los liposomas termosensibles de la descripción son entregados al sujeto y el tejido diana se calienta tan pronto como es posible tras la administración.

Se puede usar cualquier medio de calentamiento del tejido diana adecuado, por ejemplo, aplicación de radiación de radiofrecuencia, aplicación de ultrasonido, que puede ser ultrasonido focalizado de alta intensidad, aplicación de radiación de microondas, cualquier fuente que genere radiación infrarroja tal como un baño de agua caliente, luz, así como radiación aplicada externamente o internamente tal como la generada por radioisótopos, campos eléctricos y magnéticos y/o combinaciones de los anteriores.

Resultará fácilmente evidente a un experto ordinario en la materia relevante que se pueden hacer otras modificaciones y adaptaciones adecuadas a los procedimientos y las aplicaciones descritas en el presente documento sin alejarse del alcance de la invención o de cualquier realización de la misma. Habiendo descrito ahora la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente consultando los siguientes ejemplos, que se incluyen adjuntos con fines meramente ilustrativos y no pretender ser limitantes de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Preparación y caracterización de un liposoma de taxotere termosensible

En la preparación de los liposomas de la descripción se usaron los materiales siguientes: dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), monoestearoilfosfatidilcolina (MSPC), diestearoilfosfatidiletanolamina PEGilada (DSPE-PEG2000), NaCl, KCl, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, KH_2PO_4, lactosa, $CHCl_3$, metanol, etanol y agua destilada.

En la preparación de los liposomas de la descripción se usaron los equipos siguientes; baño de agua, rotavapor, homogeneizador-extrusor, liofilizador, analizador del tamaño de partícula por difusión de luz láser (Nanophox de Smypatec) y termómetro.

Procedimiento para preparar un lote de 20 ml de liposomas que contienen docetaxel

Medir los componentes siguientes en las cantidades indicadas.

Componente	DPPC	DSPG	MSPC	DSPE-PEG2000	Taxotere
Cantidad	669 mg	75 mg	75 mg	75 mg	37,5 mg

Disolver los materiales anteriores con $CHCl_3$/metanol (3:1) a 55 ºC. A continuación, eliminar el disolvente orgánico con rotavapor. Esto se puede lograr mediante rotoevaporación a 55 ºC durante 1 hora. Después de secar, se debe soplar nitrógeno sobre el material seco durante un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo, 5 minutos.

A continuación, se rehidrata el material seco. Una solución de rehidratación adecuada es la solución salina tamponada con fosfato (PBS) a la que se puede añadir lactosa u otros materiales estabilizadores (p. ej., azúcares). Un protocolo de rehidratación adecuado es añadir 20 ml de solución de PBS-lactosa al 5 % (pH 7,3 ± 0,2) y rotar en el rotavapor a presión atmosférica durante 1 hora a 50 ºC. Después de la rehidratación, la solución se puede desgasificar a presión reducida para eliminar las burbujas.

Tras la hidratación, el tamaño de partícula de los lisosomas se puede ajustar hasta el intervalo deseado, por ejemplo, 100 ±15 nm. Un protocolo de extrusión adecuado es usar un homogeneizador/extrusor con un filtro de 200 nm y extruir tres veces. Cambiar a un filtro de 100 nm y extruir tres veces. Por último, cambiar a un filtro de 80 nm y extruir tres veces. La distribución del tamaño de partícula de los lisosomas se puede medir usando cualquier técnica adecuada, por ejemplo, usando espectroscopía de correlación cruzada de fotones (PCCS) y un sensor Nanophox (Sympatec GmbH). Tras la extrusión, la solución liposomal se puede esterilizar mediante filtración a través de un filtro de membrana de tamaño de poro 0,22 µm (Millipore).

Tras la esterilización, el liposoma se llena en un vial y se liofiliza. El programa de liofilización es como se indica a

continuación: -50 ºC 2 h, -45 ºC 1 h, -35 ºC 10 h, -15 ºC 5 h, 0 ºC 2 h, 10 ºC 2 h, 20 ºC 6 h.

Otro procedimiento adecuado para la preparación de los liposomas de la descripción es como se indica a continuación:

Disolver los mismos componentes que antes en $CHCl_3$/metanol (3:1) a 55 ºC. Eliminar el disolvente orgánico con el rotavapor como se ha indicado anteriormente. Rehidratar con 20 ml de solución de PBS-lactosa al 5 % a 50 ºC como se ha indicado anteriormente. Colocar el material rehidratado en un homogeneizador y procesar a 15 000 psi durante 5 minutos para reducir el tamaño de partícula. Tomar el material homogeneizado y usar un extrusor con un filtro de 100 nm y extruir seis veces para reducir el tamaño de partícula a 100 ± 15 nm (100 nm × 6) y, a continuación, esterilizar mediante filtración con filtro de 0,22 µm. Tras la esterilización, el liposoma se llena en un vial y se liofiliza.

Procedimientos analíticos

La morfología de los liposomas se puede analizar mediante microscopía electrónica. Los liposomas se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico y se transfirieron a malla de cobre. Se permitió que el agua evaporara y se observaron las muestras bajo el microscopio electrónico. Los liposomas preparados mediante los procedimientos de la descripción fueron homogéneos cuando se visualizaron bajo el microscopio electrónico.

Se midió el porcentaje de fármaco encapsulado (% de encapsulación) para los liposomas preparados como se ha descrito anteriormente. % de encapsulación = fármaco encapsulado/fármaco total x 100 %. El % de encapsulación se determinó como se indica a continuación: se centrifugó 1 ml de liposoma a 6000 rpm durante 5 min. El docetaxel del sobrenadante se midió mediante HPLC. El contenido de docetaxel de los liposomas se determinó extrayendo el docetaxel de los liposomas y midiendo el docetaxel extraído mediante HPLC. Para la extracción, se diluyeron 0,1 ml de liposoma con agua: acetonitrilo (45:55) a 0,5 ml. Se añadieron 1,4 ml de metil terc-butil éter y se mezclaron durante 30 segundos. Se centrifugó la mezcla a 300 g durante 15 min. Se retiraron 3 ml de la capa orgánica y se secaron mediante rotoevaporación. El material seco se resuspendió en 200 µl de agua: acetonitrilo (45:55) y se inyectaron 5-1 µl en el HPLC para su análisis.

El análisis por HPLC se llevó a cabo en las condiciones siguientes: se usó una columna Venusil C 18 (columna C 18 de fase reversa) con una fase móvil de agua: acetonitrilo (45:55) a 1 ml/min. La temperatura de la columna fue de 30 ºC. La detección UV se ajustó a 230 nm. En estas condiciones, el límite de detección del fármaco es de entre 20-800 ng.

Se determinó la capacidad del protocolo anterior para recuperar docetaxel en una muestra. Se añadieron 0,1 ml de solución estándar de docetaxel a 0,1 ml de liposomas preparados como se ha descrito anteriormente. La muestra se diluyó con agua: acetonitrilo (45:55) a 0,5 ml. Se añadieron 1,4 ml de metil terc-butil éter y se mezcló la muestra durante 30 segundos. A continuación, se centrifugó la muestra a 300 g durante 15 min. 3 ml de la capa orgánica se secaron mediante rotoevaporación. Se añadieron 200 µl de agua: acetonitrilo (45:55) al residuo y, a continuación, se inyectaron 5-10 µl en el HPLC. La tabla siguiente proporciona la tasa de recuperación a diversas concentraciones de docetaxel.

Conc. de fármaco	% de recuperación	% de recuperación	% de recuperación	media
80 µg/ml	100,34	99,97	99,41	99,91
100 µg/ml	99,15	96,63	98,08	97,95
120 µg/ml	97,68	99,01	99,41	98,70

Se determinó la temperatura de transición de fase de los liposomas preparados según la descripción. Las mediciones de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizaron usando un Q100 (TA Instruments, Inc. New Castle DE) con cápsulas de aluminio herméticamente selladas vacías como referencia. La concentración de lípido se llevó a 20 mg/ml y se colocaron cuidadosamente 10 µl de suspensión de liposoma y se sellaron en las cápsulas herméticas de aluminio. La velocidad de barrido se ajustó a 2 ºC por minuto. La Figura 1 muestra una traza de DSC obtenida con los liposomas de la descripción. El espectro de DSC muestra que la temperatura de transición de fase del liposoma termosensible de taxotere es de aproximadamente 42 ºC.

Se evaluó la estabilidad de los liposomas preparados mediante los procedimientos anteriores midiendo periódicamente el tamaño de partícula durante su almacenamiento. Los resultados de la tabla que se presenta a continuación muestran que los liposomas preparados como se he indicado anteriormente son estables durante al menos 3 meses.

Tiempo	Antes de la liofilización	Después de la liofilización	1 mes	2 meses	3 meses
Tamaño	97 nm	101 nm	107 nm	106 nm	106 nm

También se monitorizó el contenido de fármaco. Los resultados mostraron que, después de la liofilización, el liposoma es estable a 2-8 ºC durante al menos 3 meses.

Contenido de fármaco del liposoma

Tiempo	Después de la liofilización	1 mes	2 meses	3 meses
Taxotere (mg/ml)	1,132	1,131	1,132	1,130

También se monitorizó la tasa de encapsulación de fármaco. Los resultados mostraron que, después de la liofilización, la cantidad de fármaco encapsulado por el liposoma es estable a 2-8 ºC durante al menos 3 meses.

Encapsulación de fármaco

Tiempo	Después de la liofilización	1 mes	2 meses	3 meses
% de encapsulación	99,0	98,6	98,1	98,3

Se ensayó el efecto de diferentes crioprotectores sobre el tamaño de partícula durante la liofilización. Se ensayaron la lactosa, la trehalosa, la sucrosa y el manitol. Los resultados mostraron que la lactosa y la sucrosa son más efectivas que el manitol y la trehalosa. La Figura 2 muestra un gráfico del tamaño de partícula en función del % en peso de crioprotector presente en la solución liofilizada.

La velocidad a la que se congelan los liposomas para su liofilización y el contenido de agua de los liposomas tienen un efecto sobre el tamaño de partícula. La Figura 3 muestra un gráfico del tamaño de partícula en función del contenido de agua de los liposomas a tres velocidades de congelación diferentes. Tiene un efecto sobre el tamaño de partícula.

El medio de rehidratación también afecta al tamaño de partícula del liposoma. Se ensayaron agua, dextrosa al 5 % en agua (D5W) y NaCl al 0,9 %. El NaCl al 0,9 % y la dextrosa al 5 % en agua mantienen el tamaño de partícula del liposoma. La tabla siguiente muestra los resultados de dos formaciones de liposoma diferentes con tres mediciones independientes. El diámetro promedio de los liposomas se proporciona en nanómetros (nm). La formulación F4-1 tuvo los componentes siguientes DPPC: DSPG: DSPE-PEG: MSPC: docetaxel en el % en peso siguiente 71,56: 8,15: 8,24: 8,02: 4,00 y la F4-2 tuvo los mismos componentes al 71,78: 8,06: 8,10: 8,07: 3,98 % en peso

Medio de rehidratación	Formulación	1 (nm)	2 (nm)	3 (nm)
Agua	F4-1	136	133	139
	F4-2	132	128	141
D5W	F4-1	97	101	103
	F4-2	102	104	105
NaCl al 0,9 %	F4-1	101	105	102
	F4-2	106	103	101

Se examinó la estabilidad de los liposomas tras la rehidratación. El liposoma liofilizado se rehidrató con NaCl al 0,9 % y se ensayó como se muestra esquemáticamente en la Figura 4A. La distribución del tamaño de partícula se monitorizó con un aparato de dispersión dinámica de la luz mediante barridos repetidos a lo largo de un periodo de 1 hora. Los resultados muestran que la distribución de partículas de liposoma rehidratado es estable en 1 hora (Figura 4B).

El liposoma liofilizado se almacenó a diversas temperaturas durante 9 meses. El liposoma se ensayó a 0, 1, 3, 6 y 9 meses. Se ensayó el % de encapsulación y el tamaño de partícula promedio. Los resultados de la tabla siguiente muestran que los liposomas eran estables hasta 9 meses a 4 ºC.

Tiempo de almacenamiento (mes)	Temperatura de almacenamiento -20 ºC	Temperatura de almacenamiento 4 ºC	Temperatura de almacenamiento 20 ºC
0	92,1 % (98 nm)	92,1 % (98 nm)	92,1 % (98 nm)
1	91,8 % (101 nm)	91,5 % (103 nm)	91,7 % (107 nm)
2	91,6 % (102 nm)	91,4 % (105 nm)	91,1 % (106 nm)
3	91,5 % (105 nm)	91,2 % (106 nm)	90,8 % (109 nm)
6	91,4 % (108 nm)	91,3 % (107 nm)	90,9 % (111 nm)
9	90,8 % (112 nm)	90,5 % (110 nm)	90,2 % (116 nm)

EJEMPLO 2

Distribución de fármaco *in vivo* obtenida con los liposomas de la descripción en comparación con la obtenida con docetaxel libre.

Se separaron aleatoriamente seis ratones BALB/c hembra (20 ± 2 g) en 3 grupos. Los ratones se anestesiaron y se pusieron en un tablero de Styrofoam con un orificio en él. Se hizo pasar una pata del ratón a través del orificio hacia el otro lado del tablero. El tablero se hizo flotar en un baño de agua para calentar la pata a 43,5 ± 0,5 ºC durante 15 min. A continuación, los ratones recibieron una inyección de liposomas en la vena caudal a una dosis de 10 mg/kg o la misma dosis de taxotere (control: preparado según las especificaciones del fabricante). A continuación se calentó la pata de cada uno de los ratones durante 30 min tras la inyección y, a continuación, se sacrificaron. Se extirparon los músculos de las patas calentadas y no calentadas. El fármaco se extrajo a partir de un peso fijo de tejido muscular usando el procedimiento de extracción descrito anteriormente. El fármaco extraído se analizó mediante HPLC. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

	Liposoma de docetaxel		Docetaxel	
	% de $A_{fármaco}/A_{ref}$ (pata calentada)	% de $A_{fármaco}/A_{ref}$ (pata no calentada)	% de $A_{fármaco}/A_{ref}$ (pata calentada)	% de $A_{fármaco}/A_{ref}$ (pata no calentada)
Grupo 1	13,3	4,9	5,46	5,48
Grupo 2	14,3	5,60	6,53	6,29
Grupo 3	11,1	5,69	5,48	5,32

Los datos muestran que el liposoma sensible a la temperatura entregó más del doble de docetaxel a la pata calentada que a la pata no calentada.

EJEMPLO 3

Distribución de fármaco *in vivo* obtenida con los liposomas de la descripción en comparación con la obtenida con liposoma que contiene docetaxel no termosensible.

El liposoma termosensible y el liposoma no termosensible se fabricaron según la fórmula mostrada en la tabla siguiente:

Composición	Docetaxel	DPPC	DSPG	PEG-DSPE	MSPC
Termosensible	25 mg	450 mg	50 mg	50 mg	50 mg
No termosensible	25 mg	450 mg	50 mg	50 mg	0

Se separaron aleatoriamente seis ratones BALB/c hembra (20 ± 2 g) en 3 grupos. Los ratones se anestesiaron y se pusieron en un tablero de Styrofoam con un orificio en él. Se hizo pasar una pata del ratón a través del orificio hacia el otro lado del tablero. El tablero se hizo flotar en un baño de agua para calentar la pata a 43,5 ± 0,5 ºC durante 15 min. A continuación, el ratón recibió una inyección de liposomas en la vena caudal a una dosis de 10 mg/kg o la misma dosis de taxotere (control: preparado según las especificaciones del fabricante). A continuación se calentó la pata de cada uno de los ratones durante 30 min tras la inyección y, a continuación, se sacrificaron. Se extirparon los músculos de las patas calentadas y no calentadas. El fármaco se extrajo a partir de un peso fijo de tejido muscular usando el procedimiento de extracción descrito anteriormente. El fármaco extraído se analizó mediante HPLC. Los

resultados se muestran en la tabla siguiente.

Grupo	Liposoma termosensible		Liposoma no termosensible	
Calentamiento/Sin calentamiento	Calentado	No calentado	Calentado	No calentado
% de $A_{fármaco}/A_{ref}$	0,704	0,428	0,443	0,444

En el grupo del liposoma termosensible, la concentración de fármaco en el tejido calentado es aproximadamente 2 veces superior a la del tejido no calentado. En la inyección de docetaxel (Ejemplo 2) y en los grupos de liposoma no termosensible la concentración de fármaco es la misma entre el tejido calentado y no calentado. Estos resultados mostraron que el liposoma termosensible realmente liberaba el fármaco en condiciones experimentales.

EJEMPLO 4

Eficacia *in vivo* del docetaxel entregado usando los liposomas de la descripción en comparación con la del docetaxel libre en ratones portadores de carcinoma pulmonar de Lewis.

Se usaron doce ratones Kunming hembra, de entre 7-9 semanas de edad que pesaban 20 ± 2 g. Se implantaron subcutáneamente células del carcinoma pulmonar de Lewis (3×10^6 células en 0,1 ml de PBS.) en la pata inferior derecha de cada ratón. Se permitió que los tumores crecieran hasta 4-6 mm de diámetro antes de iniciar el tratamiento.

Los 12 ratones se estratificaron por volumen de tumor y se aleatorizaron a 3 grupos de tratamiento: solución salina, docetaxel libre y los liposomas termosensibles de la descripción.

Grupo	Animales/Grupo	Tratamiento	Dosis mm^2	Tiempo de calentamiento (min)
1	2	Solución Salina	0	30
2	4	Inyección de docetaxel	75	30
3	6	Liposoma de docetaxel termosensible	75	30

Los liposomas termosensibles que contenían docetaxel de la descripción se prepararon como se ha descrito anteriormente y se almacenaron a 2-8 ºC hasta su uso. Los animales tratados fueron inyectados con 75 mg/m^2 de docetaxel en un liposoma termosensible de la descripción o como taxotere no liposomal preparado según las especificaciones del fabricante.

El tratamiento se inició en el día 8 de la implantación del tumor y se repitió en el día 12 y el día 16. Los ratones de todos los grupos de tratamiento se anestesiaron con una inyección IP de pentobarbital (80 mg/kg); el tratamiento se administró en un volumen de 0,2 ml a través de inyección en la vena caudal. Esta dosis de anestesia proporcionó una inmovilización adecuada para el periodo de tratamiento de 1 h.

Excepto al grupo salino, se administró a todos los grupos de tratamiento una dosis equivalente de 75 mg/m^2 de docetaxel. Inmediatamente después de la inyección, los ratones se colocaron en soportes especialmente diseñados que permitían que el tumor de la pata aislada estuviera colocado en un baño de agua durante 30 minutos. La temperatura del baño de agua se ajustó a 43 ºC. Esta temperatura del baño de agua ha sido calibrada previamente para dar temperaturas del tumor de 42 ºC. El tratamiento se repitió los días 12 y 16. Todos los ratones se sacrificaron en el día 18. Los tumores se extirparon quirúrgicamente y se registraron los pesos del tumor. La inhibición del crecimiento del tumor se calculó como se indica a continuación:

Inhibición del crecimiento del tumor = (Vs-Vx)/Vs

donde: Vs es el volumen del tumor del grupo salino, Vx es el volumen del tumor del grupo de tratamiento.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Grupo	N.º de ratones	Peso del tumor	Promedio	% de inhibición
Solución Salina	1	5,874	4,537	0
	2	3,199		

Inyección de docetaxel	3	0,500	1,002	77,91
	4	0,118		
	5	1,380		
	6	2,010		
Liposoma de docetaxel termosensible	7	0,031	0,0785	98,27
	8	0,009		
	9	0,078		
	10	0,152		
	11	0,151		
	12	0,050		

La entrega de docetaxel en una formulación de liposoma termosensible y el calentamiento local del tumor derivaron en mayor inhibición del tumor que la entrega de docetaxel por sí solo. En dos ratones tratados con liposoma termosensible, los tumores casi desaparecieron.

EJEMPLO 5

Preparación de un liposoma termosensible que contiene carboplatino

Los liposomas se pueden preparar usando cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. Una técnica adecuada es como se indica a continuación.

Los liposomas se fabricaron con lípidos incluidos en la tabla siguiente.

Lípidos	Peso (mg)
DPPC	2000
MSPC	150
DSPG	250
DSPE-mPEG	250

Disolver los lípidos en 3 ml de cloroformo. Rotoevaporar el cloroformo a 60 ºC a presión reducida para formar una película fina. Continuar calentando durante 40 minutos para eliminar el disolvente orgánico. Añadir 25 ml de agua para hidratar la película de lípido seca a 60 ºC durante 10 minutos. Reducir la presión a temperatura ambiente para eliminar las burbujas de aire durante 10 minutos. Calentar durante otros 10 minutos a 60 ºC. Extruir la suspensión de lípido a través de una membrana de 200 nm 10 veces. Extruir a través de una membrana de 100 nm 4 veces. Los liposomas así preparados se pueden almacenar a 4 ºC.

A continuación, los liposomas se pueden cargar con un agente activo, por ejemplo, con carboplatino, usando cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. Una técnica adecuada es como se indica a continuación.

Añadir 800 mg de carboplatino y 1000 mg de lactosa en 20 ml de liposomas vacíos con 106 mg de liposomas/ml. Calentar la mezcla a 60 ºC en un baño de agua y agitar a 300 r/min durante 30 minutos. Los liposomas cargados se pueden almacenar a 4 ºC.

El fármaco en exceso se puede eliminar de los liposomas cargados usando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo cromatografía de exclusión por tamaño o diálisis. Una técnica adecuada es como se indica a continuación:

La solución de liposoma cargado se puede poner en una bolsa de diálisis (corte molecular: 8000~14 000). La solución se puede someter a diálisis del liposoma con 200 ml de solución de lactosa al 5 % a 4 ºC durante 2 horas. Sustituir la solución de diálisis con 200 ml de solución de lactosa al 5 % fresca y someter a diálisis durante otras 2 horas a 4 ºC. Los liposomas cargados se pueden retirar de la bolsa de diálisis y almacenar a 4 ºC. Los liposomas cargados se deben proteger de la exposición a la luz.

EJEMPLO 6

Caracterización física de liposomas que contienen carboplatino

Tras la separación del liposoma cargado de fármaco del fármaco libre, el liposoma tiene una proporción

fármaco/lípidos de 0,04, como se ve en la tabla siguiente, y un tamaño de partícula promedio de 95 nm (Figuras 5 y 6). La concentración de lípidos es de 106 mg/ml.

Tamaño de partícula del liposoma	Fármaco total	Fármaco libre	% de encapsulación	Fármaco/Lípidos
100 nm	4,63 mg/ml	0,0 mg/ml	100 %	0,04

Puesto que el liposoma de carboplatino necesita estar diluido en su aplicación clínica, se ensayó la estabilidad de los liposomas que contienen carboplatino de la descripción usando una solución de glucosa al 5 % y agua como diluyentes. La estabilidad del liposoma en estos diluyentes se ensayó diluyendo 10 µl del liposoma con 990 µl de los diluyentes, a temperatura ambiente durante 6 horas. La pérdida de fármaco tras la dilución se analizó comparando la encapsulación de fármaco antes y después de la dilución. La tabla siguiente muestra los resultados obtenidos. Los datos mostraron que el liposoma de carboplatino es compatible con agua o glucosa al 5 %.

Diluyentes	Pérdida de fármaco	Promedio
Glucosa al 5 %	0,23 %	0,19 %
	0,23 %	
	0,12 %	
Agua	-0,35 %	-0,08 %
	0,00 %	
	0,12 %	

EJEMPLO 7

Caracterización del perfil de liberación de fármaco de liposomas que contienen carboplatino

Se analizó el perfil de liberación de fármaco a 37 ºC y 42 ºC. El procedimiento detallado es como se indica a continuación:

Se equilibraron baños de agua a 38 ºC y 43 ºC, respectivamente (la temperatura de la muestra de ensayo es 1 grado inferior a la del baño de agua). Se diluyeron alícuotas de 1,0 ml de liposoma en 9,0 ml de una solución de glucosa al 5 %. 5 ml de la solución diluida se calentaron en el baño de agua a 38 ºC. Los restantes 5 ml de la solución diluida se calentaron en el baño de agua a 43 ºC. Se tomaron muestras de 200 µl de cada temperatura en diversos momentos temporales posteriores al inicio del calentamiento. Se tomaron muestras a los 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 min para la muestra a 42 ºC y a los 0, 2, 8, 32 y 128 min para la muestra a 37 ºC. Las muestras se enfriaron en agua helada inmediatamente después de ser tomadas.

Se analizó la concentración de fármaco total y fármaco libre en las muestras. El fármaco liberado se calculó mediante la ecuación siguiente:

Liberación de fármaco = C libre/C total x 100%

La tabla siguiente y la Figura 7 muestran los resultados obtenidos.

Tiempo (min)	0	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
42 ºC (%)	0,9	18,5	69,3	83,2	95,3	95,3	95,3	95,8	97,0	99,5	99,0
37 ºC (%)	0,9				0,8		0,9		1,0		1,9

Estos datos indican que los liposomas de la descripción liberan fármaco rápidamente tras su calentamiento.

Para caracterizar adicionalmente el perfil de liberación de fármaco de los liposomas de la descripción, se ensayó la liberación de fármaco de liposomas que contenían carboplatino a diversas temperaturas de 37 ºC a 43 ºC a los 5 y 10 minutos de su calentamiento. La tabla siguiente y la Figura 8 muestran el % de fármaco liberado. A 37 ºC, casi no hay liberación de fármaco, mientras que empezando a 40 ºC, el fármaco se libera rápidamente.

Temperatura (°C)	37	38	39	40	41	42	43
5 min	0,9 %	2,6 %	5,6 %	17,4 %	78,5 %	98,2 %	95,4 %
10 min	0,9 %	4,6 %	21,8 %	48,7 %	85,5 %	96,6 %	95,8 %

EJEMPLO 8

Caracterización de la estabilidad de liposomas que contienen carboplatino

Se evaluó la pérdida de fármaco durante el almacenamiento a diferentes temperaturas.

Los liposomas se almacenaron a -20 ºC, 4 ºC y 25 ºC durante 5 o 10 días. Se analizó el % de encapsulación del fármaco. Los resultados presentados en la tabla siguiente muestran que los liposomas de la descripción son estables a 4 ºC durante 10 días.

Temperatura	4 ºC		25 ºC	
Tiempo (día)	5	10	5	10
Pérdida	0,01 %	0,01 %	1,55 %	2,52 %

Para determinar si los liposomas de la descripción se pueden esterilizar mediante filtración, se analizó su estabilidad a la filtración. Se filtraron alícuotas de 2 ml de liposoma a través de un filtro de 0,22 µm. El % de fármaco encapsulado se analizó antes y después de la filtración. Los datos de la tabla siguiente muestran que el liposoma puede ser filtrado a volumen pequeño.

	Antes de la filtración	Después de la filtración
Pérdida (%)	0 %	0,62 %

La estabilidad a largo plazo de los liposomas se evaluó almacenando los liposomas a 4 ºC. La pérdida de fármaco se evaluó a 0, 1 y 2 meses. Como se muestra en la tabla siguiente, los liposomas de la descripción son estables a 4 ºC durante al menos 6 meses.

Tiempo (mes)	Contenido de fármaco	Pérdida	Tamaño de partícula
0	4,63 mg/mL	0,00 %	99,79 nm
1	4,60 mg/mL	0,03 %	106,01 nm
2	4,62 mg/mL	0,09 %	99,24 nm
3	4,59 mg/mL	0,14 %	101,78 nm
6	4,60 mg/mL	0,24 %	100,09 nm

REIVINDICACIONES

1. Un liposoma termosensible que comprende dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), monoestearoilfosfatidilcolina (MSPC), diestearoilfosfatidiletanolamina modificada con PEG-2000 (DSPE-PEG2000) y un agente activo en la proporción de 60-80:6-12:6-12:4-15:1-30 en peso, donde el liposoma tiene una temperatura de transición de fase gel a líquida de 39,0 ºC a 45 ºC.

2. Un liposoma termosensible según la reivindicación 1, donde el agente activo es un agente anticancerígeno.

3. Un liposoma termosensible según la reivindicación 2, donde el agente anticancerígeno se selecciona del grupo que consiste en agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales antimitóticos, antibióticos antitumorales citotóxicos, inhibidores de topoisomerasas, anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos, fotosensibilizadores, inhibidores de quinasas, enzimas antitumorales e inhibidores de enzimas, inductores de la apoptosis, modificadores de la respuesta biológica, antihormonas, retinoides y compuestos que contienen platino.

4. Un liposoma termosensible según la reivindicación 3, donde el agente anticancerígeno es un taxano, tal como docetaxel o paclitaxel.

5. Un liposoma termosensible según la reivindicación 3, donde el agente anticancerígeno es un compuesto que contiene platino, tal como carboplatino o cisplatino.

6. Un liposoma termosensible según la reivindicación 3, donde el agente anticancerígeno es un antimetabolito que se dirige al metabolismo de la pirimidina, tal como capecitabina, citarabina, fluoracilo, floxuridina y gemcitabina.

7. Una composición farmacéutica que comprende un liposoma termosensible de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, para uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad en un sujeto con necesidad del mismo, que comprende:

administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica de la reivindicación 7 y

calentar un área del sujeto que comprende toda o una parte de la enfermedad.

9. La composición terapéutica para uso de la reivindicación 8, donde la enfermedad es cáncer y el agente activo es un agente anticancerígeno.

10. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 8, donde el tejido diana se calienta antes y/o durante y/o después de la administración de la composición termosensible.

11. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 8, donde el tejido diana es calentado mediante medios adecuados seleccionados del grupo que consiste en: aplicación de radiación de radiofrecuencia, aplicación de ultrasonido que puede ser ultrasonido focalizado de alta intensidad, aplicación de radiación de microondas, cualquier fuente que genere radiación infrarroja tal como un baño de agua caliente, luz, así como radiación aplicada externamente o internamente tal como la generada por radioisótopos, campos eléctricos y magnéticos y/o combinaciones de los anteriores.

FIGURA 1

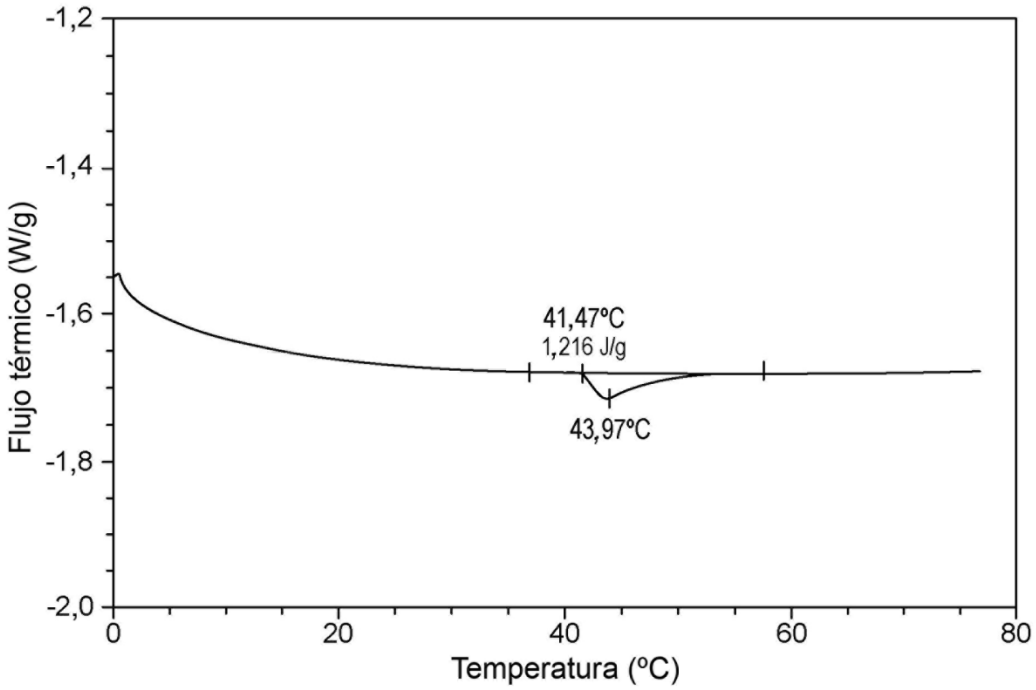
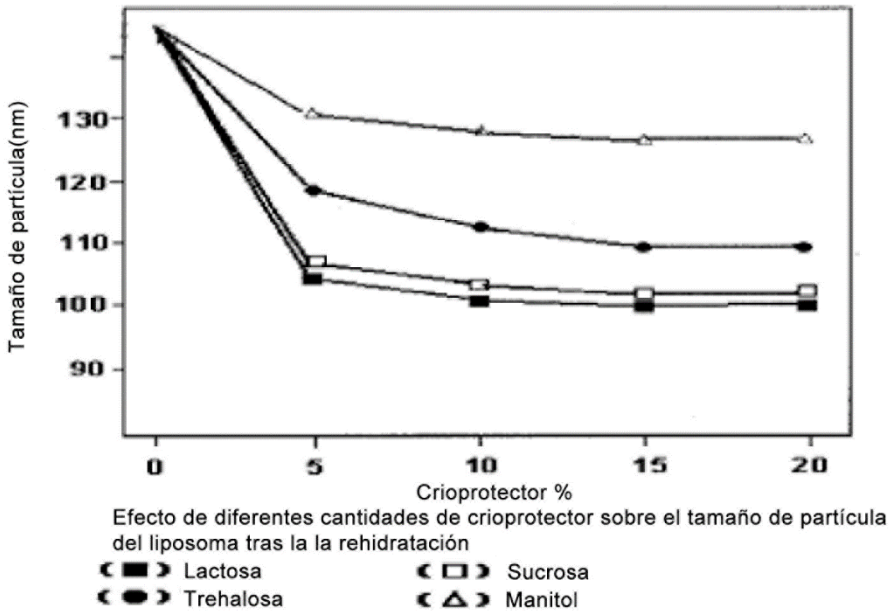
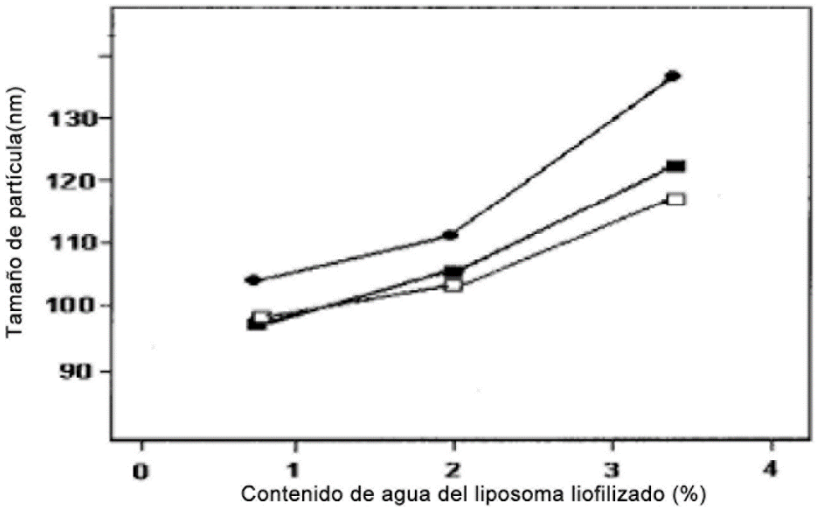

-1,2
-1,4
-1,6
-1,8
-2,0
Flujo térmico (W/g)
41,47°C
1,216 J/g
43,97°C
0
20
40
60
80
Temperatura (°C)

FIGURA 2



Efecto de diferentes cantidades de crioprotector sobre el tamaño de partícula del liposoma tras la la rehidratación

FIGURA 3



Efecto del diferente modo de congelación y el contenido de agua del liposoma liofilizado sobre el tamaño de partícula del liposoma tras la rehidratación

(■) 0,5°C/min (□)1,5°C/min (●) >20°C/min

FIGURA 4A

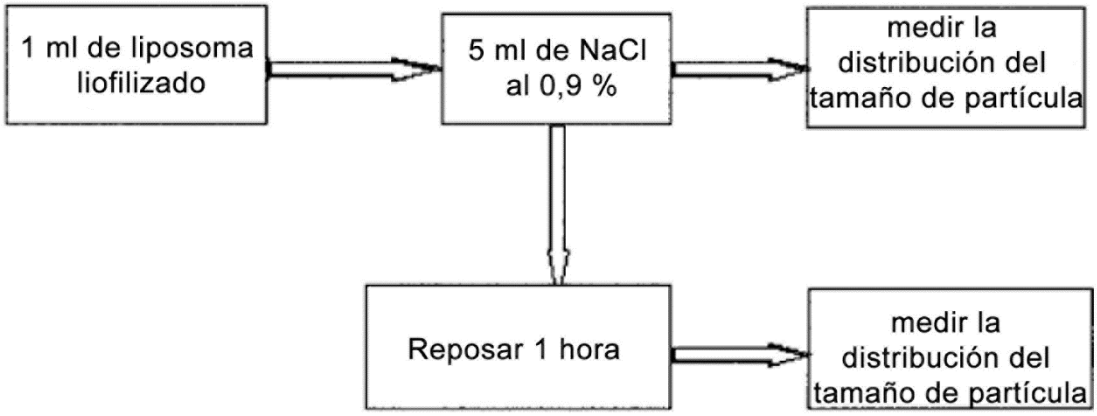


FIGURA 4B

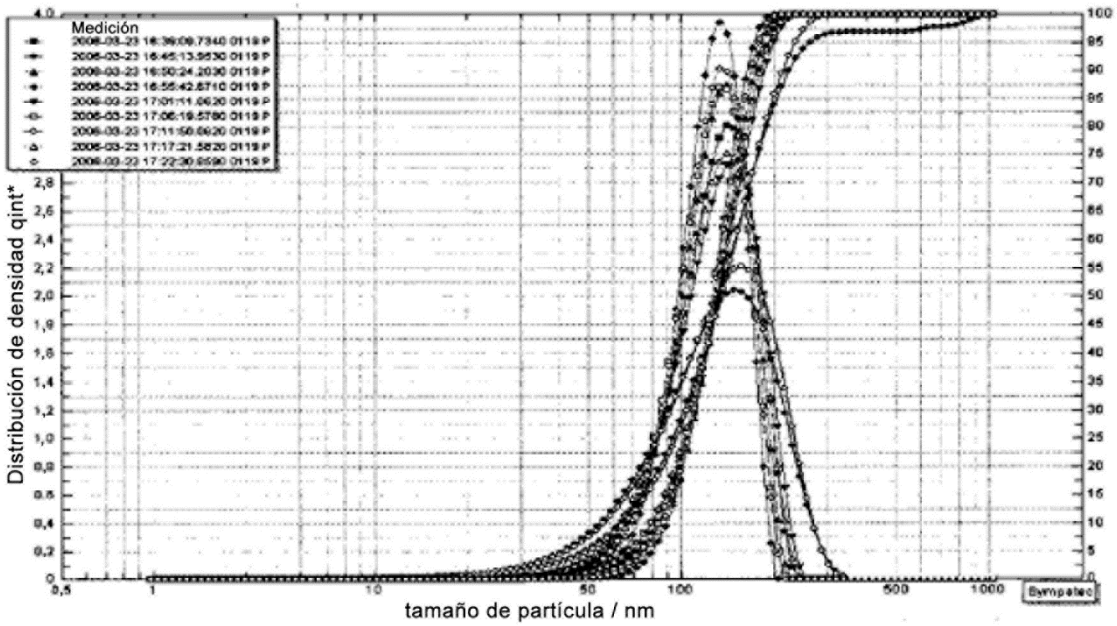


FIGURA 5

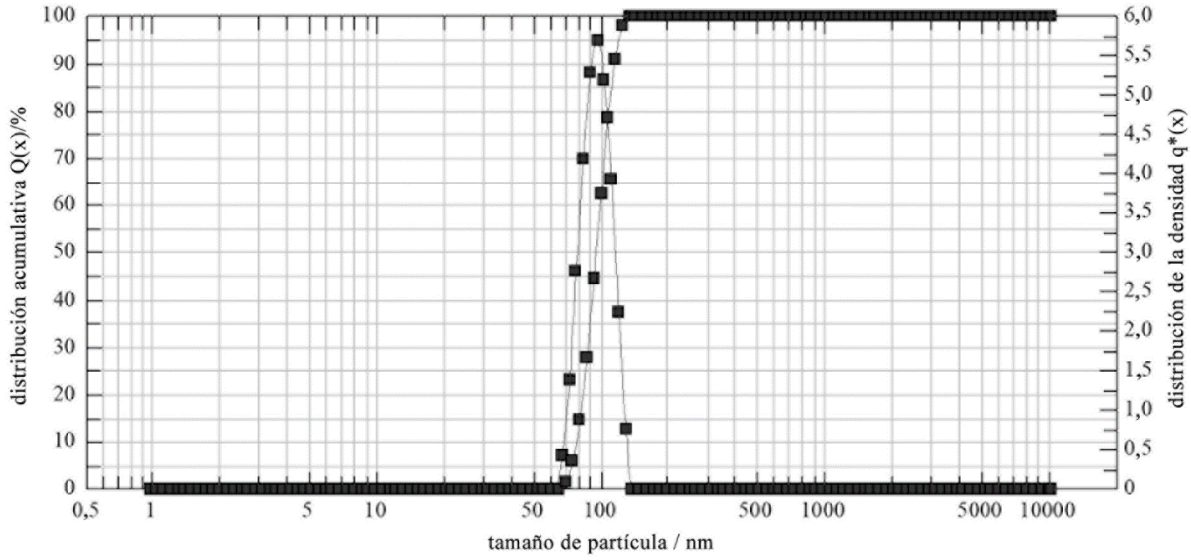

distribución acumulativa Q(x)/%
distribución de la densidad q*(x)
tamaño de partícula / nm
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0,5
1
5
10
50
100
500
1000
5000
10000
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
4,5
5,0
5,5
6,0

FIGURA 6

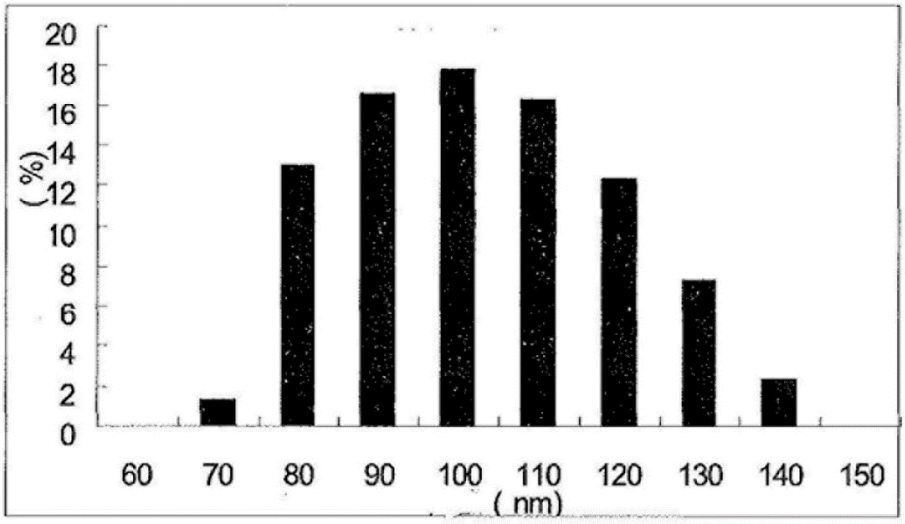


FIGURA 7

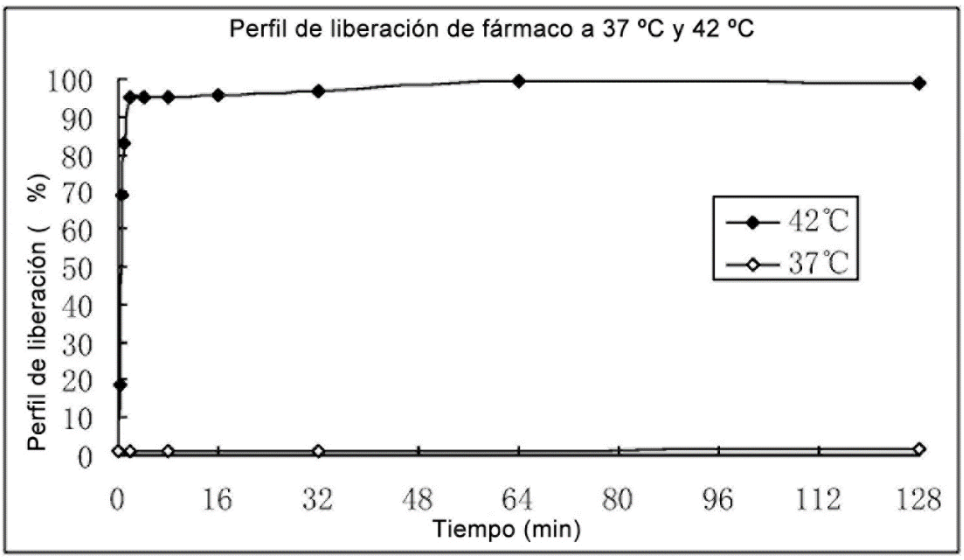
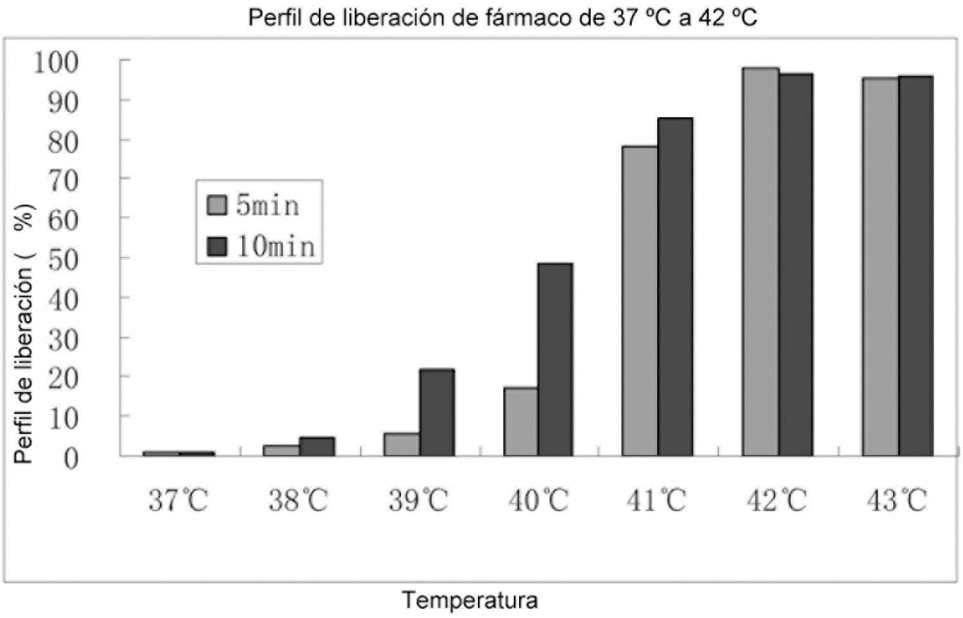

Perfil de liberación de fármaco a 37 ºC y 42 ºC
Perfil de liberación (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
16
32
48
64
80
96
112
128
Tiempo (min)
42℃
37℃

FIGURA 8


Perfil de liberación de fármaco de 37 ºC a 42 ºC
Perfil de liberación (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
5min
10min
37℃
38℃
39℃
40℃
41℃
42℃
43℃
Temperatura