

444.298

PATENTE DE INVENCIÓN
Ref. 210.B100 ES/452.
=====

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LIPOSOMAS.
=====

Int. Cl.: B01D ; B61K

Solicitante: BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE, entidad norte americana, residente en 7, route de Drize, 1227 CAROU GE GENEVE, Suiza.
=====

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de liposomas.

Como es sabido, el término "liposomas" designa glóbulos microscópicos, que poseen un diámetro máximo del orden de 10.000 Å, con preferencia compren

5 dido entre 300 y 2.000 Å, delimitados por una pared formada por al menos una capa bimolecular (de un espesor del orden de 30 a 100 Å) de un compuesto de fórmula general X-Y, siendo X un agrupamiento polar hidrófilo y siendo Y un agrupamiento no polar hidrófobo, encerrando estos glóbulos un líquido acuoso -por ejemplo una solución acuosa de al menos una sustancia biológicamente activa- y siendo generalmente en forma de una dispersión coloidal en un medio líquido acuoso como una solución salina, en particular una solución de cloruro de sodio al 10 0,9 % de NaCl en peso (suero fisiológico).

15 La preparación de liposomas constituye un medio de capsulado muy práctico y muy eficaz para un líquido acuoso y es particularmente útil con vistas a la administración en el organismo de seres vivos de sustancias biológicamente activas, en particular medicamentos, evitando la destrucción de estas sustancias en el organismo (por ejemplo bajo el efecto de los jugos gástricos ó intestinales) antes de que estas sustancias alcancen el órgano donde deban actuar.

20 Gracias a la selección del compuesto de fórmula X-Y utilizado para formar la pared de los liposomas, es en efecto posible formar liposomas cuyas paredes resistan a la acción de ciertos medios del organismo y no sean atacados sino en presencia de medios que no existen mas que en los órganos donde deba ser liberada la sustancia biológicamente activa.

25 Se conocen dos procedimientos de preparación de liposomas.

30 Uno de estos procedimientos consiste en poner un líquido en presencia del líquido acuoso que se desea capsular, y en calentar la mezcla heterogénea así obtenida, a temperatura ligeramente superior a la temperatura ambiente, y des-

pués someterla a una agitación energética seguida de la acción de una vibración de frecuencia ultrasónica.

5 El otro procedimiento consiste en disolver un compuesto de fórmula X-Y (teniendo X e Y la significación indicada mas arriba), por ejemplo un lípido, en un disolvente volátil, en formar una película de este compuesto sobre las paredes de un recipiente, evaporando éste de la solución así obtenida, en introducir, en este mismo recipiente, el líquido que se desea capsular en los liposomas y, finalmente, en someter este líquido, en este recipiente, a la acción de una
10 vibración de frecuencia ultrasónica.

Estos dos procedimientos necesitan por tanto disponer de un volumen total del líquido que se desea capsular mucho mayor que el volumen de este líquido que se halla finalmente contenido en los liposomas obtenidos. Según estos procedimientos, los liposomas se forman en efecto en estado de dispersión coloidal de esférulas en una fase líquida que está constituida por una fracción del líquido que ha de capsularse que no se retiene en el interior de los liposomas. La
15 relación del volumen de líquido capsulado en el interior de los liposomas con respecto al volumen total de este líquido es en general del orden de 1 a 10 %.

Por consiguiente, si el líquido susceptible de ser capsulado presenta un gran valor -lo que es el caso mas general cuando este líquido es una solución de una sustancia biológicamente activa- es necesario recuperar la fracción de este líquido no capsulado a fin de utilizarla para otras operaciones de formación de liposomas. Esta recuperación implica la separación de los liposomas de este líquido y después
25 la purificación del mismo y, en general, el reajuste de su
30

concentración en sustancia activa (en efecto las operaciones de separación y de purificación citadas entrañan la utilización de volúmenes mas ó menos grandes de disolventes y, por consiguiente, una modificación de la concentración del líquido que contiene la sustancia activa).

5

La necesidad de efectuar tales operaciones de purificación y de reajuste de la concentración del líquido que contiene la sustancia activa hace los dos procedimientos de fabricación de liposomas que se describen anteriormente difíciles de realización a escala industrial.

10

La presente invención tiene por objeto remediar este inconveniente al permitir fabricar liposomas utilizando integralmente, para cada preparación de liposomas, el volumen de líquido que ha de capsularse.

15

A este respecto, el procedimiento según la invención se caracteriza por el hecho de que se dispersa, bajo el efecto de una vibración de frecuencia ultrasónica, un primer líquido acuoso en un líquido que tenga una solubilidad en agua escasa ó nula y una densidad inferior a la del agua, en presencia de al menos un compuesto de fórmula general X-Y, siendo X un agrupamiento polar hidrófilo y siendo Y un agrupamiento no polar hidrófobo, para formar una dispersión coloidal de glóbulos de este líquido acuoso, delimitados por una película monomolecular del compuesto de fórmula X-Y, que se pone a continuación esta dispersión en contacto con un segundo líquido acuoso, para formar una mezcla heterogénea que comprende una capa líquida superior, constituida por esta dispersión y una capa líquido inferior, constituida por el segundo líquido acuoso, estando separadas estas dos capas por una película monomolecular del compuesto de fórmula X-Y, y

20

25

30

que se somete esta mezcla a una centrifugación con una velocidad angular suficiente para que los glóbulos del primer líquido acuoso dispersados en la capa superior sean llevados por gravedad a la capa inferior a través de la película del compuesto de fórmula X-Y que separa estas dos capas.

5

Así este procedimiento se compone de dos fases. En el curso de la primera fase, se forma, bajo el efecto de una vibración ultrasónica, una dispersión de glóbulos del líquido que ha de capsularse, teniendo estos glóbulos dimensiones coloidales (es decir, un diámetro del orden de 200 a 1.000 Å) en un líquido insoluble ó escasamente solubles en agua. Estos glóbulos están delimitados por una película monomolecular del compuesto X-Y cuyos agrupamientos hidrófilos X se vuelven hacia el interior de los glóbulos, ocupada por el líquido acuoso, estando por el contrario vueltos los agrupamientos hidrófobos Y hacia el exterior de los glóbulos que consiste en una fase no acuosa. Estos glóbulos, aunque no constituyen propiamente dicho liposomas, puesto que no están delimitados por una capa bimolecular del compuesto X-Y, sino solamente por una película monomolecular de este compuesto, pueden sin embargo considerarse como un esbozo de liposomas, conteniendo cada uno el mismo volumen del líquido que ha de capsularse que los liposomas obtenidos finalmente. En el curso de la presente descripción, estos glóbulos serán pues designados por el término "precursor de liposomas".

10

15

20

25

Dosificando convenientemente las proporciones respectivas del líquido acuoso susceptible de ser capsulado, del líquido escasamente soluble ó insoluble en agua y del compuesto de fórmula X-Y, en el curso de esta primera parte del procedimiento, es posible obtener el capsulado en los precursor-

30

res de liposomas de la totalidad del líquido que ha de capsularse utilizado. El procedimiento según la invención permite pues evitar las operaciones de recuperación, de purificación y de reajuste de la concentración del líquido que ha de capsularse que son, como se ha indicado mas arriba, necesarias en el curso de la puesta en práctica de los procedimientos conocidos de fabricación de liposomas.

Se comprenderá igualmente que el procedimiento según la invención permite capsular gracias a la formación de liposomas líquidos de los cuales solo se dispone de pequeñas cantidades, por ejemplo del orden de 0,05 a 0,1 milímetros, que serían insuficientes para permitir la puesta en práctica de los procedimientos conocidos de fabricación de liposomas descritos mas arriba.

Por lo tanto, el procedimiento según la invención puede encontrar aplicaciones en campos, como ciertos trabajos de laboratorios de investigación ó de análisis, en los cuales los procedimientos conocidos de fabricación de liposomas serían inaplicables.

La segunda fase del procedimiento consiste en formar los liposomas propiamente dichos. Puede suponerse que esta formación resulta del hecho de que, atravesando la película monomolecular del compuesto de fórmula X-Y que se halla colocada en la interfase entre la capa líquida superior no acuosa y la capa líquida inferior acuosa (la formación de tal película monomolecular se desprende, de manera conocida per se, de las propiedades de este compuesto: los agrupamientos hidrófilos X son en efecto atraídos por la capa líquida acuosa en tanto que los agrupamientos Y hidrófobos permanecen en el seno de la capa no acuosa líquida), cada precursor de liposomas

arrastra una parte de esta película que se asocia con la película monomolecular del compuesto X-Y que lo delimita formando una película bimolecular de este compuesto, característica de los liposomas.

5 Como compuesto de fórmula X-Y puede utilizarse por ejemplo un compuesto en el cual el agrupamiento hidrófilo X sea uno de los grupos siguientes: fosfato, carboxilo, sulfato, amino, hidroxilo y colina y el agrupamiento hidrófobo Y sea uno de los grupos siguientes: grupo hidrocarburo alifático saturado ó no saturado (por ejemplo, alquilo, ó alquileno), grupo hidrocarburo alifático sustituido por al menos un resto aromático ó cicloalifático.

10 Con preferencia, se utiliza como compuesto de fórmula X-Y un fosfolípido ó una sustancia emparentada con los fosfolípidos, en particular uno de los compuestos siguientes: lecitina, fosfatidil-etanolamina, isolecitina, isofosfatidil-etanolamina, fosfatidilserina, fosfatidil-inositol, esfingomielina, cardiolipina, ácido fosfatídico y los cerebrósidos.

15 Puede igualmente utilizarse como compuesto de fórmula X-Y una mezcla de al menos un fosfolípido y de al menos otro lipóide perteneciente a una categoría diferente de la de los fosfolípidos. En particular, se puede utilizar a tal fin uno de los compuestos siguientes: estearilamina, dicetilfosfato, colesterol y tocoferol.

20 Como líquido que tenga una solubilidad en agua escasa ó nula y una densidad inferior a la del agua, se utiliza, con preferencia, un líquido orgánico, constituido en particular por uno de los compuestos siguientes: benceno, un derivado halogenado ó alquilado del benceno, un éter óxido alifático, una cetona alifática, un aldehído alifático, un éster

25

30

alifático, un hidrocarburo alifático ó un hidrocarburo ciclo-
alifático ó por una mezcla, que tenga una densidad inferior
a la del agua, de varios compuestos.

5 La elección del primer líquido acuoso, es decir,
del líquido que ha de capsularse en los liposomas, puede ha-
cerse prácticamente sin otras limitaciones que las que son
dictadas por la utilización prevista para los liposomas.

10 Con preferencia, se emplea, como líquido acuoso,
una solución de al menos una sustancia biológicamente activa,
en particular de una enzima, de un medicamento como un anti-
biótico, etc.

15 Como segundo líquido acuoso, puede utilizarse agua
pura ó cualquier otro líquido acuoso apropiado. Con preferen-
cia, se utiliza un líquido que se destina a servir de medio
final de dispersión para los liposomas en el curso de su uti-
lización, por ejemplo una solución acuosa de cloruro sódico.
En particular, puede utilizarse una solución acuosa de cloru-
ro sódico denominada suero fisiológico que posee una concen-
tración de 0,15 mol de ClNa por litro (0,9 % en peso), con
20 vistas a obtener directamente, en el curso de la segunda fa-
se del procedimiento, una dispersión de liposomas en medio
inyectable en el organismo humano. Aparece así otra ventaja
del procedimiento según la invención, con respecto a los pro-
cedimientos conocidos de fabricación de liposomas, que es la
25 de permitir la obtención directa de una suspensión de liposo-
mas en un medio acuoso elegido en función de la utilización
final de los liposomas.

30 Bien entendido, es igualmente posible separar los
liposomas del segundo líquido acuoso, por ejemplo si se desea
evitar la presencia de cualquier traza de la sustancia activa

no capsulada en el curso de la utilización final de los liposomas. Esta separación puede efectuarse fácilmente por cualesquiera medios conocidos apropiados, por ejemplo por cromatografía sobre gel.

5

Ejemplo 1

Se capsula una solución acuosa de amiloglucosidasa - que contiene 10 mg. de amiloglucosidasa por mililitro de solución, en una solución acuosa de cloruro sódico a 0,15 mol por litro - procediendo de la forma siguiente:

10

Se agrega 54 mg. de lecitina y 0,1 ml. de dicha solución acuosa de amiloglucosidasa a 3 ml. de dibutiléter y se somete la mezcla heterogénea así obtenida a un tratamiento con ultrasonidos (frecuencia: 17 kHz; potencia de salida: 70 vatios) durante 2 minutos, manteniéndola a una temperatura inferior a 30° C. por medio de un baño refrigerante.

15

Se obtiene así un líquido transparente, de aspecto homogéneo, que presenta reflejos azulados. Se deposita una capa de este líquido en un tubo de centrifugación sobre una capa de 1,5 ml. de solución acuosa de cloruro de sodio a 0,15 mol por litro. Se obtiene así una mezcla bifásica compuesta por una capa inferior constituida por una fase acuosa (la solución de cloruro sódico) y por una capa superior constituida por la fase orgánica formada por tratamiento con ultrasonidos a partir de la mezcla de dibutiléter, lecitina y solución de amiloglucosidasa.

20

25

Se somete esta mezcla bifásica a una centrifugación a 30.000 vueltas por minutos, durante 30 minutos. Tras lo cual se separa la capa superior (fase orgánica) y se somete la capa inferior (fase acuosa) a una nueva centrifugación a

30.000 vueltas por minuto, durante 30 minutos. Se obtiene un líquido claro, ligeramente azulado y un "residuo" de escaso volumen constituido por lípido (lecitina) no dispersado, que se rechaza. Este líquido claro consiste en una suspensión de liposomas -que poseen dimensiones coloidales- que contiene la solución acuosa de amiloglucosidasa, en una solución acuosa de cloruro de sodio de 0,15 M y contiene igualmente una pequeña cantidad de amiloglucosidasa no capsulada.

Siguiendo las utilizaciones previstas, puede utilizarse esta suspensión de liposomas ya sea tal cual ó bien tras eliminación de la amiloglucosidasa no capsulada, por cromatografía sobre gel (por ejemplo por medio de un gel de separosa).

Ejemplo 2

Se procede de la misma forma que en el ejemplo 1, pero utilizando, como solución susceptible de capsulado, 0,05 ml. de una solución acuosa taponada (tapón fosfato 10 mM, pH 7,2) que contiene 100 mg/ml. de penicilamina disuelta en una solución acuosa de cloruro sódico 0,15 M, e empleando, para formar la fase orgánica sometida al tratamiento con ultrasonidos, 27 mg. de lecitina, y una mezcla de 2,4 ml. de dibutiléter y 0,6 ml. de cloroformo.

Ejemplo 3

Se procede como en el ejemplo 1, pero utilizando, como solución que ha de capsularse, 0,1 ml. de una solución de imipramina a 300 mg/ml., en una solución acuosa de cloruro sódico 0,15 M, y empleando, para formar la fase orgánica sometida al tratamiento con ultrasonidos, una mezcla de 25 mg. de lecitina y 40 mg. de colesterol y 3 ml. de dibutiléter.

Ejemplo 4

Se procede como en el ejemplo 1, pero utilizando, como solución que ha de capsularse, 0,05 ml. de una solución de fosfato disódico de betametasona a 150 mg/ml., en una solución acuosa de cloruro sódico a 0,15 M, y empleando, para formar la fase orgánica sometida al tratamiento con ultrasonidos, una mezcla de 15 mg. de lecitina y 12 mg. de fosfatidil-etanolamina y una mezcla de 2,5 ml. de dibutiléter y 0,5 ml. de cloroformo.

N O T A

Descrita suficientemente la naturaleza del invento así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LIPOSOMAS; caracterizándose por lo siguiente:

1ª.- Procedimiento para preparar liposomas, caracterizado porque se dispersa, bajo el efecto de una vibración de frecuencia ultrasónica, un primer líquido acuoso en un líquido que posee una solubilidad en agua escasa ó nula y una densidad inferior a la del agua, en presencia de al menos un compuesto de fórmula general X-Y, siendo X un agrupamiento polar hidrófilo y siendo Y un agrupamiento no polar hidrófobo, para formar una dispersión coloidal de glóbulos de este líquido acuoso, delimitadas por una película monomolecular del compuesto de fórmula X-Y; a continuación, esta dispersión se pone en contacto con un segundo líquido acuoso, a fin de formar

una mezcla heterogénea que comprende una capa líquida superior, constituida por esta dispersión y una capa líquida inferior, constituida por el segundo líquido acuoso, estando separadas estas dos capas por una película monomolecular del compuesto de fórmula X-Y; y se somete esta mezcla a una centrifugación con una velocidad angular suficiente para que los glóbulos del primer líquido acuoso dispersados en la capa superior sean llevados por gravedad a la capa inferior a través de la película de compuesto de fórmula X-Y que separa estas dos capas.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho compuesto de fórmula X-Y es un fosfolípido.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho fosfolípido es uno de los compuestos siguientes: lecitina, fosfatidil-etanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, cardiolipina, ácido fosfatídico y los cerebrósidos.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza, como compuesto de fórmula X-Y, una mezcla de al menos un fosfolípido y de al menos otro lipóide perteneciente a una categoría diferente de la de los fosfolípidos.

5ª.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque dicho otro lipóide es uno de los compuestos siguientes: estearilamina, dicetilfosfato, colesterol y tocoferol.

6ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el líquido que posee una solubilidad en el

agua escasa ó nula y una densidad inferior a la del agua es un líquido orgánico.

5 7ª.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque dicho líquido orgánico se selecciona entre el benceno, los derivados halogenados ó alquilados del benceno, los éteres-óxidos alifáticos, las cetonas alifáticas, los aldehídos alifáticos, los ésteres alifáticos, los hidrocarburos alifáticos y los hidrocarburos cicloalifáticos.

10 8ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho primer líquido acuoso es una solución acuosa de al menos una sustancia biológicamente activa.

9ª.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque dicha sustancia biológicamente activa es una enzima.

15 10ª.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque dicha sustancia biológicamente activa es un antibiótico.

20 11ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el segundo líquido acuoso es una solución acuosa de cloruro de sodio.

12ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de dicha solución acuosa de cloruro de sodio es de 0,15 mol de ClNa por litro.

13ª.- Procedimiento para preparar liposomas, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 14 hojas escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid

BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE.

14 ENE 1976

A large, stylized handwritten signature in black ink, written over the printed name of the Battelle Memorial Institute. The signature is cursive and appears to be 'J. M. ...'.