



Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

19	ES	11	NUMERO	463.427	13	A 1
		21				
		22	FECHA DE PRESENTACION	21-10-1977		

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
	31	NUMERO			
		44132/76	23-10-1976		Gran Bretaña
		34410/77	16-8-1977		"

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C08L;A61K		

54	TITULO DE LA INVENCION
	"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LIPOSOMAS"

71	SOLICITANTE (S)
	CHOAY S.A. (PL-0595-77-B)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
48, Avenue Théophile Gautier, 75782 Paris Cedex 16, Francia

72	INVENTOR (ES)
	Edgar SACHE y Henri BERTRAND

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-67.275)

1 Esta invención se refiere a nuevas composiciones farmacéuticas, que contienen heparina, y a un procedimiento para obtener tales composiciones. Conciérne, además, a aquellas composiciones capaces de ser administradas no solamente por las vías usadas hasta ahora con las composiciones convencionales de heparina, sino también por otras

5 vías.

 La heparina es muy conocida y ampliamente utilizada como medicamento o producto farmacéutico, debido a sus notables propiedades anticoagulantes. Sin embargo, hasta

10 ahora, no ha sido práctica la administración de heparina a pacientes, por otra vía distinta de la parenteral. La perfusión continua o las inyecciones intravenosas o subcutáneas, son los métodos de administración usualmente empleados.

15 Además, el periodo de actividad de las dosis de heparina administradas en las composiciones convencionales, son generalmente muy cortos, más en particular cuando se administran por vía intravenosa, lo que hace necesario repetir muy frecuentemente la administración, en particular

20 la inyección, por lo menos dos veces al día.

 Es sabido que se han emprendido ya investigaciones con vistas a producir preparaciones de heparina que puedan ser administradas bien sea por otra vía distinta de la parenteral, y especialmente por vía oral, o si la administración es por vía parenteral, tengan prolongados periodos de actividad, que permitan reducir la frecuencia de las inyecciones. Sin embargo, hasta ahora las investigaciones no han tenido éxito en encontrar un medio de administrar heparina que permita un tratamiento a largo plazo con una acti

25

30

1 - vidad más prolongada que los convencionalmente utilizados.

Esta invención intenta remediar, por lo menos en parte, estas desventajas de las composiciones convencionales.

5 El objeto de la invención es, más en particular, proporcionar preparaciones a base de heparina, cuya actividad anticoagulante sea capaz de ponerse de manifiesto por lo menos en parte, incluso cuando se administra por vía oral.

10 Otro objeto de la invención es proporcionar aquellas preparaciones de heparina que, cuando se administran por vía parenteral, poseen duraciones de acción prolongadas.

15 La preparación de la invención consiste esencialmente en liposomas con heparina retenida en ellos o sobre ellos.

20 La invención se refiere, además, a dispersiones de liposomas de este tipo, en un líquido, particularmente en un vehículo acuoso. También se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen dicha preparación o dispersiones asociadas, siempre que sea necesario, a un vehículo farmacéutico que permita su administración.

25 Se han descrito ya liposomas preparados a partir de fosfolípidos, o a partir de algunas otras sustancias lípidas o materiales grasos hidrófobos. Los liposomas están constituidos por cristales de lípidos hidratados, generalmente de una sola capa o de capas múltiples (o monolaminares o multilaminares) dispersados o dispersables en un medio acuoso, estando una parte del medio acuoso a partir del cual se produjeron los cristales, ocluida en las

30

1 vesículas formadas, como resultado de la capacidad de sus
lípidos o materiales grasos de experimentar "hinchamiento"
en un medio acuoso, especialmente bajo el efecto de una
agitación o de una radiación ultrasónica. Estos liposo-
5 mas pueden describirse también como constituídos por una
o una serie de bicapas concéntricas de los lípidos, alter-
nando con compartimientos acuosos. Cuando la solución acuo-
sa a partir de la cual se formaban los liposomas es, o con-
tiene, una solución de heparina, entonces una parte de es-
ta solución de heparina es retenida por y en los intersti-
10 cios de los liposomas, para formar las composiciones de
esta invención.

Se ha encontrado que tales liposomas, preparados
a partir de lípidos fisiológicamente aceptables y formados
dentro de una solución acuosa de heparina, tienden a pro-
15 ducir in vivo ciertos efectos biológicos característicos
de la actividad anticoagulante y de otras actividades usua-
les de la heparina, cuando se administran a sujetos por
vía oral o rectal.

Se ha encontrado, además, que las dispersiones in-
20 yectables formadas con las preparaciones de acuerdo con
la invención, son capaces, en relación con su contenido de
lípidos, de inducir una acción de tipo retardado, al ser
administradas por vía intravenosa.

La invención proporciona también un procedimiento
25 para preparar liposomas que retienen heparina, el cual pro-
cedimiento comprende someter una dispersión de lípidos fi-
siológicamente aceptables, del tipo capaz de formar lipo-
somas, preferiblemente fosfolípidos, en una solución de
30 heparina, preferiblemente una solución acuosa, a una agi-

1 tación o, preferiblemente, a la acción ultrasónica (o tratamiento ultrasónico) hasta que se forman liposomas que retienen una parte por lo menos de la heparina contenida inicialmente en la solución acuosa.

5 La heparina utilizada en esta invención puede ser, particularmente, cualquier heparina útil en terapia. Puede ser utilizada, por ejemplo, en su forma ácida, o en forma de una sal formada con uno o más cationes metálicos, tales como sodio, calcio o magnesio. Se puede utilizar cualquier otro tipo de preparación de heparina adecuada en la terapia.

10 Con la única finalidad de ilustrar los tipos de heparina que pueden ser utilizados con ventaja, entendiéndose se que tales indicaciones no deben ser consideradas como un intento de limitar el alcance de la presente invención, podría afirmarse que las heparinas que tienen pesos moleculares comprendidos entre aproximadamente 6.000 y aproximadamente 30.000 y que tienen concentraciones de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 unidades internacionales por mg (ui/mg) de heparina, pueden utilizarse con ventaja. Tales heparinas, que comprenden una gran proporción de especies de heparina, que tienen pesos moleculares comprendidos entre 10.000 y 15.000, y que tienen una concentración dentro del margen anterior, han sido utilizadas en los ejemplos que se describirán seguidamente.

25 Evidentemente, puede recurrirse a otras especies de heparina, en particular a aquellas que tienen un peso molecular bien sea superior o bien sea inferior a cualquiera de los límites superior e inferior respectivamente del margen indicado anteriormente a modo de ejemplo, para

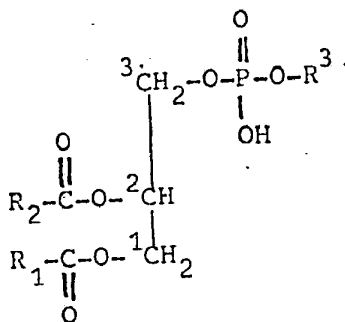
1 la preparación de un liposoma de acuerdo con la invención.

En lo que respecta a los lípidos, debe afirmarse que puede ser utilizado, adecuadamente, cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable, capaz de formar liposomas, para la realización de la invención.

5

Los fosfolípidos forman una importante clase de dichos lípidos adecuados, más en particular (aunque no exclusivamente), los fosfolípidos que tienen la fórmula

10



15

en la que R_1 y R_2 derivan de ácidos grasos, por ejemplo, de aquéllos que contienen de 14 a 22 y, preferiblemente, desde 18 a 20 átomos de carbono, y R_3 es parte de un grupo éster, el cual, en los casos preferidos, es aquél que resulta de la esterificación del grupo fosforilo de dicho fosfolípido, por un aminoalcohol, tal como colina (hidróxido de 2-hidroxietiltrimetilamonio), etanolamina, serina, etc, o por un derivado de azúcar, que contenga una función ol, tal como inosita, por ejemplo.

20

Otros lípidos más o menos estrechamente relacionados con los fosfolípidos y capaces de formar liposomas, son también adecuados para la invención. Entre éstos, se citarían, de una manera no limitativa, particularmente, los plasmalógenos, gangliósidos, esfingolípidos, fosfoglicéridos

30

1 dos, fosfolípidos (particularmente aquéllos que difieren de los fosfolípidos de la fórmula anterior en que un grupo $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ sustituye al grupo $-\text{OR}_3$. ("LIPID BIOCHEMISTRY, An introduction", M.I. GURR y A.T. JAMES, 2ª edición, 1975, Chapman and Hall, Londres).

5 Otros ejemplos de lípidos utilizables, son aquellos formados por ácidos grasos que contienen largas cadenas hidrocarbonadas no saturadas, tales como los designados como "ufasomas" y descritos por GEBICKI y HICKS; Chemistry and Physics of Lipids, 1976, volumen 16, páginas 142 a 160, o por compuestos monoacilados, que comprenden cadenas deriva
10 das de ácidos grasos que tienen 8 o más átomos de carbono, así como detergentes no tóxicos, aniónicos y catiónicos, farmacéuticamente aceptables, todos ellos del tipo descrito por W. R. HARGREAVES y D. W. DEALER "CONFERENCE ON LIPOSO-
15 MES AND THEIR USES IN BIOLOGY AND MEDECINE", Septiembre 14-16, 1977, New York Academy of Sciences, etc.

Las clases preferidas de lípidos, entre ellos los fosfolípidos, para ser utilizados en la presente invención, son aquéllos que contienen cadenas de ácidos grasos no sa-
20 turados, tales como los que comprenden de 18 a 20 átomos de carbono y por lo menos un enlace no saturado. Ejemplos de estos ácidos no saturados, son el ácido oleico o, incluso más preferiblemente, los denominados "ácidos grasos esen-
25 ciales", es decir, principalmente el ácido linoleico o el ácido linolénico. En particular, los fosfolípidos preferidos son aquéllos en los que por lo menos uno de los dos gru-
pos anteriores R_1 y R_2 , derivan de por lo menos uno de los "ácidos grasos esenciales" anteriormente mencionados.

30 Fosfolípidos representativos de esta clase preferi

1 da, son las fosfatidilcolinas, de las cuales por lo menos uno de los grupos acilo grasos procede de un ácido graso no saturado, preferiblemente de uno de dichos "ácidos esenciales". Un ejemplo de tales fosfolípidos preferidos, es la 1,2-dilinoleil-fosfatidilcolina.

5 Más generalmente, se puede hacer referencia, para la selección de los fosfolípidos adecuados, a la obra "PHOSPHATIDYLCHOLINES-BIOCHEMICAL AND CLINICAL ASPECTS OF ESSENTIAL PHOSPHOLIPIDS" de H. PEETERS - Springer Verlag, Berlín - Heidelberg - New York, 1976".

10 En el comercio pueden adquirirse composiciones de fosfolípidos particularmente adecuadas, de este tipo. Entre éstas, se pueden citar las conocidas en el comercio como, por ejemplo, fosfolípidos de yema de huevo V-E (Sigma), o las composiciones de "fosfolípidos esenciales" naturales, formadas por fosfatidilcolinas esterificadas por ácidos grasos, una proporción principal de los cuales comprende enlaces monoinsaturados o, preferiblemente, poliinsaturados, en particular 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosforilcolinas de ácidos grasos en su mayoría insaturados, tales como los que se extraen de las semillas de soja, tales como la composición denominada de fosfolípido EPL, producida por NATTERMANN (Alemania).

25 Las preparaciones de liposoma que contienen heparina así obtenidas, poseen propiedades biológicas de lo más interesantes, particularmente de inducción de propiedades anticoagulantes in vivo, incluso cuando se administran por vía oral. También inducen una acción anticoagulante de tipo retardado.

30 Estas preparaciones de liposoma que contienen hepa

1 rina, que se forman a partir de lípidos, más en particular
de fosfolípidos que tienen cadenas de ácidos grasos no sa-
turados, derivados ventajosamente de ácidos grasos esencia-
les, son de un interés particular debido a las propiedades
terapéuticas complementarias de dichos fosfolípidos propia-
5 mente dichos, que son de una compatibilidad particular (fre-
cuentemente, una particularmente deseable) con las de la
heparina.

Se sabe, más en particular, que las fosfatidilcoli-
nas poseen, entre otras propiedades terapéuticas valiosas,
10 una acción protectora contra los procesos o fenómenos ater-
romatosos degenerativos, de reducir la permeabilidad capi-
lar y la tonicidad venosa, de evitar la formación de lodos
o depósitos en el sistema capilar, y de disminuir la hiper-
adhesividad e hiperagregabilidad de las plaquetas.

15 Además, son capaces de actuar favorablemente sobre
los excesos de lípidos hepáticos (esteatosis hepática) y,
más en general, de restaurar un equilibrio apropiado entre
grasas no saturadas y saturadas, en cuanto a que estas úl-
timas están frecuentemente en exceso en el organismo de
20 aquellos pacientes que adolecen de trastornos vasculares o
cardiovasculares.

Para realizar el procedimiento de acuerdo con la in-
vención, se puede recurrir a una tecnología y equipo con-
vencionales. Esto se aplica en particular al uso del tra-
25 tamiento ultrasónico, que puede ser realizado, por ejemplo,
con el equipo que comprende sondas metálicas introducidas
en la dispersión que ha de ser sometida al tratamiento ul-
trasónico.

30 La naturaleza y tamaño finales de las vesículas de

1 fosfolípidos, dependerá, como es bien sabido, del tiempo y
de la intensidad del tratamiento ultrasónico, del tipo de
lípidos utilizado, de la concentración iónica del medio,
de la temperatura, etc. En lo que concierne a las técnicas,
se puede hacer referencia, por ejemplo, al capítulo IV de
5 la obra METHODS IN CELL BIOLOGY editado por David M. Pres-
cott, volumen XIV, 1976, Academic Press, New York, página
33.

Ventajosamente, la dispersión inicial se obtiene a
partir de una película delgada de lípido formada en el re-
10 cipiente que se pretende que contenga el producto final,
obteniéndose preferiblemente esta película delgada, median-
te la introducción de una solución de los lípidos apropia-
dos, en el recipiente y, seguidamente, evaporación del di-
solvente desde éste.

15 Seguidamente, la solución de heparina puede ser in-
troducida en el recipiente, formándose así una dispersión
de los lípidos en la solución de heparina, por agitación,
pudiéndose someter seguidamente a una radiación ultrasóni-
ca, para obtener el resultado arriba indicado.

20 En una primera etapa, se forma una suspensión de lí-
posomas hinchados, que tiene un aspecto lechoso, cuyos lí-
posomas se considera entonces que están formados esencial-
mente por una serie de capas dobles de lípidos concéntri-
cas, alternando con compartimientos acuosos en los cuales
25 está retenida la heparina.

Los liposomas así obtenidos pueden separarse del
medio acuoso, por ejemplo, por centrifugación. Los liposo-
mas contenidos en el sedimento pueden ser lavados seguida-
mente, si se desea, de tal manera que se elimine cualquier
30

1 sustancia activa no incorporada en los liposomas. A conti-
nuación, los liposomas pueden recogerse en un tampón, y al-
macenarse, deseablemente en frío y, preferiblemente, a una
temperatura de 4°C. Los liposomas almacenados de esta mane-
ra, son estables durante prolongados periodos de tiempo.

5 Sin embargo, se ha encontrado que pueden obtenerse
liposomas que retienen cantidades de heparina incluso mayo-
res, controlando y prolongando las condiciones de agitación,
particularmente el tratamiento ultrasónico, de tal modo que
se obtienen liposomas más pequeños, particularmente vesícu-
las monolaminares, dentro de la solución acuosa de hepari-
na de partida.

10 Esto puede conseguirse por un tratamiento ultrasó-
nico prolongado, si es necesario bajo intensidades de co-
rriente eléctrica más altas que en el primer caso.

15 En particular, se puede confiar en el aspecto de
la suspensión que se obtiene después del tratamiento ultra-
sónico, para reconocer si los liposomas están formados
esencialmente por vesículas monolaminares o no. En lugar
del aspecto de suspensión lechosa a que dan lugar los li-
posomas multilaminares, los liposomas monolaminares dan lu-
20 gar a suspensiones coloidales ligeramente opalescentes o
simplemente transparentes.

25 Los liposomas así formados no pueden separarse ya
de la solución por ultracentrifugación; no es factible ya
someterlos a operaciones de lavado (las cuales no parece
que sean del todo necesarias) debido a sus pequeños tama-
ños (comprendidos entre aproximadamente 250 y aproximada-
mente 1.000 Angstroms). Sin embargo, son separables por
30 filtración a través de gel.

1 Se ha encontrado que, en tales condiciones, pueden
obtenerse liposomas que retienen de 500 a 2.000 unidades
internacionales (u.i.) de heparina por ml de preparación de
liposoma. Se recuerda aquí que pueden medirse estas cantida-
des, sometiendo las preparaciones de liposoma que contiene
5 heparina así obtenidas y separadas del medio en el que se
formaron, a la acción de un detergente, dentro de un medio
acuoso, y determinando la heparina liberada de los liposo-
mas en el medio acuoso. Preferiblemente, la composición
del lípido inicial contiene también un agente estabilizador,
10 por ejemplo, colesterol. Si fuera necesario, puede añadir-
se un agente anfífilo en la dispersión de lípido inicial,
para hacer que los liposomas que se formen estén también
cargados eléctricamente. Los agentes adecuados incluyen el
fosfato de dicetilo o la fosfatidil-serina, si se desea
15 una carga negativa, o la estearilamina, si se desea una
carga positiva.

Sin embargo, puede renunciarse a estos agentes an-
fífilos, como se verá en algunos de los ejemplos siguientes,
que se describirán a continuación con fines de ilustrar adic-
20 cionalmente la invención, pero sin limitarla de ninguna ma-
nera.

Ejemplo 1.

25 Una fase de lípido, compuesta por los tres compo-
nentes lecitina, colesterol y fosfato de dicetilo, en una
proporción molar de 7:2:1, se preparó de la manera siguien-
te. En 5 ml de cloroformo, se disolvieron 26 mg de lecitina,
4,4 mg de colesterol y 3,11 mg de fosfato de dicetilo.
30 La solución obtenida se evaporó hasta sequedad en un matraz

1 de fondo redondo, a una temperatura de 37°C. Una vez que
se hubo evaporado el cloroformo, los constituyentes de fos-
folípido formaron una película delgada sobre las paredes
del recipiente utilizado. Seguidamente, se disolvieron de 30
a 50 mg de heparina en 5 ml de un tampón de fosfato 0,005
5 M, a pH 7,2, y la solución obtenida se introdujo en el mis-
mo recipiente, bajo atmósfera de nitrógeno.

El medio formado se dejó en reposo durante aproxi-
madamente una hora a la temperatura ambiente y, seguidamen-
te, se sometió la dispersión formada a la acción de una ra-
10 diación ultrasónica (tratamiento ultrasónico) durante 10
segundos, utilizando un aparato de tratamiento ultrasónico
del tipo conocido bajo la marca registrada ULTRASONIC, que
funcionaba a 1,5 amperios, durante 20 segundos. La sonda
del aparato de tratamiento ultrasónico estaba hecha de ace-
15 ro inoxidable normal, pero podría haber estado constituida
también por otros materiales tales como titanio. Un trata-
miento ultrasónico adicional durante un periodo que varia-
ba entre 10 segundos y 20 minutos, no produjo ninguna modi-
ficación perceptible del contenido de heparina en los lipo-
20 somas finalmente obtenidos, tal como se determinó en el en-
sayo que se describe a continuación.

Después del tratamiento ultrasónico, se dejó el me-
dio en reposo durante una hora a +4°C y, seguidamente, se
centrifugó durante 3 horas a 110,000 g.

25 El precipitado obtenido se volvió a poner en sus-
pensión en el mismo tampón de fosfato, y se centrifugó de
nuevo durante 3 horas a 110,000 g. Se encontró, seguida-
mente, que la muestra de una parte alícuota del líquido so-
30 brenadante estaba libre de heparina. Seguidamente, el pre-

1 -cipitado obtenido se volvió a suspender en 0,3 ml del tam
 pón de fosfato, y la suspensión obtenida que contenía 9 uni
 dades internacionales de heparina, se almacenó en frío, a
 una temperatura de +4°C, durante varios meses.

5 Ejemplo 2.

Se prepararon liposomas que contenían heparina, em
 pleando el mismo procedimiento del Ejemplo 1, pero partien
 do de los siguientes reactivos:

Lecitina (lecitina de yema de huevo	
vendida por la compañía SIGMA, tipo V	26 mg
	(40 μ moles)
Colesterol	4,4 mg
	(11,4 μ moles)

Los liposomas así obtenidos tenían una carga neu-
 tra.

15 Ejemplo 3.

Se prepararon liposomas que contenían heparina, em
 pleando el procedimiento del Ejemplo 1, pero partiendo de
 los siguientes reactivos:

Lecitina	26 mg (40 μ moles)
Colesterol	4,4 mg (11,4 μ moles)
Estearilamina (octadecilamina)	1,53 mg (5,7 μ moles)

Estos liposomas tenían una carga positiva.

La oclusión efectiva por los liposomas, de una cier
 ta cantidad de heparina se comprobó de la manera siguiente:

25 Se añadieron 0,1 ml de la suspensión de liposoma a
 1 ml de plasma humano. Se midió el tiempo de trombina, es-
 tableciéndose de este modo una inercia total de esta sus-
 pensión con respecto al tiempo de trombina, en comparación
 30 con los resultados de los ensayos realizados con un testigo

1 -constituído por una dosis de plasma humano.

5 Sin embargo, se encontró que cuando había sido in
cubado previamente el mismo volumen de la suspensión de li
posoma, durante 30 minutos, en presencia de un volumen
igual de una solución al 1% de un detergente del tipo cono
10 cido en el comercio bajo el nombre de TRITON X100 (Rohm &
Haas), adecuado para eliminar las envolturas de lípido, au
mentaba el tiempo de trombina. El tiempo de trombina, que
depende de una heparinemia biológica de un plasma testigo,
se midió de acuerdo con el método de valoración de la hepa
15 rinemia, ensayando el periodo de trombina para una concen-
tración variable (RABY), Annales d'anesthesiologie fran-
çaise, volumen 5, edición especial 1954) y con una estan-
darización modificada (RABY, Coagulation IV, coagulation
intravasculaire disséminée, Masson edition 1974, página
188).

20 La cantidad medida fue de 1,8 unidades internacio-
nales para un volumen de 0,1 ml de la suspensión (liposo-
mas + detergentes). Los liposomas solos formaban una solu-
ción que no contenía ninguna heparina, no mostraban ningun
25 na actividad en el ensayo arriba mencionado, tanto si
habían sido sometidos a la acción de un detergente o no.

Ensayo de propiedades biológicas in vivo de los liposomas
que contienen heparina:

25 Las propiedades de los liposomas que contienen he-
parina, se investigaron con muestras de sangre tomadas de
conejos macho "Fauve de Bourgogne", a los que se había ad
ministrado previamente, mediante alimentación forzada pro-
funda, utilizando un catéter gastroduodenal, 3,6 ml por co

30

26117

1 nejo de las suspensiones de liposoma en el tampón descrito
en lo que antecede. (a excepción del conejo considerado en
la Tabla VI, el cual recibió 10 ml, o un total de 180 uni-
dades internacionales, bajo las mismas condiciones experi-
mentales). Se tomaron muestras de sangre en diferentes tiem-
5 pos, después de la alimentación forzada - después de 30 mi-
nutos, una hora y 30 minutos, 3 horas y 30 minutos, 6 horas
y 30 minutos, 24 horas, 28 horas, 30 horas y 48 horas. Se
tomaron muestras similares de conejos testigo, que habían
sido alimentados previamente, de una manera forzada, sola-
mente con agua o con liposomas que no contenían heparina.
10

Las muestras fueron recogidas en tubos de 5 ml,
que tenían paredes que repelían el agua (de material plás-
tico) y el contenido de ión calcio de las muestras se con-
virtió en quelato mediante la adición de iones citrato. En
15 estas condiciones, los factores celulares sanguíneos y de
contacto de plasma, que son responsables de la iniciación
del proceso de coagulación, se activaron de una manera mí-
nima, de tal manera que las diferentes muestras no eran ya
capaces de coagular espontáneamente en ausencia de calcio
ionizado.
20

El principio del método utilizado, consistía en
comparar los períodos de coagulación medidos en las mues-
tras bajo ensayo y en las muestras testigo, después de
recalcificar los contenidos de los tubos, mediante la adi-
25 ción de cloruro cálcico, de acuerdo con la técnica trombo-
elastográfica (TEG) descrita en "Biologie des hemorrhagies
et des thromboses", G. RABY, Masson, Paris 1966, páginas
186-188.

30 Esta técnica aprovecha el paso desde el estado lí-

1 quido al estado sólido, de una preparación de sangre que
experimenta coagulación. El principio del método consiste
en someter un recipiente, en el cual se ha introducido prime
ro la preparación a estudiar, a un movimiento angular de os
cilación, y en observar el efecto de coagulación sobre un
5 cilindro suspendido al extremo de un hilo de torsión y que
se sumerge en la preparación. Cuando empieza la coagula
ción, el plasma contenido en el recipiente comunica al ci
lindro el correspondiente movimiento oscilatorio.

10 La coagulación se cronometra desde el instante
($t = 0$) en el cual se induce la activación de los factores
responsables de la coagulación mediante la adición de iones
 Ca^{++} , en las condiciones indicadas arriba.

15 En lo que sigue, "r" es el tiempo de inducción que
precede a la iniciación efectiva de la coagulación; "ma"
es la amplitud máxima de las oscilaciones del cilindro; "k"
es el intervalo de tiempo desde el momento en que el cilin
dro empieza a oscilar y el momento en que la amplitud del
movimiento resulta igual a la amplitud (20 milímetros) ob
tenida en las mismas condiciones con un plasma exento de
20 plaquetas, cuyo contenido de fibrinógeno es normal (3 a 4
gramos por mil).

El "tiempo de coagulación total" de una prepara
ción, está constituido por la suma de "r" + k".

25 La cinética de la coagulación se expresa por los
parámetros "r" y "r + k", y la dinámica de la coagulación
por la amplitud máxima "ma" de las oscilaciones del cilin
dro.

30 Los resultados obtenidos se indican en las tablas
I a VI que corresponden a los ensayos que han sido realiza

1 dos en las siguientes condiciones:

Tabla I : Conejo testigo alimentado a la fuerza con agua solamente;

5 Tabla II : Conejo testigo alimentado a la fuerza con una suspensión de liposomas exenta de harina, en suspensión en el mismo tampón;

Tabla III : Conejo alimentado a la fuerza con la suspensión de liposomas que contienen heparina, obtenidas en el Ejemplo I anterior;

10 Tabla IV : Conejo alimentado a la fuerza con una suspensión de liposomas que contienen heparina procedente de otra tanda;

Tabla V : Conejo alimentado a la fuerza con una preparación de liposomas que contienen heparina procedente de una mezcla de varias tandas;

15 Tabla VI : Conejo alimentado a la fuerza con una cantidad mayor de la preparación de liposomas (10 ml por conejo).

20 En estas tablas se muestran los valores medidos de los parámetros "r", "k", "r + k", "ma" y TPI, siendo este último parámetro el índice de potencial trombodinámico expresado por la relación $\frac{mxE}{100 - ma}$, en la que $mxE = \frac{100 \cdot ma}{100 - ma}$, mxE = elasticidad máxima.^k Se puede registrar un "trombo-elastograma" TEG, que permite apreciar visualmente los fenómenos inducidos.

25 -----

30 -----

1
5
10
15
20
25
30

TABLA I

Testigo (alimentado a la fuerza con H₂O)

	TEG con sangre completa					Observaciones
	F	K	r + K	am	IPT	
Antes de la alimentación forzada	18	12	30	50	8,3	
30 minutos después	18	13	31	50	7,7	
1 hora 30 minutos después	18	11	29	47	8	
3 horas y 30 minutos después	19	12	31	48	7,6	
6 horas y 30 minutos después	Muestra impracticable - sangre coagulada					
24 horas después	17	8	25	53	14	Punzada cardíaca.

1
5
10
15
20
25
30

TABLA II
Testigo de liposomas sólo

	TEG sobre sangre completa.					Observaciones
	\bar{r}	\bar{k}	$\bar{r} + \bar{k}$	\bar{em}	IPT	
Antes de la alimentación forzada	17	10	27	60	15	
30 minutos después	13	8	21	69	27	
1 hora y 30 minutos después	20	9	29	71	27	
3 horas y 30 minutos después	11	11	22	69	20	
6 horas y 30 minutos después	18	7	25	61	22	Muestra difícil
24 horas después	16	7	23	70	33	Punzada cardíaca

1
5
10
15
20
25
30

TABLA III
Liposomas que contienen heparina

	TEG sobre sangre completa					Observaciones
	\bar{x}	\bar{k}	$\bar{x} + \bar{k}$	\bar{am}	IPT	
Antes de la alimentación forzada	9	6	15	70	38	
30 minutos después	21	15	36	52	7,2	
1 hora y 30 minutos después	19	10	29	53	11	
3 horas y 30 minutos después	7	6	13	67	33	
6 horas y 30 minutos después	Muestra impracticable - sangre coagulada					
24 horas después	22	10	32	60	15	Punzada cardíaca

1
5
10
15
20
25
30

TABLA IV
Liposomas que contienen heparina

	TEG sobre sangre completa					Observaciones
	\bar{x}	\bar{k}	$\bar{x} + \bar{k}$	\bar{am}	IPT	
Antes de la alimentación forzada	24	12	36	58	11,5	
30 minutos después	25	15	40	57	8,8	
1 hora y 30 minutos después	34	24	58	46	3,5	
3 horas y 30 minutos después	36	21	57	61	7,4	
6 horas y 30 minutos después	36	17	53	57	7,8	
28 horas después	50	21	71	50	4,7	

1
5
10
15
20
25
30

TABLA V
Liposomas que contienen heparina

	TEG sobre sangre completa					Observaciones
	F	\bar{k}	$\bar{x} + \bar{k}$	\bar{em}	IPT	
Antes de la alimentación forzada	15	8	23	63	21	
30 minutos después	19	10	29	60	15	
1 hora y 30 minutos después	26	14	40	57	9,5	
3 horas y 30 minutos después	23	11	34	61	14,1	
6 horas y 30 minutos después	6	7	13	53	16	
24 horas después	28	12	40	54	8,1	

1
5
10
15
20
25
30

TABLA VI
Liposomas que contienen heparina

	TEG sobre sangre completa					Observaciones
	E	K	E + K	am	IPT	
Antes de la alimentación forzada	20	20	40	42,3	4,1	
30 minutos después	29,6	23,3	53	39,5	3,7	
1 hora y 30 minutos después	16	12,3	28,3	51	8,8	Muestra difícil
3 horas y 30 minutos después	24,3	25	49,3	40,6	2,7	Muestra difícil
6 horas y 30 minutos después	27,3	15,3	42,6	49	6,6	Muestra difícil
24 horas después	39	33	72	43	3,5	
48 horas después	36,5	27	63,5	42,5	2,6	

1 Se pueden efectuar las siguientes observaciones
al considerar estos resultados:

La alimentación forzada de los conejos, con agua
o con liposomas exentos de heparina, no produce una modifi-
cación importante de los parámetros estudiados con el plas-
5 ma de estos conejos (Tablas I y II).

Sin embargo, se observó, en el caso de los cone-
jos que habían recibido liposomas que contenían heparina
en sus vesículas, un claro incremento de los parámetros
"r", "k" y "r + k" (Tablas III, IV, V y VI). El incremen-
10 to llega al máximo en la hora veinticuatroava, mientras
que la heparina administrada de acuerdo con técnicas nor-
malizadas se elimina, como promedio, dentro de las cuatro
horas que siguen a la administración intravenosa, y den-
tro de las 12 horas que siguen a la administración por vía
15 subcutánea.

El efecto del parámetro "r + k" se observaba toda-
vía 48 horas después de la administración, lo que indica
un efecto retardado muy interesante, inducido por la for-
ma particular de la composición de la invención con la que
20 se administró la heparina.

Estos resultados obtenidos con la composición de
la invención, muestran siempre efectos en la misma direc-
ción, a saber, un aumento de los parámetros "r", "k" y
"r + k", de lo que se deduce que los liposomas que contie-
25 nen heparina, administrada por vía oral, tienen constante-
mente una actividad sobre la cinética de la coagulación.

Se observan efectos similares, de una manera cons-
tante, en las ratas también, al administrarles los lipo-
30 somas que contienen heparina, anteriormente mencionados.

1 Al utilizar el mismo equipo de tratamiento ultra-
sónico que en los ejemplos anteriores, se pueden obtener
liposomas más pequeños, más en particular liposomas monola-
minares, que forman suspensiones ligeramente opalescentes
e incluso casi transparentes, por ejemplo, sometiendo a
5 tratamiento ultrasónico una suspensión de entre 3,47 y 10,4
mg de lípidos, tales como fosfolípidos, y entre 0,6 y 1,75
mg de colesterol por ml de solución acuosa, conteniendo
ventajosamente entre 5 y 15 mg de heparina (o entre 900 y
2.700 unidades internacionales de heparina) bajo una inten-
10 sidad de corriente comprendida entre 3 y 8 amperios, duran-
te un periodo comprendido entre 30 minutos y 2 horas.

Ejemplo IV

15 Varias muestras de lípidos, cada una de las cuales
estaba formada por 104 mg de fosfolípidos EPL - NATTERMAN
y 17,6 mg de colesterol, se disolvieron en 5 ml de cloro-
formo. Las soluciones se evaporaron seguidamente, bajo va-
cío, a 37°C, en un evaporador rotatorio, formándose de es-
te modo delgadas películas de lípidos sobre las paredes de
20 los correspondientes recipientes o matraces de vidrio.

En los recipientes se añadieron diferentes solu-
ciones que contenían 50, 100 y 200 mg de heparina respecti-
vamente, disueltos en 5 ml de una solución de cloruro sódico
0,15 M, y cuentas de vidrio. Las soluciones se sometie-
25 ron a agitación en agitadores VORTEX, bajo una atmósfera
de nitrógeno, con lo que los lípidos que estaban adheridos
a las paredes de vidrio de recipientes se desprendieron de
ellas y se consiguió que formaran liposomas.

1 Se recogieron los contenidos de los recipientes en
forma de suspensiones lechosas; los liposomas que quedaban
todavía retenidos en el recipiente, se recogieron con dos
volúmenes sucesivos de una solución de cloruro sódico 0,15
M, y las suspensiones recogidas se almacenaron reunidas,
5 finalmente, para proporcionar un volumen final de 15 ml.
Este último se dejó en reposo durante una hora a la tempe-
ratura ambiente y, seguidamente, se sometió a tratamiento
ultrasónico durante periodos variables de tiempo, que os-
cilaban entre 2 y 120 minutos (2; 5; 8; 10; 13; 25; 60; 90
10 y 120 minutos, respectivamente), bajo intensidades de co-
rriente comprendidas entre 1,5 y 8 amperios.

En la totalidad de estos ensayos, se obtuvieron fi-
nalmente suspensiones coloidales de liposomas, sustancial-
mente translúcidas.

15

EJEMPLO V

Se obtuvieron resultados particularmente buenos,
operando de la manera siguiente:

20

25

30

104 mg de lípidos EPL (NATTERMAN) y 17,6 mg de co-
lesterol (SIGMA de E.E.U.U.) se disolvieron en 5 ml de clo-
roformo, en un recipiente de vidrio, y se evaporaron bajo
vacío a 37°C. A los recipientes se añadieron unas pocas
cuentas de vidrio y 5 ml de una solución de cloruro sódico
0,15 M, que contenía 200 mg de heparina, con una concentra-
ción de 182 unidades internacionales/mg. El contenido de
este último se sometió a agitación bajo una atmósfera de
nitrógeno, en un agitador VORTEX, hasta que todos los fos-
folípidos que estaban adheridos a las paredes del recipien-
te de vidrio, quedaron en suspensión en la solución acuosa

1 de heparina.

5 Seguidamente, se recogió la suspensión de lípidos, y los liposomas que quedaban en el recipiente se recogieron, dos veces, con un volumen de 5 ml de una solución de cloruro sódico 0,15 M. Después de reunir la suspensión, los liposomas se suspendieron seguidamente en 15 ml de una solución de cloruro sódico 0,15 M. Los liposomas suspendidos se dejaron en reposo durante una hora, y se trataron con ultrasonidos durante 90 minutos, a 4 amperios.

10 Seguidamente, la solución se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos. La suspensión recogida se administró como tal a ratas, en los ensayos mencionados en lo que sigue.

15 Ratas macho Wistar, que tenían un peso medio de 195 g (220 a 400 g) se alimentaron con la preparación de liposomas del ejemplo precedente, en diferentes proporciones, hasta 15.000 unidades internacionales/kg de peso de cuerpo, durante periodos de tiempo variables entre un día y 9 días. Se tomaron muestras de sangre al cabo de 1 a 48 horas después de la última alimentación.

20 Bajo las condiciones experimentales utilizadas y a pesar de las variaciones individuales que pueden observarse, se encontró que varios de los parámetros convencionalmente utilizados para determinar los índices de coagulabilidad de una muestra de sangre o plasma, es decir tiempo de trombina, tiempo de Howell, tiempo de cefalina-caolín, así como los fenómenos tromboelastográficos, eran todos ellos modificados hacia una reducción de la capacidad de coagulación de las muestras de plasma o sangre ensayadas. Se encontró, más en particular, que la administración de 15.000

1 unidades internacionales/kg de peso del cuerpo, daban como
resultado una completa ausencia de coagulabilidad de la
sangre de algunas de las ratas que recibieron esta dosis,
mientras que la alimentación de las ratas de control con
25.000 unidades internacionales por animal, con una solu-
5 ción acuosa de la sal de calcio o heparina o con una solu-
ción de 22.500 unidades internacionales por animal de la
sal sódica de heparina, no inducían ningún efecto importan-
te sobre su coagulabilidad sanguínea, en condiciones simi-
lares.

10 En otro ensayo, se alimentaron ratones Swiss con
0,5 ml de la suspensión del Ejemplo 5, y los controles re-
cibieron, por la misma vía, 0,5 ml de agua o de una solu-
ción acuosa que contenía 1.200 unidades internacionales de
la sal sódica de heparina.

15 Una hora después, se sangraron los ratones al ni-
vel de la cola.

Mientras que en los controles que recibieron agua,
los tiempos de sangría oscilaron entre 2,5 y 12 minutos,
y en aquellos de los ratones que habían recibido la solu-
20 ción acuosa de la sal sódica de heparina, de 3 a 8 minutos,
el tiempo de sangría de los ratones tratados con los lipo-
somas que contenían heparina, oscilaba entre 21 y 25 minu-
tos (a excepción de un ratón, en el que este tiempo de san-
gría fue de 9 minutos).

25 En la totalidad de los ensayos precedentes, la ali-
mentación de los animales se efectuó por alimentación for-
zada gastro-duodenal, profunda y repetida.

30 Se ha encontrado también un incremento adicional
de la prolongación del tiempo de trombina en las ratas, en

1 comparación con los controles, 18 horas después de que
hubieran recibido una inyección de liposomas que contenían
heparina, de acuerdo con la invención. Esto muestra el ti-
po de acción retardada que son capaces de inducir in vivo,
los liposomas que contienen heparina de la invención.

5 Los liposomas que contienen heparina son utiliza-
bles como heparina para la regulación de la coagulabilidad
de la sangre, en particular para evitar hipercoagulabili-
des del tipo que se encuentran, por ejemplo, en pacientes
que sufren de trastornos vasculares, venosos o trombolíti-
cos.

10 El uso de liposomas que contienen heparina es par-
ticularmente deseable en los tratamientos a base de hepari-
na, que implican su administración por vías distintas de la
parenteral, por ejemplo, por vías oral o rectal, o también
en forma de ungüentos, etc.

15 La invención concierne también a las composiciones
farmacéuticas que contienen tales liposomas que contienen
heparina, asociados con vehículos farmacéuticos.

20 Estos se refieren en particular a composiciones ad-
ministrables por vía oral, en una forma que permite que los
liposomas que contienen heparina, traspasen la barrera gá-
strica sin deterioro. Por ejemplo, los liposomas que contie-
nen heparina se incorporan en composiciones farmacéuticas
resistentes al medio gástrico, junto con un vehículo apro-
piado para su administración oral, que permite que el prin-
cipio activo sea liberado solamente en el duodeno. Ventaja-
samente, los liposomas que contienen heparina, se configu-
ran en forma de cápsulas resistentes al medio gástrico,
por ejemplo, del tipo producido por SHERER, conteniendo ca

1

da cápsula de 20 a 500 unidades internacionales de heparina.

5

Los liposomas que contienen heparina dentro de sus vesículas, pueden ser puestos también en suspensión en un vehículo inyectable. Un ejemplo ventajoso de una preparación destinada a una perfusión continua, comprende el producto de liposoma final, preparado de una manera estéril, suspendido en una solución isotónica y distribuido en ampollas o frascos, en volúmenes de 1 a 10 ml, que contienen de 100 a 20.000 unidades internacionales de heparina.

10

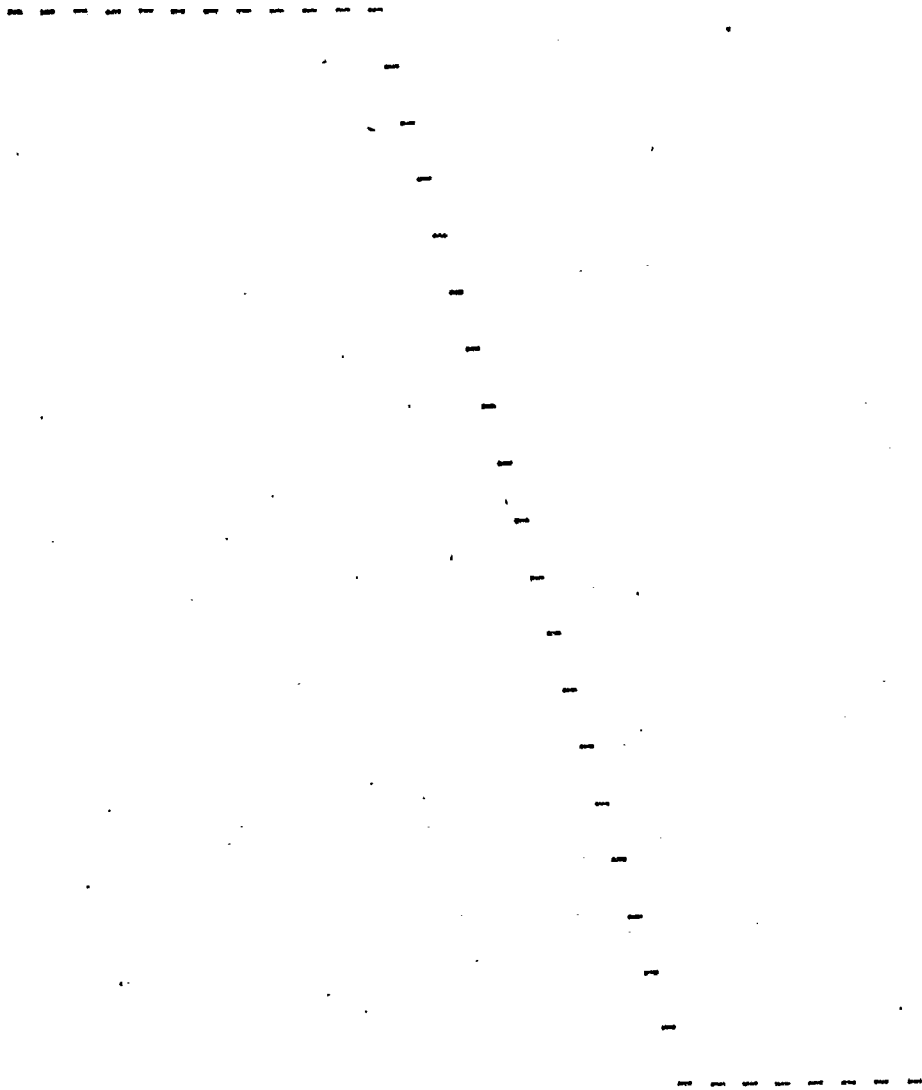
15

20

25

30

26117



1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un procedimiento para preparar liposomas con heparina dentro o sobre las vesículas de lípido de dichos liposomas, que comprende someter una dispersión de lípidos formadores de liposomas, dentro de una solución de heparina, a agitación o radiación ultrasónica hasta que se formen liposomas que retengan una parte por lo menos de la heparina inicialmente contenida en la solución acuosa.

15

2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que se hace uso de lípidos constituidos por lípidos no tóxicos, fisiológicamente aceptables y metabolizables.

3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª, en el que los lípidos utilizados son fosfolípidos.

20

4ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª, en el que los lípidos utilizados se seleccionan del grupo consistente en plasmalógenos, gangliósidos, esfingolípidos, fosfoglicéridos, fosfonolípidos, ufasomas, compuestos monoacilados que comprenden cadenas derivadas de ácidos grasos que tienen por lo menos 8 átomos de carbono, y detergentes no tóxicos, aniónicos y catiónicos, farmacéuticamente aceptables.

25

30

5ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2ª a 4ª, que comprende utilizar lípidos que incluyen cadenas de ácidos grasos no saturados.

1 6ª.- Un procedimiento según la reivindicación 5ª,
en el que los lípidos utilizados comprenden cadenas de áci-
do graso derivadas de los ácidos grasos esenciales.

5 7ª.- Un procedimiento según la reivindicación 3ª,
en el que los fosfolípidos utilizados comprenden, por lo
menos en parte, fosfatidilcolinas, de las cuales, por lo
menos uno de los grupos acilo graso procede de un ácido
graso no saturado.:

10 8ª.- Un procedimiento según la reivindicación 7ª,
en el que los grupos acilo de dichas fosfatidilcolinas se
derivan de ácidos grasos esenciales.

15 9ª.- Un procedimiento según una cualquiera de
las reivindicaciones 1ª a 8ª, en el que la heparina compren-
de componentes que tienen pesos moleculares comprendidos
entre aproximadamente 6.000 y aproximadamente 20.000.

15 10ª.- Un procedimiento según la reivindicación
9ª, en el que la heparina comprende una proporción princi-
pal de especies de heparina, que tienen un peso molecular
comprendido entre aproximadamente 10.000 y 15.000.

20 11ª.- Un procedimiento según una cualquiera de
las reivindicaciones 1ª a 10ª, que comprende formar dichos
liposomas en un medio exento de agentes anfífilos.

20 12ª.- Un procedimiento según una cualquiera de
las reivindicaciones 1ª a 11ª, en el que la solución acuo-
sa es isotónica.

25 13ª.- Un procedimiento según una cualquiera de
las reivindicaciones 1ª a 12ª, que comprende recuperar los
liposomas que contienen la heparina retenida en ellos o
sobre ellos desde el medio de dispersión líquido.

30 14ª.- UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LIPOSOMAS.

1

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

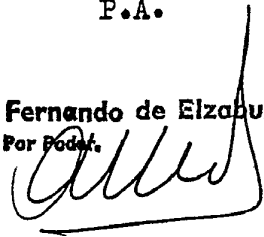
Esta Memoria consta de treinta y tres hojas escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid, 14. AGO. 1978

P.A.

Fernando de Elzaburu
Por Poder.



10

15

20

25