

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 2415470

DAL TITOLO:

“COMPOSIZIONE LIPOSOMIALE”

\*\*\* \*\*

## Descrizione

### Campo tecnico

[0001] La presente invenzione si riferisce ad una nuova composizione liposomiale contenente eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile. La presente invenzione si riferisce anche ad un metodo di fabbricazione della composizione liposomiale.

### Stato dell'arte

[0002] I liposomi sono vescicole chiuse microscopiche che hanno una fase interna racchiusa da uno o più doppi strati lipidici, e sono in grado di contenere materiale idrosolubile nella fase interna, e materiale lipofilo nel doppio strato lipidico. Quando intrappolare un composto attivo in un liposoma, e distribuirlo ad un tessuto bersaglio, come intrappolare il composto attivo nel liposoma con efficienza elevata, e come assicurare una ritenzione stabile del composto attivo da parte del liposoma costituiscono i problemi importanti.

Quando si intrappolano composti lipofili in un liposoma, un elevato rapporto di intrappolamento può essere conseguito in modo relativamente semplice, ma ad eccezione dei casi di composti che hanno un'affinità di membrana molto elevata, come amfotericina B (l'agente principale nel farmaco liposomiale AmBisome), la stabilità di

ritenzione nel plasma del sangue è normalmente bassa, ed è difficile ottenere un miglioramento sufficiente nella farmacocinetica. Per quanto riguarda i metodi per intrappolare i composti idrosolubili in un liposoma, ci sono svariati metodi come il metodo di pellicola lipidica (metodo Vortex), il metodo di evaporazione a fase inversa, il metodo di rimozione di tensioattivo, il metodo di congelamento-scongelo, e metodi di caricamento remoto (metodo di gradiente di pH, metodo di gradiente di ioni). Tuttavia, sono solamente i metodi di caricamento remoto che forniscono un rapporto di intrappolamento vicino al 100%; dagli altri metodi viene ottenuto un rapporto di intrappolamento dell'ordine di solamente dal 5 al 30%.

[0003] Come metodi di caricamento remoto, sono conosciuti quelli che utilizzano un gradiente di pH e un gradiente di ione di solfato di ammonio. Il metodo di gradiente di pH, che è un metodo di caricamento remoto che utilizza un gradiente di pH, è una tecnica per incorporare composti in un liposoma utilizzando il movimento di equilibrio di dissociazione molecolare/ionica dovuto al pH del composto bersaglio.

Come un esempio di un composto intrappolato in un liposoma mediante il metodo del gradiente di pH, si può citare, per esempio, doxorubicina (DOX, pKa: 8,2). Dopo aver preparato una soluzione di liposoma con una soluzione di tampone di pH 4, la fase esterna del liposoma viene sostituita con una soluzione di tampone di pH 7. Nel caso in cui DOX venga aggiunta a questa soluzione di liposoma,

siccome la DOX molecolare nella soluzione di pH 7 è lipofila, essa migra alla membrana di liposoma piuttosto che alla fase acquosa. Nel caso in cui la DOX che è migrata alla membrana di liposoma inoltre contatti la fase interna di pH 4 del liposoma, essa diventa ionica, e viene incorporata nella fase interna del liposoma. In questo modo, DOX viene trasportata dalla fase esterna alla fase interna di liposoma mediante un movimento di equilibrio di dissociazione (vedere Letteratura non brevettuale 1, letteratura non brevettuale 2, e letteratura brevettuale 1).

[0004] Sono state riportate una varietà di tecniche per migliorare questo tipo di metodo di caricamento remoto. Nella Letteratura non brevettuale 3, viene divulgata una tecnica per migliorare il rapporto di intrappolamento di composti attivi aggiungendo etanolo insieme con il composto attivo alla fase esterna del liposoma, quando il metodo di gradiente di pH viene condotto in un liposoma di composizione speciale chiamata liposoma senza colesterolo.

Nella Letteratura brevettuale 2, in aggiunta al gradiente di pH, viene divulgata una tecnica per migliorare il rapporto di intrappolamento di composti di attivi avendo ioni di rame presenti nella fase interna del liposoma.

[0005] Al posto di un gradiente di pH nel metodo di gradiente di pH, il metodo di solfato di ammonio, che è un metodo di caricamento remoto che utilizza un gradiente di ione di solfato di ammonio, è una tecnica per incorporare composti attivi nella fase interna di liposoma

utilizzando un gradiente di ioni come solfato di ammonio bivalente (vedere letteratura non brevettuale 1 e letteratura brevettuale 3).

In aggiunta ad un gradiente di ioni basato su solfato di ammonio, la Letteratura brevettuale 4 divulga una tecnica per incorporare composti attivi in un liposoma aggiungendo acido boronico assieme al composto attivo alla fase esterna del liposoma.

Invece di un gradiente di ioni basato su solfato di ammonio, la Letteratura brevettuale 5 divulga una tecnica in cui, rispetto al caso in cui viene utilizzato il solfato di ammonio, il tasso di rilascio del composto attivo viene migliorato incorporando il composto attivo in un liposoma utilizzando un gradiente ionico di anione dell'acido glucuronico.

[0006] Pertanto, dal punto di vista del rapporto di intrappolamento, i metodi di caricamento remoto sono metodi di intrappolamento eccellenti. Tuttavia, nel caso in cui vengano utilizzati metodi di caricamento remoto, ad eccezione di casi particolari, come Doxil (una preparazione di liposoma di DOX) dove il composto attivo intrappolato nella fase interna del liposoma è cristallizzato, c'è il problema che il composto attivo tende a fuoriuscire dal liposoma nel plasma del sangue, e che la stabilità di ritenzione del composto attivo è bassa.

[0007] Come descritto sopra, con metodi tecnici convenzionali, la situazione attuale è che è difficile raggiungere la coesistenza tra un elevato rapporto di intrappolamento del composto attivo in liposomi e una stabilità di ritenzione del composto attivo in un liposoma.

Letteratura dell'arte antecedente

Letterature brevettuali

[0008] Letteratura brevettuale 1: Brevetto degli Stati Uniti No. 5192549, Descrizione specifica

Letteratura brevettuale 2: Pubblicazione Internazionale PCT WO 2006/037230, Pamphlet

Letteratura brevettuale 3: Brevetto degli Stati Uniti No. 5316771, Descrizione specifica

Letteratura brevettuale 4: Brevetto degli Stati Uniti No. 6051251, Descrizione specifica

Letteratura brevettuale 5: Pubblicazione Internazionale PCT WO 2005/046643, Pamphlet

Letterature non brevettuali

[0009] Letteratura non brevettuale 1: Yasuyuki Sazuka, "Liposome Preparation Method," "New Developments in Liposome Application: Toward the Development of Artificial Cells" (Kazunari Akiyoshi, Shigeru Tsujii, editorial supervision)" NTS, (2005), pp. 33-37.

Letteratura non brevettuale 2: Mayer LD et al., Biochimica et Biophysica Acta, (1986), 857: pp. 123-126.

Letteratura non brevettuale 3: N. Dos Santos et al., Biochimica et Biophysica Acta, (2004), 1661(1): pp. 47-60.

Schema dell'invenzione

Problema che deve essere risolto mediante l'invenzione

[0010] Lo scopo della presente invenzione è quello di fornire una composizione liposomiale con un elevato rapporto di intrappolamento ed una elevata stabilità di ritenzione del composto attivo.

Mezzi per risolvere il problema

[0011] Come risultato di una diligente ricerca volta a risolvere i problemi menzionati sopra, i presenti inventori hanno scoperto, rispetto ad una composizione liposomiale il cui composto attivo è eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile, che il rapporto di intrappolamento e la stabilità di ritenzione del composto attivo nella composizione liposomiale sono estremamente elevati, perfezionando in tal modo la presente invenzione.

[0012] In particolare, la presente invenzione è come segue.

(1) Una composizione liposomiale contenente liposoma, e contenente (i) un composto attivo, (ii) sale di ammonio e (iii) sale, acido, base e/o amminoacido nella fase interna di liposoma, in cui il composto attivo è eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile.

(2) La composizione liposomiale secondo 1, in cui la composizione liposomiale è in una forma solida o una liquida.

(3) La composizione liposomiale secondo 1 o 2, in cui la concentrazione del sale di ammonio menzionato sopra è 10 mM o più elevata.

(4) La composizione liposomiale secondo da 1 a 3, in cui la concentrazione del sale menzionato sopra è da 1 a 300 mM.

(5) La composizione liposomiale secondo da 1 a 4, in cui la concentrazione dell'acido menzionato sopra è da 1 a 300 mM.

(6) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 5, in cui la concentrazione dell'amminoacido menzionato sopra è da 1 a 300 mM.

(7) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 6, in cui la concentrazione della base menzionata sopra è da 1 a 300 mM.

(8) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 7, in cui la concentrazione del composto attivo menzionato sopra è da 0,01 a 300 mg/ml.

(9) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 8, in cui il composto attivo menzionato sopra è mesilato di eribulina.

(10) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 9, in cui la fase interna di liposoma contiene s inoltre olfato di ammonio, acido citrico e un composto attivo.

(11) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 10, in cui la fase esterna di liposoma contiene zucchero, elettrolita e/o amminoacido.

(12) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 11, in cui la fase esterna di liposoma contiene zucchero, elettrolita, e amminoacido.

(13) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 10, in cui la fase esterna di liposoma contiene zucchero o elettrolita e amminoacido.

(14) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 11 a 13, in cui la concentrazione dello zucchero menzionato sopra è dal 2 al 20%.

(15) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 11 a 14, in cui la concentrazione dell'amminoacido menzionato sopra è da 1 a 300 mM.

(16) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 15, in cui la fase esterna di liposoma contiene saccarosio o cloruro di sodio, e istidina.

(17) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 16, in cui la fase interna di liposoma menzionata sopra non contiene sostanzialmente ciclodestrina.

(18) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 17, in cui il liposoma contiene fosfatidilcolina idrogenata.

(19) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 18, in cui il liposoma contiene colesterolo.

(20) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 19, in cui il liposoma contiene condensato di metossi-polietilenglicole.

(21) La composizione liposomiale secondo 20, in cui il condensato di metossi-polietilenglicole menzionato sopra è condensato di distearoilfosfatidil etanolammino polietilenglicole.

(22) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 21, in cui il liposoma contiene fosfatidilcolina idrogenata, colesterolo, e condensato di distearoilfosfatidil etanolammino polietilenglicole.

(23) La composizione liposomiale secondo 22, che contiene dal 10 all'80% della fosfatidilcolina idrogenata menzionata sopra, dall'1 al 60% del colesterolo menzionato sopra, e dallo 0 al 50% del condensato di distearoilfosfatidil etanolammino polietilenglicole menzionato sopra.

(24) La composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 23, in cui il liposoma contiene fosfatidilcolina di soia idrogenata, colesterolo, e polietilenglicole 2000-fosfatidiletanolamina.

(25) Un metodo di fabbricazione della composizione liposomiale secondo uno qualsiasi di da 1 a 24, comprendente: una fase in cui viene fornito un liquido di dispersione di liposoma contenente liposoma;

una fase in cui il liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra viene miscelato con il composto attivo menzionato sopra; e

una fase in cui il composto attivo menzionato sopra viene introdotto nella fase interna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra,

in cui la fase in cui è fornito il liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra include: una fase in cui viene fornita una soluzione di preparazione di liposoma che contiene liposoma e che contiene sale di ammonio nella fase interna di liposoma e nella fase esterna di liposoma; e

una fase in cui la fase esterna di liposoma della soluzione di preparazione di liposoma menzionata sopra viene sostituita o diluita, e

in cui la fase in cui la fase esterna di liposoma menzionata viene sostituita o diluita è una fase in cui il pH della fase esterna di liposoma viene reso più elevato del pH della fase interna di liposoma.

(26) Il metodo secondo 25, in cui il liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra non contiene sostanzialmente sale di ammonio nella fase esterna di liposoma.

(27) Il metodo secondo 25 o 26, in cui il pH della fase esterna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra è da 3 a 10.

(28) Il metodo secondo uno qualsiasi di da 25 a 27, in cui il pH della fase esterna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra è da 7 a 10.

(29) Il metodo secondo 27 o 28, in cui il pH menzionato sopra è il pH della fase esterna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra nella fase in cui il liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra e il composto attivo menzionato sopra sono miscelati.

(30) Il metodo secondo uno qualsiasi di da 25 a 29, in cui la fase in cui la fase esterna di liposoma menzionata sopra viene sostituita o diluita è una fase in cui la differenza tra il pH della fase interna di liposoma e il pH della fase esterna di liposoma è da 1 a 5.

(31) Il metodo secondo uno qualsiasi di da 25 a 30, in cui il pH della fase interna di liposoma menzionato sopra è da 3 a 9.

(32) Il metodo secondo uno qualsiasi di da 25 a 31, in cui il pH della fase interna di liposoma menzionato sopra è da 4 a 9.

(33) Il metodo secondo uno qualsiasi di da 25 a 32, in cui il pH della fase interna di liposoma menzionato sopra è da 5 a 8.

(34) Il metodo secondo uno qualsiasi di da 25 a 33, in cui la fase esterna di liposoma è una soluzione che contiene elettrolita nella fase in cui viene introdotto il composto attivo menzionato sopra.

(35) Il metodo secondo uno qualsiasi di da 25 a 34, in cui il liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra non contiene sostanzialmente ciclodestrina nella fase interna di liposoma.

(36) Il metodo secondo uno qualsiasi di da 25 a 35, che contiene inoltre una fase in cui il pH della fase esterna di liposoma viene neutralizzato.

#### Effetto dell'invenzione

[0013] Secondo la presente invenzione, è possibile offrire una nuova composizione liposomiale. La composizione liposomiale della presente invenzione intrappola un composto attivo nella fase interna di liposoma con un grado elevato di efficienza, ed ha una elevata stabilità di ritenzione del composto attivo.

#### Breve descrizione dei disegni

[0014] (Fig. 1) mostra cambiamenti *in vitro* nella concentrazione di mesilato di eribulina in una composizione liposomiale nel plasma di sangue di ratto (37°C).

(Fig. 2) mostra l'attività anti-tumorale *in vivo* di mesilato di eribulina dovuta a liposoma in topi nudi recanti cancro di FaDu.

(Fig. 3) mostra l'attività anti-tumorale *in vivo* di mesilato di eribulina dovuta a liposoma in topi nudi recanti cancro di ACHN.

Modo migliore per realizzare l'invenzione

[0015] La presente invenzione viene descritta in maniera specifica mediante modalità per realizzare l'invenzione, ma la presente invenzione non è limitata alle seguenti modalità per realizzare l'invenzione, e può essere realizzata con una varietà di modificazioni.

I contenuti divulgati nella letteratura riferita nella presente invenzione sono incorporati nella presente invenzione come riferimento.

[0016] (Definizioni)

"Liposoma" significa vescicole microscopiche chiuse aventi una fase interna racchiusa da un doppio strato lipidico. Nella presente invenzione, liposoma include liposoma a singola membrana piccolo (SUV: vescicola uni-lamellare piccola), liposoma a singola membrana grande (LUV: vescicola uni-lamellare grande), liposoma a singola membrana ancora più grande (GUV: vescicola uni-lamellare gigante), liposoma multi-strato avente più membrane concentriche (MLV: vescicola multi-lamellare), liposoma avente più membrane che non

sono concentriche, ma irregolari (MVV: vescicole multi-vescicolari), eccetera.

"Fase interna di liposoma" significa una regione acquosa racchiusa nel doppio strato lipidico del liposoma, e viene usato con lo stesso significato di "fase acquosa interna" e "fase acquosa interna di liposoma". "Fase esterna di liposoma" significa la regione non racchiusa dal doppio strato lipidico del liposoma (vale a dire, la regione a parte la fase interna e il doppio strato lipidico) nel caso in cui il liposoma sia disperso in un liquido.

[0017] "Composizione liposomiale" significa una composizione che contiene un liposoma e che contiene inoltre mesilato di eribulina nella fase interna di liposoma. Nella presente invenzione, la composizione liposomiale include entrambe la forma solida e quella liquida.

"Liquido di dispersione di liposoma" significa una composizione contenente un liposoma, ed è una composizione che precede l'introduzione del composto attivo nella fase interna di liposoma.

"Soluzione di preparazione di liposoma" significa una composizione contenente un liposoma, ed è una composizione che precede la regolazione della fase esterna di liposoma per scopi di intrappolamento di mesilato di eribulina nella fase interna di liposoma.

"Reagente di liposoma" significa un liquido di dispersione di un liposoma, nel caso in cui esso sia in una forma liquida. Nel caso in cui esso sia in una forma solida, significa un reagente da cui il liquido di

dispersione di liposoma può essere ottenuto mediante dissoluzione o sospensione in un solvente prescritto. Il solvente viene descritto di seguito. Come descritto di seguito, un reagente di liposoma solido può essere ottenuto, per esempio, mediante essiccazione di un liquido di dispersione di liposoma.

Nella presente descrizione specifica, "la miscelazione di solido e liquido" include la dissoluzione e la sospensione del solido nel liquido, e miscelazione, dissoluzione e sospensione vengono utilizzati in una maniera reciprocamente intercambiabile. Allo stesso modo, mezzi di solvente e dispersione vengono anche utilizzati in una maniera reciprocamente intercambiabile.

Inoltre, la composizione liposomiale, il liquido di dispersione di liposoma, la soluzione di preparazione di liposoma e il reagente di liposoma della presente invenzione non contengono sostanzialmente ciclodestrina. "Non contenere sostanzialmente ciclodestrina" significa che non vi è alcuna addizione di ciclodestrina. È sufficiente se la ciclodestrina non è contenuta in una quantità in cui il miglioramento della solubilità (solubilità nominale) del composto attivo dovuto alla ciclodestrina è significativamente osservabile, e persino nel caso in cui essa viene aggiunta in una quantità in cui il miglioramento nella solubilità del composto attivo è non significativamente osservabile, essa non deve essere esclusa dall'implementazione della presente invenzione.

Inoltre, come una modalità preferita della presente invenzione, "il liquido di dispersione di liposoma sostanzialmente non contenente sale di ammonio nella fase esterna di liposoma" significa che il sale di ammonio non viene aggiunto alla fase esterna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma. L'aggiunta di sale di ammonio in una quantità che è all'interno di un intervallo che può conseguire l'obiettivo della presente invenzione non deve essere esclusa dall'implementazione della presente invenzione. Nel caso in cui il sale di ammonio sia contenuto nella fase esterna di liposoma di una soluzione di preparazione di liposoma, è possibile preparare un liquido di dispersione di liposoma che non contenga sostanzialmente sale di ammonio sostituendo o diluendo la fase esterna di liposoma della soluzione di preparazione di liposoma usando una soluzione che non contiene sostanzialmente sale di ammonio.

[0018] (Composto attivo)

Il composto attivo della presente invenzione è eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile (qui di seguito talvolta riferito come "eribulina, eccetera"). Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda il sale farmacologicamente accettabile a condizione che l'eribulina e il sale siano formati, sia sale di acido inorganico o sale di acido organico. Per esempio, si possono citare sale di acido cloridrico, sale di acido solforico, citrato, sale di acido bromidrico, sale di acido iodidrico, sale di acido nitrico, bisolfato, sale di acido fosforico, super sale di acido fosforico, sale di acido isonicotinico, sale di acido

acetico, sale di acido lattico, sale di acido salicico, sale di acido tartarico, sale di acido pantotenico, sale di acido ascorbico, sale di acido succinico, sale di acido maleico, sale di acido fumarico, sale di acido gluconico, sale di acido saccarinico, sale di acido formico, sale di acido benzoico, sale di acido glutammico, sale di acido metansolfonico, sale di acido etansolfonico, sale di acido benzensolfonico, sale di acido p-toluensolfonico, sale di acido pamoico (pamoato), e così via. Tra questi sono preferibili sale di acido cloridrico, sale di acido solforico, sale di acido acetico, sale di acido fosforico, citrato e sale di acido mesilico e il più preferibile di tutti è sale di acido mesilico. Vale a dire, il composto attivo preferibile della presente invenzione è mesilato di eribulina. Inoltre, come il sale farmacologicamente accettabile di eribulina, è accettabile utilizzare eribulina e sale di alluminio, calcio, litio, magnesio, calcio [sic], sodio, zinco e dietanolammina. Eribulina o il suo sale farmacologicamente accettabile è il composto o un suo sale registrato nel pamphlet di Pubblicazione Internazionale PCT WO 99/65894 o Brevetto degli Stati Uniti 6214865 (i contenuti registrati in questi brevetti sono incorporati qui per riferimento), e ha un'azione farmacologica che include una azione anti-tumorale e una azione anti-mitotica. Eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile esibisce un'azione anti-tumorale rispetto a melanoma, fibrosarcoma, leucemia monocitica, cancro al colon, cancro ovarico, cancro al seno, cancro alle ossa, cancro alla prostata, cancro ai polmoni, e fibroblasti trasformati da ras.

[0019] Tuttavia, come composti attivi che possono essere combinati con eribulina, eccetera, si può scegliere tra i composti usati nei campi di medicina (inclusi farmaci diagnostici), prodotti cosmetici, prodotti alimentari, e così via. In relazione ai composti attivi, è accettabile combinare uno o più composti diversi da eribulina, eccetera.

Come composti attivi, si possono citare composti a basso peso molecolare, eccetera. Tra questi, sono adeguati composti utilizzati come agenti anti-tumorali, agenti anti-batterici, agenti anti-infiammatori, agenti per l'infarto miocardico, e agenti di contrasto.

Per quanto riguarda il peso molecolare del composto attivo, un intervallo di da 100 a 2000 è preferibile, un intervallo di da 200 a 1500 è preferibile, e un intervallo di da 300 a 1000 è ancora più preferibile. All'interno di questi intervalli, la permeabilità della membrana di liposoma del composto attivo è generalmente soddisfacente, e la presente invenzione può essere applicata in maniera adeguata.

I composti attivi includono composti solubili in acqua e composti lipofili e a condizione che essi siano più o meno solubili in acqua o in solventi acquosi, la presente invenzione può essere applicata.

[0020] Non vi sono particolari limitazioni per quanto riguarda gli agenti anti-tumorali nella presente invenzione, e si possono citare, per esempio, derivati di camptotecina come cloridrato di irinotecan, cloridrato di nogitecan, exatecan, RFS-2000, lurtotecan, BNP-1350, Bay-383441, PNU-166148, IDEC-132, BN-80915, DB-38, DB-81, DB-90, DB-91, CKD-620, T-0128, ST-1480, ST-1481, DRF-1042, DE-310;

derivati di taxano, come docetaxel idrato, docetaxel, pacritaxel, IND-5109, BMS-184476, BMS-188797, T-3782, TAX-1011, SB-RA-31012, SBT-1514, e DJ-927; ifosfammide, cloridrato di nimstina, carvocon, ciclofosfammide, dacarbazina, tiotepa, busulfan, melfaran, ranimustina, fosfato di estramustina sodica, 6-mercaptopurina riboside, enocitabina, cloridrato di gemcitabina, carmfur, citarabina, ocfosfato di citarabina, tegafur, doxifluridina, idrossicarbammide, fluorouracile, metotrexato, mercaptopurina, fosfato di fludarabina, actinomicina D, cloridrato di aclarubicina, cloridrato di idarubicina, cloridrato di pirarubicina, cloridrato di epirubicina, cloridrato di daunorubicina, cloridrato di doxorubicina, epirubicina, pirarubicina, daunorubicina, doxorubicina cloridrato di pirarubicina, cloridrato di bleomicina, zinostatin stimalamer, zinostatina, mitomicina C, solfato di bleomicina, solfato di peplomicina, etoposide, tartrato di vinorelbina, solfato di vincrestina, solfato di vindesina, solfato di vinblastina, cloridrato di amrubicina, gefinitib, exemestano, capecitabina, TNP-470, TAK-165, KW-2401, KW-2170, KW-2871, KT-5555, KT-8391, TZT-1027, S-3304, CS-682, YM-511, YM-598, TAT-59, TAS-101, TAS-102, TA-106, FK-228, FK-317, E7070 (8E, 12E, 14E)-7-[(4-cicloeptipiperazina-1-il)carbonil]ossi-3,6,16,21-tetraidrossi-6,10,12,16,20-pentametil-18,19-epossitricosa-8,12,14-trien-11-olide (E7107), KRN-700, KRN-5500, J-107088, HMN-214, SM-11355, ZD-0473, eccetera. Per quanto riguarda i composti registrati come sali tra gli agenti anti-tumorali menzionati sopra, qualsiasi sale è

accettabile, e sono anche accettabili corpi liberi. Per quanto riguarda i composti registrati come corpi liberi, qualsiasi sale è accettabile.

[0021] Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda gli agenti antibatterici, e si possono citare, per esempio, amfotericina B, cefotiam esil, cefalosporina, cloramfenicolo, diclofenac, eccetera. Per quanto riguarda i composti degli agenti anti-batterici menzionati sopra, qualsiasi sale è accettabile.

[0022] Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda gli agenti anti-infiammatori, e si possono citare, per esempio, prostaglandine (PGE1, PGE2), desametasone, idrocortisone, piroxicam, indometacina, prednisolone, eccetera. Per quanto riguarda i composti degli agenti anti-infiammatori menzionati sopra, qualsiasi sale è accettabile.

[0023] Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda gli agenti per l'infarto miocardico, e si possono citare, per esempio, adenosina, atenololo, pilsicainide, eccetera, e come agenti di contrasto, si possono citare, per esempio, lopamidolo, acido iossaglico, ioexolo, iomeprolo, eccetera. Per quanto riguarda i composti degli agenti anti-infarto miocardico e degli agenti di contrasto, qualsiasi sale è accettabile.

[0024] (Lipidi)

È preferibile che i costituenti di membrana del liposoma della presente invenzione includano fosfolipidi e/o derivati di fosfolipidi. Come fosfolipidi e derivati di fosfolipidi, si possono citare, per esempio,

fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositolo, fosfatidilglicerolo, cardiolipina, sfingomieline, fosforiletanolamina cerammide, fosforilglicerolo cerammide, fosforilglicerolofosfato cerammide, 1,2-dimiristoil-1,2-deossifosfatidilcolina, plasmalogeno, acido fosfatrico, eccetera. È anche accettabile combinare uno o più di questi fosfolipidi e derivati di fosfolipidi.

Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda i residui di acidi grassi nei fosfolipidi e nei derivati di fosfolipidi, e si può citare, per esempio, un residuo di acido grasso saturo o insaturo con un numero di carboni di da 12 a 20. In maniera specifica, si possono citare gruppi acile derivati da acidi grassi come acido laurico, acido miristico, acido palmitico, acido stearico, acido oleico, e acido linoleico. Si possono anche usare fosfolipidi derivati da sostanze naturali come lecitina di tuorlo d'uovo e lecitina di soia, lecitina di tuorlo d'uovo parzialmente idrogenata, lecitina di tuorlo d'uovo (completamente) idrogenata, lecitina di soia parzialmente idrogenata e lecitina di soia (completamente) idrogenata, i cui residui di acidi grassi insaturi sono parzialmente o completamente idrogenati, eccetera.

Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda la quantità di miscelazione (frazione molare) dei fosfolipidi e/o dei derivati di fosfolipidi che vengono utilizzati quando si prepara il liposoma, ma dal 10 all'80% rispetto all'intera composizione di membrana del liposoma è preferibile, e dal 30 al 60% è più preferibile.

[0025] Con riferimento ai costituenti di membrana, a parte i fosfolipidi e/o i derivati di fosfolipidi, il liposoma della presente invenzione può anche includere steroli come colesterolo e colesteno come stabilizzatori della membrana, gli acidi grassi avendo gruppi acile saturi o insaturi con un numero di carboni di da 8 a 22, e anti-ossidanti come l' $\alpha$ -tocoferolo.

Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda la quantità di miscelazione (frazione molare) di questi steroli che vengono utilizzati quando si prepara il liposoma, ma dall'1 al 60% rispetto all'intera composizione di membrana del liposoma è preferibile, dal 10 al 50% è più preferibile, e dal 30 al 50% è ancora più preferibile.

Inoltre, non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda la quantità di miscelazione (frazione molare) degli acidi grassi, ma dallo 0 al 30% rispetto all'intera composizione di membrana del liposoma è preferibile, dallo 0 al 20% è più preferibile, e dallo 0 al 10% ancora più preferibile. Per quanto riguarda la quantità di miscelazione (frazione molare) degli anti-ossidanti, è sufficiente se viene aggiunta una quantità che può ottenere l'effetto anti-ossidante, ma dallo 0 al 15% dell'intera composizione di membrana del liposoma è preferibile, dallo 0 al 10% è più preferibile, e dallo 0 al 5% è ancora più preferibile.

[0026] Il liposoma della presente invenzione può anche contenere lipidi funzionali e lipidi modificati come costituenti di membrana.

Come lipidi funzionali, si possono citare derivati di lipide trattenuti nel sangue, derivati di lipide sensibili alla temperatura, derivati di lipide sensibili al pH, eccetera. Come lipidi modificati, si possono citare lipidi di PEG, lipidi di zucchero, lipidi modificati da anticorpo, lipidi modificati da peptide, eccetera.

[0027] Come derivati di lipidi trattenuti nel sangue, si possono citare, per esempio, glicoforina, ganglioside GM1, ganglioside GM3, derivati dell'acido glucuronico, derivati dell'acido glutammico, derivati di fosfolipidi di poliglicerina, derivati di polietilenglicole (condensati di metossi-polietilenglicole, eccetera) come N-[carbonil-metossi-polietilenglicole-2000]-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, N-[carbonile-metossi-polietilenglicole-5000]-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, N-[carbonil-metossi-polietilenglicole-750]-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, N-[carbonil-metossi-polietilenglicole-2000]-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (MPEG 2000-distearoil fosfatidiletanolamina) e N-[carbonil-metossi-polietilenglicole-5000]-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, che sono condensati di fosfoetanolamina e metossi-polietilenglicole. Avendo il liposoma contenuto derivati di lipide con proprietà di ritenzione di sangue, è possibile migliorare la ritenzione nel sangue del liposoma, dal momento che il liposoma diventa difficile da catturare nel fegato, eccetera come una impurità estranea.

[0028] Come derivati di lipidi sensibili alla temperatura, si può citare, per esempio, dipalmitoilfosfatidilcolina, eccetera. Avendo il

liposoma contenuto derivati di lipidi sensibili alla temperatura, è possibile causare la distruzione di liposoma a temperature specifiche, e causare cambiamenti nelle proprietà di superficie del liposoma. Inoltre, combinando questo con un aumento nella temperatura al sito bersaglio del tumore, eccetera, è possibile distruggere il liposoma al sito bersaglio, e rilasciare il composto attivo al sito bersaglio.

[0029] Come lipidi sensibili al pH, si può citare, per esempio, dioleoil fosfatidiletanolamina, eccetera. Avendo il liposoma contenuto derivati lipidi sensibili al pH, è possibile promuovere la fusione di membrana di liposoma ed endosoma quando il liposoma viene incorporato nelle cellule a causa dell'endocitosi, e migliorare la trasmissione del composto attivo al citoplasma.

[0030] Come lipidi di zucchero, lipidi modificati da anticorpo, e lipidi modificati da peptide, si possono citare i lipidi che sono legati con zuccheri, anticorpi, o peptidi che sono compatibili con le cellule bersaglio o il tessuto bersaglio. Utilizzando i lipidi modificati, il liposoma può essere trasmesso attivamente alle cellule bersaglio o al tessuto bersaglio.

Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda la quantità di miscelazione (frazione molare) di derivati di lipide con proprietà di ritenzione nel sangue utilizzati quando si prepara il liposoma, ma dallo 0 al 50% della totalità dei lipidi costituenti la membrana del liposoma è preferibile, dallo 0 al 30% è più preferibile, e dallo 0 al 20% è ancora più preferibile.

[0031] (Liposomi)

Come menzionato sopra, un liposoma è una vescicola chiusa microscopica avente una fase interna racchiusa da un doppio strato lipidico.

Idealmente, in relazione al liposoma, a) è preferibile che il liposoma abbia una funzione di barriera che impedisce la fuoriuscita di eribulina, eccetera alla fase esterna di liposoma dopo che l'eribulina, eccetera è una volta intrappolata nella fase interna del liposoma. Nel caso in cui esso venga usato come una medicina, è preferibile che il liposoma esibisca stabilità *in vivo*, e che il liposoma abbia una funzione di barriera che impedisce la fuoriuscita di eribulina, eccetera alla fase esterna di liposoma nel sangue quando il liposoma viene somministrato *in vivo*.

La composizione di costituenti di membrana per il liposoma avente una tale permeabilità della membrana ad un livello che consente l'applicazione pratica può essere selezionata in maniera appropriata dai tecnici del ramo in accordo con il composto attivo, il tessuto bersaglio e simili facendo riferimento, se necessario, alle forme di realizzazione descritte di seguito (Hiroshi Kikuchi, et Al., "Liposome I-Preparation Method and Assay Method-," Cell Technology (1983), 2(9): pp. 1136-1149, e letteratura di riferimento citata in detta letteratura).

[0032] Quando viene utilizzata come medicina, è preferibile che l'eribulina, eccetera venga rilasciata dal liposoma dopo che il liposoma raggiunge il tessuto, le cellule o gli organelli intracellulari bersaglio. In

relazione al liposoma, i costituenti di membrana stessi sono normalmente biodegradabili, e infine si decompongono nel tessuto bersaglio o simili. Si pensa che l'eribulina intrappolata, eccetera venga rilasciata in questo modo. Inoltre, è anche accettabile se il liposoma stesso viene incorporato nelle cellule.

Non solo la composizione liposomiale può essere puntata a tessuto bersaglio come cancro solido, ma può anche essere utilizzata per trasmettere composti attivi a cancro ematologico e così via. Essa può anche essere utilizzata come una formulazione a lento rilascio, una formulazione a rilascio controllato, eccetera nel sangue.

[0033] La dimensione delle particelle di liposoma può essere impostata in accordo con l'obiettivo. Per esempio, quando esso è inteso per trasmettere liposoma a tessuto canceroso o tessuto infiammato mediante l'effetto di EPR (permeabilità e ritenzione intensificate) come un prodotto di iniezione o simili, è preferibile che la dimensione delle particelle di liposoma sia da 30 a 400 nm, ed è più preferibile che la dimensione delle particelle di liposoma sia da 50 a 200 nm. Nel caso in cui l'intenzione sia quella di trasmettere il liposoma a macrofagi, è preferibile che la dimensione delle particelle di liposoma sia da 30 a 1000 nm, ed è più preferibile che la dimensione delle particelle di liposoma sia da 100 a 400 nm. Nel caso in cui la composizione liposomiale debba essere utilizzata come una preparazione orale o una preparazione transdermica, la dimensione delle particelle di liposoma può essere impostata a diversi micron. Dovrebbe essere osservato che

(1) in tessuto normale, le pareti vascolari servono come barriere (dal momento che le pareti vascolari sono densamente costituite da cellule endoteliali vascolari), e le microparticelle come supermolecole e liposomi di dimensione specificata non possono essere distribuiti all'interno del tessuto. Tuttavia, nel tessuto malato, le pareti vascolari sono allentate (dal momento che esistono interstizi tra le cellule endoteliali vascolari), aumentando la permeabilità vascolare, e le supermolecole e le microparticelle possono essere distribuite al tessuto extravascolare (permeabilità intensificata). Inoltre, (2) il sistema linfatico è ben sviluppato in tessuto normale, ma è noto che il sistema linfatico non è sviluppato nel tessuto malato, e che le supermolecole o microparticelle, una volta incorporate, non vengono riciclate attraverso il sistema generale, e vengono trattenute nel tessuto malato (ritenzione intensificata) - questo viene chiamato l'effetto di EPR (Matsumura, Maeda, Cancer Research, (1986), 46: pp. 6387-6392). Di conseguenza, è possibile controllare la farmacocinetica regolando la dimensione delle particelle di liposoma.

Nella presente invenzione, la dimensione delle particelle di liposoma significa la dimensione media ponderale delle particelle secondo il metodo di diffusione della luce dinamica (metodo di diffusione della luce quasi-elastica). Qui, viene mostrato che la dimensione delle particelle viene misurata mediante strumenti di diffusione della luce dinamica (per esempio, il modello Zetasizer Nano ZS prodotto da Malvern Instruments Ltd. e ELS-8000 prodotto da

Otsuka Electronics Co., Ltd.). Gli strumenti misurano il moto browniano delle particelle e la dimensione delle particelle viene determinata sulla base della teoria metodologica della diffusione della luce dinamica stabilita.

[0034] Non vi sono particolari limitazioni per quanto riguarda il solvente della fase interna di liposoma, e si possono citare, per esempio, soluzioni di tampone come soluzione di tampone di fosfato, soluzione di tampone di citrato, e soluzione salina fisiologica tamponata con fosfato, acqua salina fisiologica, terreno di coltura per la coltura cellulare, eccetera. Come solvente, nel caso in cui venga usata una soluzione di tampone, è preferibile che la concentrazione di agente di tampone sia di da 5 a 300 mM, e di da 10 a 100 mM è più preferibile. Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda il pH della fase interna di liposoma, ma da 3 a 11 è preferibile, e da 4 a 9 è più preferibile.

[0035] (Composizione di liposoma)

Una composizione liposomiale viene offerta secondo la presente invenzione. La composizione liposomiale contiene un liposoma, e contiene inoltre eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile, sale di ammonio e sale, acido, base e/o amminoacido nella fase interna di liposoma. Come menzionato in precedenza, la composizione liposomiale include entrambe una forma solida e una forma liquida. Nel caso in cui il liposoma sia in una forma solida, esso può essere reso in una forma liquida sciogliendolo o sospendendolo in

un solvente prescritto come descritto di seguito. Nel caso in cui la composizione liposomiale sia solida congelata, essa può essere resa in una forma liquida mediante fusione lasciandola a temperatura ambiente.

La concentrazione del liposoma e la concentrazione del composto attivo nella composizione liposomiale possono essere impostate in maniera appropriata in accordo con l'obiettivo di composizione liposomiale, la formulazione, eccetera. Nel caso in cui la composizione liposomiale sia una formulazione liquida, la concentrazione di liposoma come la concentrazione di tutti i lipidi costituenti il liposoma può essere impostata a da 0,2 a 100 mM, e preferibilmente da 1 a 30 mM. La concentrazione (dosaggio) del composto attivo nel caso in cui la composizione liposomiale venga usata come una medicina viene descritta di seguito. Per quanto riguarda la quantità di ciclodestrina nella composizione liposomiale, è preferibile che essa sia meno di 0,1 moli equivalenti rispetto all'eribulina, eccetera, ed è più preferibile che sia inferiore al limite di rilevamento.

Nella composizione liposomiale della presente invenzione, l'eribulina, eccetera può essere ripartita al doppio strato lipidico.

[0036] Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda il solvente (mezzo di dispersione) della composizione liposomiale, nel caso in cui la composizione liposomiale sia una formulazione liquida, e si possono citare, per esempio, soluzioni di tampone come soluzione di

tampone di fosfato, soluzione di tampone di citrato, soluzione salina fisiologica tamponata con fosfato, acqua salina fisiologica, e terreni di coltura per la coltura cellulare. Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda il pH della fase esterna di liposoma della composizione liposomiale, ma da 3 a 11 è preferibile, e da 4 a 9 è più preferibile.

[0037] Alla composizione liposomiale si può anche aggiungere quanto segue: monosaccaridi come glucosio, galattosio, mannosio, fruttosio, inositolo, ribosio e xilosio; disaccaridi come lattosio, saccarosio, cellobiosio, trealosio, e maltosio; trisaccaridi come raffiniosio e melizitosio; polisaccaridi come ciclodestrina; e polialcoli come eritritolo, xilitolo, sortibolo, mannitolo e maltitolo; alcoli polivalenti come glicerina, diglicerina, poliglicerina, propilenglicole, polipropilenglicole, etilenglicole, dietilenglicole, trietilenglicole, polietilenglicole, monoalchilere di etilenglicole, monoalchilere di dietilenglicole, 1,3-butilenglicole. Si possono anche usare combinazioni di zucchero e alcool.

Ai fini di una conservazione stabile a lungo termine del liposoma che è disperso nel solvente (mezzo di dispersione), dal punto di vista della stabilità fisica, inclusa la coagulazione e così via, è preferibile eliminare l'elettrolita nel solvente (mezzo di dispersione) per quanto possibile. Inoltre, dal punto di vista della stabilità chimica dei lipidi, è preferibile impostare il pH del solvente (mezzo disperdente) da acido a vicino al neutro (pH da 3,0 a 8,0), e rimuovere l'ossigeno disciolto tramite gorgogliamento di azoto.

Non vi sono particolari limitazioni per quanto riguarda la concentrazione dello zucchero o dell'alcool polivalente contenuto nella composizione liposomiale, ma in uno stato in cui il liposoma viene disperso in un solvente, per esempio, è preferibile che la concentrazione di zucchero sia dal 2 al 20% (peso/volume), e dal 5 al 10% (peso/volume) è più preferibile. Per quanto riguarda la concentrazione di alcool polivalente, dall'1 al 5% (peso/volume) è preferibile, e dal 2 al 2,5% (peso/volume) è più preferibile. Questi solventi possono anche essere usati come la fase esterna di liposoma nel liquido di dispersione di liposoma, e sostituendo o diluendo la fase esterna di liposoma della soluzione di preparazione di liposoma con questi solventi, è possibile cambiare le soluzioni della fase esterna di liposoma in queste soluzioni.

[0038] È preferibile che le formulazioni solide della composizione liposomiale includano, per esempio, monosaccaridi come glucosio, galattosio, mannosio, fruttosio, inositolo, ribosio e xilosio; disaccaridi come lattosio, saccarosio, cellobiosio, trealosio, e maltosio; trisaccaridi come raffinose e melizitosio; polisaccaridi come ciclodestrina; e polialcoli come eritritolo, xilitolo, sorbitolo, mannitolo, e maltitolo. Più preferibili sono miscele di glucosio, lattosio, saccarosio, trealosio, e sorbitolo. Ancora più preferibili sono miscele di lattosio, saccarosio e trealosio. In questo modo, le formulazioni solide possono essere stabilmente conservate per lunghi periodi. Quando congelate, è preferibile che le formulazioni solide contengano alcoli polivalenti

(soluzioni acquose) come glicerina, diglicerina, poliglicerina, propilenglicole, polipropilenglicole, etilenglicole, dietilenglicole, trietilenglicole, polietilenglicole, monoalchil etero di etilenglicole, monoalchil etero di dietilenglicole e 1,3-butilenglicole. Rispetto agli alcoli polivalenti (soluzioni acquose), glicerina, propilenglicole e polietilenglicole sono preferibili, e glicerina e propilenglicole sono più preferibili. In questo modo, è possibile conservare stabilmente la formulazione solida per lunghi periodi. Zuccheri ed alcoli polivalenti possono essere usati in combinazione.

[0039] (Metodo di fabbricazione della composizione liposomiale)

Secondo la presente invenzione, viene fornito un metodo di fabbricazione per la fabbricazione di una composizione liposomiale contenente eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile. Il metodo per la fabbricazione della composizione liposomiale comprende: una fase in cui viene fornito un liquido di dispersione di liposoma contenente un liposoma; una fase in cui il liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra viene miscelato con il composto attivo menzionato sopra (eribulina o un suo farmacologicamente sale ammissibile); ed una fase in cui il composto attivo menzionato sopra viene introdotto nella fase interna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra.

[0040] Qui, la fase in cui viene fornito il liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra comprende: una fase in cui viene fornita

una soluzione di preparazione di liposoma che contiene un liposoma e che contiene sale di ammonio nella fase interna di liposoma e nella fase esterna di liposoma; ed una fase in cui la fase esterna di liposoma della soluzione di preparazione di liposoma menzionata sopra viene sostituita o diluita, e la fase in cui la fase esterna di liposoma menzionata sopra viene sostituita o diluita è una fase in cui il pH della fase esterna di liposoma viene reso più elevato del pH della fase interna di liposoma.

[0041] La soluzione di preparazione di liposoma può essere fornita, per esempio, preparando il liposoma in una soluzione contenente sale di ammonio. Preparando la soluzione di preparazione di liposoma in una soluzione contenente sale di ammonio, è possibile creare un liquido di dispersione di liposoma che contiene anche il sale di ammonio nella fase interna di liposoma.

Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda la soluzione contenente sale di ammonio che viene utilizzata nella preparazione della soluzione di preparazione di liposoma, e può essere utilizzata qualsiasi soluzione contenente sale di ammonio.

Come il sale di ammonio, si possono citare, per esempio, cloruro di ammonio, borato di ammonio, solfato di ammonio, formiato di ammonio, acetato di ammonio, citrato di ammonio, tartrato di ammonio, succinato di ammonio e fosfato di ammonio. Solfato di ammonio, acetato di ammonio, citrato di ammonio, tartrato di ammonio, e fosfato di ammonio sono preferibili tra questi; solfato di ammonio, citrato di

ammonio e tartrato di ammonio sono più preferibili; e solfato di ammonio è il più preferibile.

Si possono usare questi sali di ammonio in combinazioni di due o più.

[0042] La concentrazione di sale di ammonio nella soluzione contenente sale di ammonio può essere impostata in maniera appropriata in base alla quantità di eribulina, eccetera che deve essere intrappolata, e più è elevata più è meglio; 10 mM o più è preferibile; 20 mM o più è più preferibile; e 50 mM o più è ancora più preferibile. Per quanto riguarda il pH della soluzione contenente sale di ammonio, da 3 a 9 è preferibile, da 4 a 9 è più preferibile dal punto di vista del bilanciamento del rapporto di intrappolamento e della stabilità, e da 5 a 8 è ancora più preferibile.

Un regolatore di pH può essere usato al fine di regolare il pH della soluzione contenente sale di ammonio. Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda la concentrazione dei singoli regolatori di pH nella soluzione contenente sale di ammonio, ma da 1 a 300 mM è preferibile, e da 5 a 100 mM è più preferibile.

Come il regolatore del pH, si possono citare, per esempio, amminoacidi come arginina, istidina e glicina; acidi come acido ascorbico, acido benzoico, acido succinico, acido citrico, acido glutammico, acido fosforico, acido acetico, acido propionico, acido tartarico, acido carbonico, acido lattico, acido borico, acido maleico, acido fumarico, acido malico, acido adipico, acido cloridrico, e acido

solforico; sali degli acidi menzionati sopra come sale di sodio, sale di potassio e sale di ammonio; e composti alcalini (base) come tris-idrossimetilamminometano, ammoniaca in acqua (ammoniaca), idrossido di sodio e idrossido di potassio. Come regolatori di pH, idrossido di sodio, acido cloridrico, ammoniaca in acqua, acido acetico, acido lattico, acido tartarico, acido succinico, acido citrico, e acido fosforico sono preferibili; idrossido di sodio, ammoniaca in acqua, acido cloridrico, acido acetico, acido citrico, e acido fosforico sono più preferibili; e idrossido di sodio, ammoniaca in acqua, acido cloridrico, acido citrico e acido fosforico sono ancora più preferibili. I regolatori di pH possono essere usati in combinazioni di due o più dei sali di ammonio. In aggiunta, soluzioni di tampone possono anche essere usate come regolatori di pH, come soluzione di tampone di fosfato, soluzione di tampone di citrato, e soluzione salina fisiologica tamponata con fosfato.

Come la soluzione di preparazione di liposoma, è meglio usare una soluzione che viene ottenuta preparando il liposoma senza inclusione sostanziale di ciclodestrina. Come la soluzione di preparazione di liposoma, la fase interna di liposoma contiene inoltre sale, acido, base, e/o amminoacido. In questo caso, è preferibile che la fase interna di liposoma contenga il composto attivo, sale di ammonio e acido. Come il sale di ammonio, solfato di ammonio può essere citato come l'esempio preferito; come acido, l'acido citrico può essere citato come l'esempio preferito.

[0043] Per quanto riguarda la preparazione di liposoma, si possono citare il metodo di pellicola lipidica (metodo Vortex), il metodo di evaporazione a fase inversa, il metodo ad ultrasuoni, il metodo di pre-vescicola, il metodo di iniezione di etanolo, il metodo di French press, il metodo di rimozione di acido colico, il metodo di bagno di Triton X-100, il metodo di fusione con  $\text{Ca}^{2+}$ , il metodo di iniezione di etere, il metodo di riscaldamento-raffreddamento, il metodo di congelamento-scongelo, eccetera.

Le varie condizioni (quantità di costituenti della membrana, temperatura, eccetera) nella preparazione di liposoma, possono essere selezionate in maniera adeguata secondo il metodo di preparazione di liposoma, la composizione liposomiale bersaglio, la dimensione delle particelle, eccetera (vedere Op. cit, Kikuchi (1983), eccetera).

[0044] La dimensione delle particelle di liposoma può essere regolata facoltativamente come necessario. La dimensione delle particelle può essere regolata, per esempio, conducendo l'estrusione (filtrazione per estrusione) ad alta pressione utilizzando un filtro a membrana di diametro dei pori regolare. La regolazione della dimensione delle particelle può essere effettuata in qualsiasi momento durante la fabbricazione della composizione liposomiale della presente invenzione. Per esempio, può essere condotta prima della regolazione della fase esterna di liposoma nella soluzione di preparazione di liposoma, dopo la regolazione della fase esterna di liposoma nella soluzione di preparazione di liposoma, o dopo l'introduzione del

composto attivo nella fase interna di liposoma. È preferibile condurre la regolazione della dimensione delle particelle prima dell'introduzione del composto attivo nella fase interna di liposoma, ed è più preferibile condurla prima della regolazione della fase esterna di liposoma nella soluzione di preparazione di liposoma.

[0045] Il liquido di dispersione di liposoma può essere ottenuto sostituendo o diluendo la fase esterna della soluzione di preparazione di liposoma ottenuta. La sostituzione o la diluizione della fase esterna di liposoma può essere condotta una volta, oppure una combinazione di svariati tipi di metodi di sostituzione o di diluizione possono essere condotti più volte.

[0046] Come un metodo per sostituire la fase esterna di liposoma della soluzione di preparazione di liposoma, si possono citare dialisi, separazione centrifuga e filtrazione su gel. Sostituendo la fase esterna di liposoma, la presente invenzione può essere implementata in modo tale che la fase esterna di liposoma non contenga sostanzialmente ciclodestrina o sale di ammonio. Inoltre, sostituendo o diluendo la fase esterna di liposoma, è possibile intrappolare efficacemente eribulina o un suo farmacologicamente sale ammissibile nella fase interna di liposoma.

[0047] La dialisi può essere condotta, per esempio, utilizzando una membrana da dialisi. Come una membrana da dialisi, si può citare una membrana con taglio di peso molecolare, come una provetta di cellulosa o Spectra/Por.

Per quanto riguarda la separazione centrifuga, l'accelerazione centrifuga può essere condotta preferibilmente a 100000 g o più elevata, e più preferibilmente a 300000 g o più elevata. Sostituendo la fase esterna di liposoma mediante centrifugazione, si può anche condurre la concentrazione del liposoma in concomitanza con la sostituzione della fase esterna di liposoma.

La filtrazione su gel può essere effettuata, per esempio, conducendo un frazionamento sulla base del peso molecolare utilizzando una colonna come Sephadex o Sepharose.

[0048] Come il solvente (mezzo di dispersione) utilizzato per la sostituzione e/o diluizione della fase esterna di liposoma, si possono citare, per esempio, soluzione di saccarosio, soluzione salina, e terreno di coltura per la coltura cellulare. Utilizzando questi solventi, è possibile preparare una composizione liposomiale stabile.

[0049] Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda il pH di detto solvente, ma può essere impostato un intervallo di da 2 a 11; da 3 a 10 è preferibilmente, da 6 a 10 è più preferibile, e da 7 a 10 è ancora più preferibile. Come descritto di seguito, un gradiente di pH può essere utilizzato per introdurre l'eribulina, eccetera nella fase interna di liposoma. In questo caso, il pH del solvente può essere impostato in modo tale che la fase esterna di liposoma raggiunga il pH bersaglio.

[0050] Un regolatore di pH può essere usato per regolare il pH di detto solvente. Non ci sono limitazioni particolari per quanto riguarda

la concentrazione di uso, ma da 1 a 300 mM è preferibile, e da 5 a 100 mM è più preferibile.

Come il regolatore del pH, si possono citare, per esempio, amminoacidi come arginina, istidina e glicina; acidi come acido ascorbico, acido benzoico, acido succinico, acido citrico, acido glutammico, acido fosforico, acido acetico, acido propionico, acido tartarico, acido carbonico, acido lattico, acido borico, acido maleico, acido fumarico, acido malico, acido adipico, acido cloridrico, e acido solforico; sali degli acidi menzionati sopra come sale di sodio, sale di potassio e sale di ammonio; e composti alcalini come tris-idrossimetilamminometano, ammoniaca in acqua, idrossido di sodio e idrossido di potassio. Idrossido di sodio, acido cloridrico, istidina, acido tartarico, acido succinico, acido citrico, e acido fosforico sono preferibili; idrossido di sodio, acido cloridrico, istidina, acido tartarico, acido citrico, e acido fosforico sono più preferibili; e idrossido di sodio, acido cloridrico, istidina, acido fosforico sono ancora più preferibili.

[0051] Al fine di migliorare il rapporto di intrappolamento di eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile in liposoma, il rapporto di intrappolamento può essere aumentato aggiungendo una soluzione (soluzione salina) contenente un elettrolita alla fase esterna di liposoma per aumentare l'intensità di ioni. Non ci sono limitazioni particolari per quanto riguarda l'elettrolita (sale) contenuto nella fase esterna di liposoma, ma cloruro di sodio e cloruro di potassio sono preferibili, e cloruro di sodio è più preferibile. Può anche essere usata la

soluzione salina fisiologica. Inoltre, come la fase esterna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma o simili, possono anche essere inclusi zucchero, elettrolita e/o amminoacido, e possono anche essere inclusi zucchero o elettrolita e amminoacido. Come lo zucchero, il saccarosio può essere citato come l'esempio preferito; come elettrolita, soluzione salina fisiologica e cloruro di sodio possono essere citati come esempi preferiti; e come amminoacido, l'istidina può essere citata come l'esempio preferito.

[0052] È preferibile che il liquido di dispersione di liposoma ottenuto non contenga sostanzialmente ciclodestrina o sale di ammonio nella fase esterna di liposoma e nella fase interna di liposoma, ma nella presente invenzione, eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile può essere introdotto nella fase interna di liposoma anche nel caso in cui ciclodestrina o sale di ammonio sia stato per qualche motivo aggiunto alla fase esterna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma, e anche quando la fase esterna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma contiene ciclodestrina o sale di ammonio.

[0053] Per quanto riguarda la concentrazione di lipide di liposoma nel liquido di dispersione di liposoma, da 1 a 100 mM è preferibile, e 1-50 mM è più preferibile. All'interno di questi intervalli, è possibile formare in maniera adeguata un maggior numero di particelle di liposoma senza compromettere le proprietà fisiche del liquido di dispersione di liposoma.

[0054] La composizione liposomiale può essere ottenuta miscelando il liquido di dispersione di liposoma ottenuto e il composto attivo di eribulina, eccetera, e introducendo il composto attivo nella fase interna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma. È preferibile che la fase di introduzione includa una fase in cui la permeabilità della membrana del liposoma viene intensificata nella soluzione mista di liquido di dispersione di liposoma e il composto attivo. In questo modo, l'intrappolamento dell'eribulina, eccetera nel liposoma può essere realizzato in un periodo di tempo più breve. Tuttavia, anche se non vengono condotte operazioni particolari allo scopo di intensificare la permeabilità della membrana del liposoma dopo la miscelazione del liquido di dispersione di liposoma e dell'eribulina, eccetera, è possibile intrappolare l'eribulina, eccetera nel liposoma se viene utilizzato il tempo richiesto.

[0055] Nella fase in cui l'eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile viene miscelato, è possibile utilizzare una sostanza disciolta in un solvente o una sostanza solida come l'eribulina, eccetera. Non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda il solvente e si può usare, per esempio, una sostanza identica alla fase esterna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma.

[0056] In questa alternativa, se necessario, è possibile utilizzare un gradiente di pH nell'introduzione dell'eribulina, eccetera nella fase interna di liposoma. In questo caso, per quanto riguarda il pH della fase

interna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma, da 3 a 9 è preferibile, da 4 a 9 è più preferibile, e da 5 a 8 è ancora più preferibile.

Inoltre, è possibile impostare il pH della fase esterna di liposoma più elevato del pH della fase interna di liposoma per creare un gradiente di pH. Un gradiente di pH da 1 a 5 è preferibile, e da 2 a 3 è più preferibile.

Inoltre, è possibile aumentare il rapporto di intrappolamento nel liposoma portando il pH della fase esterna di liposoma più vicino alla pKa dell'eribulina, eccetera, da 7,5 a 12,5 è preferibile, da 8,5 a 11,5 è più preferibile, e da 9 a 10,5 è ancora più preferibile (la pKa di mesilato di eribulina è 9,6).

[0057] Come la soluzione di preparazione di liposoma, è ottimale utilizzare una soluzione che viene ottenuta preparando il liposoma senza sostanziale inclusione di ciclodestrina.

[0058] Come un metodo per intensificare la permeabilità della membrana di liposoma nella soluzione mista ottenuta, si possono citare il metodo di riscaldamento della soluzione mista, il metodo di aggiunta di un fluidificante di membrana alla soluzione mista, eccetera.

Nel caso in cui la soluzione mista venga riscaldata, il composto attivo può generalmente essere introdotto in modo più efficiente nella fase interna di liposoma mediante riscaldamento a temperature più elevate. In maniera specifica, è preferibile impostare la temperatura di riscaldamento prendendo in considerazione la stabilità termica del composto attivo e dei costituenti di membrana di liposoma impiegati. In

particolare, è preferibile che la temperatura di riscaldamento sia impostata alla temperatura di transizione di fase della membrana di doppio strato lipidico del liposoma o più elevata.

[0059] La "temperatura di transizione di fase" della membrana di doppio strato lipidico del liposoma significa la temperatura alla quale inizia l'assorbimento di calore (la temperatura alla quale inizia la reazione endotermica) nell'analisi termica differenziale di condizioni di temperature elevate. L'analisi termica differenziale è una tecnica che consente l'analisi delle proprietà termiche di campioni misurando le differenze di temperatura di un campione o una sostanza di riferimento come una funzione del tempo o della temperatura mentre si cambia la temperatura del campione o della sostanza di riferimento. Nel caso in cui una analisi termica differenziale venga condotta in relazione ai costituenti di membrana di liposoma, i componenti di membrana di liposoma si fluidificano all'aumentare della temperatura, e viene osservata una reazione endotermica. Come è ampiamente noto in questo campo tecnico, l'intervallo di temperatura in cui viene osservata una reazione endotermica varia a seconda dei componenti della membrana di liposoma. Per esempio, nel caso in cui i componenti della membrana di liposoma consistano in un lipide puro, l'intervallo di temperatura in cui viene osservata una reazione endotermica è estremamente ristretto, e la reazione endotermica viene spesso osservata in un intervallo di  $\pm 1^\circ\text{C}$  rispetto alla temperatura di picco endotermico. D'altra parte, nel caso in cui i componenti della membrana

di liposoma consistano in più lipidi, e in maniera particolare nel caso in cui i componenti della membrana di liposoma consistano in lipidi derivati da materiali naturali, l'intervallo di temperatura in cui viene osservata la reazione endotermica tende ad ampliarsi, e la reazione endotermica viene osservata, per esempio, all'interno di un intervallo di  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  rispetto alla temperatura di picco endotermico (vale a dire, viene osservato un picco ampio, eccetera). Secondo la presente invenzione, viene ritenuto che la fluidificazione della membrana del liposoma venga aumentata, e la permeabilità della membrana del composto attivo venga aumentata sollevando la temperatura più elevata della temperatura di transizione di fase della membrana di doppio strato lipidico del liposoma.

[0060] Per esempio, anche se dipendente dalla stabilità termica e così via del composto attivo e dei costituenti di membrana di liposoma impiegati, è preferibile avere un intervallo di temperatura dalla temperatura di transizione di fase della membrana del doppio strato lipidico di liposoma a  $+ 20^{\circ}\text{C}$  dalla temperatura di transizione di fase; un intervallo di temperatura dalla temperatura di transizione di fase a  $+ 10^{\circ}\text{C}$  dalla temperatura di transizione di fase è più preferibile; e un intervallo di temperatura da  $+ 5^{\circ}\text{C}$  dalla temperatura di transizione di fase a  $+ 10^{\circ}\text{C}$  dalla temperatura di transizione di fase è ancora più preferibile.

La temperatura di riscaldamento è normalmente da  $20$  a  $100^{\circ}\text{C}$ ; da  $40$  a  $80^{\circ}\text{C}$  è preferibile; e da  $45$  a  $65^{\circ}\text{C}$  è più preferibile.

[0061] In maniera specifica, nel caso di una membrana di liposoma i cui ingredienti principali sono dipalmitoil fosfatidilcolina (temperatura di transizione di fase come sostanza semplice: 41°C) e colesterolo, anche se dipende anche dalla loro composizione, una temperatura di riscaldamento di da 40 a 60°C è normalmente preferibile, e da 45 a 50°C è più preferibile. Inoltre, nel caso di una membrana di liposoma i cui ingredienti principali sono fosfatidilcolina di soia idrogenata (HSPC; temperatura di transizione di fase come sostanza semplice: da 50 a 60°C) e colesterolo, anche se dipende anche dalla loro composizione, una temperatura di riscaldamento di da 50 a 70°C è normalmente preferibile, e da 55 a 65°C è più preferibile. Tuttavia, queste temperature di riscaldamento non limitano in alcun modo la presente invenzione.

[0062] Nella fase di riscaldamento, non ci sono particolari limitazioni per quanto riguarda il tempo durante il quale la temperatura viene mantenuta a o al di sopra della temperatura di transizione di fase, e questo può essere correttamente impostato all'interno di un intervallo, per esempio, di da alcuni secondi a 30 minuti. Prendendo in considerazione la stabilità termica del composto attivo e dei lipidi, così come la produzione di massa efficiente, è desiderabile condurre il trattamento all'interno di un breve periodo di tempo. Vale a dire, è preferibile che il periodo di mantenimento della temperatura elevata sia da 1 a 30 minuti, e da 2 minuti a 5 minuti è più preferibile. Tuttavia,

questi tempi di mantenimento di temperatura non limitano in alcun modo la presente invenzione.

[0063] Inoltre, come affermato sopra, è anche possibile intensificare la permeabilità della membrana di liposoma aggiungendo un fluidificante di membrana alla soluzione mista ottenuta (vale a dire, aggiungendola al lato della fase esterna del liposoma). Come un fluidificante di membrana, si possono citare solventi organici, tensioattivi, enzimi, eccetera che sono solubili in solventi acquosi. In maniera più specifica, come solventi organici, si possono citare, per esempio, alcoli monovalenti come alcool etilico ed alcool benzilico; alcoli polivalente come glicerina e propilenglicole; solventi polari aprotici come dimetilsolfossido (DMSO). Come tensioattivi, si possono citare, per esempio, tensioattivi anionici come sodio di acido grasso, solfato di monoalchile e fosfato di monoalchile; tensioattivi cationici come sale di alchil trimetilammonio; tensioattivi anfolitici come ossido di alchil dimetilammina; e tensioattivi non ionici come alchiletere di poliossietilene, etere di alchil monoglicerile, ed estere di sorbitano di acidi grassi. Come enzimi, si possono citare, per esempio, colinesterasi e colesterolo ossidasi. I tecnici nel ramo possono impostare la quantità di fluidificante di membrana in accordo con la composizione dei costituenti di membrana di liposoma, il fluidificante di membrana, eccetera, e tenendo in considerazione il grado di efficienza di intrappolamento del composto attivo dovuto all'aggiunta del fluidificante di membrana, la stabilità del liposoma, eccetera.

[0064] Il metodo di fabbricazione della composizione liposomiale della presente invenzione può includere una fase di regolazione del pH della fase esterna di liposoma della composizione liposomiale ottenuta dopo la fase di introduzione menzionata sopra.

Il pH di fase esterna che deve essere regolato non è particolarmente limitato, ma può essere preferibilmente da 4 a 10, più preferibilmente da 5 a 9, e ancor più preferibilmente neutro da 6 a 8 dal punto di vista della stabilità chimica del fosfolipide che compone il liposoma.

[0065] In aggiunta, può essere ulteriormente inclusa una fase di essiccazione della composizione liposomiale ottenuta. Vale a dire, quando si utilizza una composizione liposomiale come una formulazione liquida, la composizione liposomiale in una forma liquida ottenuta nella fase di introduzione menzionata sopra può essere utilizzata senza modificazione come la composizione liposomiale finale, oppure la fase esterna di liposoma nella composizione liposomiale liquida ottenuta nella fase di introduzione menzionata sopra può essere regolata (sostituita, eccetera) per creare una composizione liposomiale finale. Nel fare ciò, la regolazione della fase esterna di liposoma può essere effettuata in modo simile alla regolazione della fase esterna di liposoma in un liquido di preparazione di liposoma. Nel caso in cui la composizione liposomiale sia una formulazione liquida, essa può essere utilizzata senza ulteriore modificazione.

[0066] Inoltre, nel caso in cui la composizione liposomiale debba essere resa in una preparazione solida, la composizione liposomiale liquida ottenuta nella fase di introduzione menzionata sopra può essere essiccata per ottenere una composizione liposomiale solida finale. Liofilizzazione ed atomizzazione possono essere citate come esempi di metodi per l'essiccazione della composizione liposomiale. Nei casi in cui la composizione liposomiale sia una preparazione solida, essa può essere disciolta o sospesa in un solvente adeguato e utilizzata come una formulazione liquida. Il solvente da usare può essere impostato in maniera appropriata in accordo con lo scopo di uso, eccetera per la composizione liposomiale, e nel caso di utilizzo della composizione liposomiale come un prodotto da iniezione, per esempio, il solvente è acqua distillata preferibilmente sterile. Nel caso di utilizzo della composizione liposomiale come una medicina, il medico o il paziente può iniettare il solvente in una fiala in cui la preparazione solida è intrappolata, per esempio, per creare la preparazione al momento dell'uso. Nel caso in cui la composizione liposomiale liquida sia una preparazione solida congelata, essa può essere usata come una formulazione liquida mediante la conservazione in uno stato congelato, e riportata a uno stato liquido, lasciandola sciogliersi a temperatura ambiente o mediante uno scioglimento rapido con calore al momento dell'uso.

[0067] (Composizioni farmaceutiche, eccetera)

La composizione liposomiale della presente invenzione può essere utilizzata come una medicina curativa nel campo medico. In maniera specifica, la composizione liposomiale della presente invenzione può essere usata come una composizione farmaceutica anti-tumorale.

[0068] Nel caso in cui la composizione liposomiale della presente invenzione venga usata come una composizione farmaceutica, la composizione liposomiale può essere somministrata mediante iniezione (iniezione endovenosa, intra-arteriosa, o locale), per via orale, per via nasale, per via sottocutanea, per via polmonare, o tramite collirio, in particolare l'iniezione locale ad un gruppo mirato di cellule od organo o altra tale iniezione è preferibile in aggiunta ad iniezione endovenosa, iniezione sottocutanea, iniezione intracutanea, e iniezione intra-arteriosa. Compresa, polvere, granulazione, sciroppo, capsula, liquido, e simili possono essere dati come esempi della formulazione della composizione liposomiale nel caso di somministrazione orale. Prodotto di iniezione, iniezione goccia a goccia, collirio per occhio, unguento, supposte, sospensione, cataplasma, lozione, aerosol, cerotto e simili possono essere dati come esempi di formulazioni della composizione liposomiale nel caso di somministrazione non orale, ed un prodotto di iniezione e agente di infusione di fleboclisi sono particolarmente preferibili.

[0069] Il dosaggio della composizione farmaceutica differisce notevolmente a seconda del tipo di malattia bersaglio, del tipo del

composto attivo, così come dell'età, del sesso e del peso del paziente, della gravità dei sintomi, insieme ad altri fattori, ma normalmente, il dosaggio giornaliero di eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile per adulti non è particolarmente ristretto, anche se il mesilato di eribulina, che è un sale adeguato, è normalmente da 0,1 a 10 mg. Inoltre, la somministrazione può essere divisa in più di una dose al giorno. Una composizione liposomiale contenente, per esempio, eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile 0,01-300 mg/ml alla fase interna di liposoma può essere somministrata come la composizione liposomiale della presente invenzione.

[0070] (Kit)

Secondo la presente invenzione, viene fornito un kit per la preparazione della composizione liposomiale. Il kit può essere utilizzato per preparare la composizione liposomiale come una medicina, la quale può essere usata da un medico in ambito clinico o un paziente.

[0071] Il kit include un reagente di liposoma. Il reagente di liposoma può essere una forma solida o una liquida. Se il reagente di liposoma è in una forma liquida, il liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra può essere usato come il reagente di liposoma. Inoltre, se il reagente di liposoma è in una forma solida, il reagente di liposoma può essere disciolto o sospeso in un solvente appropriato per ottenere il liquido di dispersione di liposoma, e il liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra può essere essiccato per ottenere il reagente di liposoma. L'essiccazione può essere effettuata in modo

simile all'essiccazione della composizione liposomiale menzionata sopra. Quando si utilizza il kit, se il reagente di liposoma è in una forma solida, il reagente di liposoma può essere disciolto o sospeso in un solvente appropriato per creare il liquido di dispersione di liposoma. Nel fare ciò, il solvente è simile alla fase esterna di liposoma nel liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra.

[0072] Il kit della presente invenzione contiene inoltre eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile (mesilato di eribulina è un sale adeguato). L'eribulina o il suo sale farmacologicamente accettabile può essere in una forma solida o liquida (uno stato disciolto o sospeso in un solvente). Quando si utilizza il kit, se l'eribulina o simile è in una forma solida, è preferibile che essa venga sciolta o sospesa in un solvente appropriato per creare una forma liquida. Il solvente può essere impostato in maniera appropriata in accordo con le proprietà fisiche e simili dell'eribulina o simili, e può essere creato in maniera simile alla fase esterna di liposoma nel liquido di dispersione menzionato sopra, per esempio. Il kit della presente invenzione può includere un composto attivo diverso da eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile.

[0073] Nel kit, il reagente di liposoma e il composto attivo possono essere confezionati separatamente, oppure possono essere in forme solide e miscelati insieme.

[0074] Nel caso in cui il reagente di liposoma sia in una forma solida, escludendo i casi di dissoluzione o sospensione per formare un

liquido di dispersione di liposoma come sopra, il kit può essere usato effettuando una fase simile a quella di miscelazione del liquido di dispersione di liposoma e del composto attivo e di introduzione del composto attivo nella fase interna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma nel metodo di fabbricazione della composizione liposomiale menzionata sopra. È quindi possibile fabbricare una composizione liposomiale in cui un composto attivo viene introdotto nella fase interna del reagente di liposoma.

[0075] Nel caso in cui il reagente di liposoma ed il composto attivo siano entrambi in forme solide e siano confezionati insieme, la miscela del reagente di liposoma e del composto attivo è disciolta o sospesa in maniera appropriata in un solvente. Nel fare ciò, il solvente è simile alla fase esterna di liposoma nel liquido di dispersione di liposoma menzionato sopra. È quindi possibile formare uno stato in cui il liquido di dispersione di liposoma e il composto attivo vengono miscelati, dopo di che l'uso viene reso possibile effettuando altre fasi nell'introduzione del composto attivo nella fase interna di liposoma del liquido di dispersione di liposoma nel metodo di fabbricazione della composizione liposomiale menzionata sopra.

#### Forme di realizzazione

[0076] La presente invenzione è descritta in maniera specifica fornendo forme di realizzazione ed esempi comparativi, ma non è limitata alle forme di realizzazione qui di seguito.

[0077] (Forma di realizzazione 1)

<Preparazione di una soluzione acquosa per la fase interna di liposoma>

396,4 mg di solfato di ammonio e 189,1 mg di acido citrico monoidrato sono stati sciolti in acqua pura, e questo è stato diluito a 15 ml per preparare solfato di ammonio 200 mM/acido citrico acquoso 60 mM. Dopo aver regolato 2,5 ml del solfato di ammonio 200 mM/acido citrico acquoso 60 mM con ammoniaca acquosa ad un pH di 5,5, la soluzione acquosa per la fase interna di liposoma è stata diluita a 5 ml con acqua pura.

[0078] <Preparazione del liquido di preparazione di liposoma>

Dopo avere disciolto 317,9 mg di fosfatidilcolina di soia idrogenata (prodotta da Lipoid), 116,0 mg di colesterolo (prodotto da Sigma), e 130,4 mg di polietilenglicole 2000-fosfatidiletanolamina (prodotta da Genzyme, MPEG 2000-distearoil fosfatidiletanolamina) in 10 ml di cloroformio, questo è stato accuratamente erogato in tre fiale, dopo di che il cloroformio di una fiala è stato rimosso sotto pressione ridotta in un evaporatore rotante per creare una pellicola lipidica. 5 ml della soluzione acquosa per la fase interna di liposoma sono stati riscaldati ad approssimativamente 60°C e aggiunti alla pellicola di lipide ottenuta, e questa è stata agitata per preparare un liquido di preparazione di liposoma. Dopo il trattamento del liquido di preparazione di liposoma con onde ultrasoniche per 20 minuti, esso è stato granulato con un estrusore (fabbricato da Lipex Biomembranes) riscaldato ad approssimativamente 65°C per ottenere il liquido di

preparazione di liposoma. La dimensione delle particelle dei liposomi nel liquido di preparazione di liposoma ottenuto è stata misurata utilizzando un metodo di diffusione di luce dinamica, e tutte sono state da 90 a 100 nm.

[0079] <Preparazione del liquido di dispersione di liposoma>

Usando colonne di Sephadex G-50, il liquido di preparazione di liposoma ottenuto è stato eluito con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM (pH = 7,6), sostituendo la fase esterna di liposoma con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM. Dopo la sostituzione della fase esterna di liposoma, questa è stata centrifugata per 30 minuti a 400000 x g. Dopo la centrifugazione, questa è stata ri-dispersa, e la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM è stata utilizzata per preparare un volume di 5 ml, ottenendo il liquido di dispersione di liposoma.

[0080] <Preparazione della soluzione di composto attivo>

Il mesilato di eribulina è stato sciolto in soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM per ottenere mesilato di eribulina 1 mg/ml.

[0081] <Preparazione della composizione liposomiale>

0,5 ml del liquido di dispersione di liposoma e 0,5 ml della soluzione di mesilato di eribulina sono stati mescolati in un recipiente di vetro di 10 ml, e questo è stato incubato per 3 minuti in acqua a 55°C per ottenere una composizione liposomiale con mesilato di eribulina introdotto nei liposomi.

[0082] <Misurazione del rapporto di intrappolamento>

Il rapporto di intrappolamento è stato determinato come descritto di seguito.

La composizione liposomiale che intrappola un composto attivo è stata ultracentrifugata per 30 minuti a 400000 x g. La concentrazione del composto attivo nel filtrato è stata misurata con HPLC, quantificando la quantità di composto attivo non intrappolato nei liposomi. Il rapporto di intrappolamento è stato calcolato utilizzando la formula seguente.

(Formula 1)

Rapporto di intrappolamento (%) =

quantità di composto attivo in quantità totale (mg) -  
quantità di composto attivo in filtrato dopo  
ultracentrifugazione (mg)

x 100

---

quantità di composto attivo in quantità totale (mg)

[0083] Il rapporto di intrappolamento di mesilato di eribulina è stato del 90,9%.

[0084] (Forma di realizzazione 2)

<Preparazione della soluzione acquosa per la fase interna di liposoma>

In maniera simile alla Forma di realizzazione 1, 264,3 mg di solfato di ammonio e 126,1 mg di acido citrico monoidrato sono stati disciolti in acqua pura, e un pallone graduato è stato usato per diluire

questa a 10 ml per preparare solfato di ammonio 200 mM/acido citrico acquoso 60 mM. Di questo, 1 ml è stato preso e regolato ad un pH di 5,5 con ammoniaca in acqua, dopo di che questo è stato diluito con acqua pura a 2 ml per preparare la soluzione acquosa per la fase interna di liposoma.

[0085] <Preparazione del liquido di preparazione di liposoma>

80 mg ciascuno di una miscela di lipide (fosfatidilcolina di soia idrogenata:colesterolo:polietilenglicole 2000-fosfatidiletanolamina = 58,6:19,2:22,2 (in peso)) sono stati pesati, 2 ml della soluzione acquosa per la fase interna di liposoma sono stati riscaldati a circa 80°C e addizionati ad essi, e questo è stato agitato per preparare il liquido di preparazione di liposoma. Questo liquido di preparazione di liposoma è stato granulato usando un estrusore (prodotto da Lipex Biomembrane) riscaldato ad approssimativamente 80°C per ottenere il liquido di preparazione di liposoma.

[0086] <Preparazione del liquido di dispersione di liposoma>

Il liquido di preparazione di liposoma ottenuto è stato diluito a 10 ml con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM (pH = 7,6), e questo è stato centrifugato per 30 minuti a 400000 x g. Dopo la centrifugazione, tutto il filtrato è stato scartato. Il precipitato è stato ri-disperso con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM, e un pallone graduato è stato utilizzato per preparare 1 ml di liquido, ottenendo il liquido di dispersione di liposoma.

[0087] <Preparazione della soluzione di farmaco>

Mesilato di eribulina (mesilato di eribulina) è stato sciolto nella soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM ed è stata ottenuta una soluzione di mesilato di eribulina 5 mg/ml.

[0088] <Preparazione della composizione liposomiale>

0,96 ml del liquido di dispersione di liposoma e 0,24 ml della soluzione di mesilato di eribulina sono stati mescolati in un recipiente di vetro di 10 ml, e questo è stato incubato per 3 minuti in acqua a 60°C per ottenere una composizione liposomiale con mesilato di eribulina introdotto nei liposomi.

[0089] <Stabilità nel plasma di sangue di ratto>

0,2 ml del liposoma con mesilato di eribulina intrappolato preparato e 1,8 ml di plasma di sangue di ratto sono stati mescolati, e questo è stato agitato a 37°C utilizzando un incubatore di fase liquida. Immediatamente dopo la preparazione, il campionamento è stato effettuato a 6 ore, 12 ore, 24 ore, 48 ore e 72 ore dopo che l'agitazione è iniziata, e la quantità residua di mesilato di eribulina nei liposomi è stata misurata con HPLC.

I risultati della misurazione sono mostrati in Fig. 1. Come può essere visto in Fig. 1, è stato indicato che il mesilato di eribulina è stato stabilmente trattenuto nel plasma di sangue, persino nel lungo periodo di tempo di 120 ore, ed è stato possibile un rilascio graduale.

[0090] (Forma di realizzazione 3)

<Preparazione della soluzione acquosa per la fase interna di liposoma>

264,3 mg di solfato di ammonio e 126,1 mg di acido citrico monoidrato sono stati sciolti in acqua pura per ottenere approssimativamente 15 ml. Dopo aver regolato il pH a 7,0 con idrossido di sodio acquoso, questo è stato diluito con acqua pura a 20 ml per preparare la soluzione acquosa per la fase interna di liposoma (solfato di ammonio 100 mM/acido citrico 30 mM).

[0091] <Preparazione del liquido di preparazione di liposoma>

378 mg di una miscela lipidica (fosfatidilcolina di soia idrogenata:colesterolo:polietilenglicole 2000-fosfatidiletanolamina = 58,6:19,2:22,2 (in peso)) sono stati pesati, 10 ml della soluzione acquosa menzionata sopra per la fase interna di liposoma sono stati riscaldati a circa 80°C e addizionati ad essi, e questo è stato agitato per preparare il liquido di preparazione di liposoma. Questo liquido di preparazione di liposoma è stato granulato usando un estrusore (prodotto da Lipex Biomembranes) fornito con un filtro a membrana di policarbonato di 50 nm e riscaldato ad approssimativamente 80°C per ottenere il liquido di preparazione di liposoma con una dimensione delle particelle di approssimativamente 80 nm.

[0092] <Preparazione del liquido di dispersione di liposoma>

Usando colonne di Sephadex G-50, il liquido di preparazione di liposoma ottenuto è stato eluito con soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM (pH = 7,6), sostituendo la fase esterna di liposoma con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM. Dopo la sostituzione della fase esterna di liposoma, questa è

stata centrifugata per 30 minuti a 400000 x g. Dopo la centrifugazione, questa è stata ri-dispersa con soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM (pH = 7,6) e 10 ml della soluzione sono stati diluiti a 10 ml per ottenere il liquido di dispersione di liposoma.

[0093] <Preparazione della soluzione di farmaco>

Mesilato di eribulina è stato sciolto con la soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM (pH = 7,6) ed è stata ottenuta una soluzione di mesilato di eribulina 5 mg/ml.

[0094] <Preparazione della composizione liposomiale>

9,6 ml del liquido di dispersione di liposoma e 1,2 ml della soluzione di mesilato di eribulina sono stati mescolati in un recipiente di vetro di 10 ml, e idrossido di sodio è stato usato per regolare il pH a 9,5. Questo è stato incubato per 3 minuti in acqua a 60°C per ottenere una composizione liposomiale con mesilato di eribulina introdotto nei liposomi. Dopo raffreddamento, il cloruro è stato utilizzato per regolare il pH a 7,5. Analogamente alla Forma di realizzazione 1, il rapporto di intrappolamento è stato misurato e trovato essere 99%.

[0095] (Forma di realizzazione 4)

<Preparazione della soluzione acquosa per la fase interna di liposoma>

Analogamente alla Forma di realizzazione 1, è stato preparato solfato di ammonio 100 mM/acido citrico 30 mM (pH = 5,5).

[0096] <Preparazione del liquido di preparazione di liposoma>

Fosfatidilcolina di soia idrogenata, colesterolo, e polietilenglicole 2000-fosfatidiletanolamina sono stati pesati secondo le quantità mostrate nella Tabella 1 di seguito. Dopo aver disciolto ciascuno in 3 ml di cloroformio, il cloroformio è stato rimosso sotto pressione ridotta in un evaporatore rotante per creare una pellicola lipidica. 10 ml della soluzione acquosa preparata per la fase interna di liposoma sono stati riscaldati ad approssimativamente 80°C e aggiunti alla pellicola lipidica ottenuta, e questa è stata agitata per preparare un liquido di preparazione di liposoma. Questo è stato granulato usando un estrusore (fabbricato da Lipex Biomembranes) riscaldato ad approssimativamente 80°C per ottenere il liquido di preparazione di liposoma granulato. La dimensione delle particelle dei liposomi nel liquido di preparazione di liposoma ottenuto è stata misurata usando un metodo di dispersione della luce dinamica, e Rp. 1 è stata 77 nm, Rp. 2 95 nm, Rp. 3 79 nm, e Rp. 4 128 nm.

[0097] (Tabella 1)

Rp.	Fosfatidilcolina di soia idrogenata	Colesterolo	Polietilenglicole 2000-fosfatidiletanolamina
1	234 mg	76 mg	15 mg
2	234 mg	76 mg	15 mg
3	222 mg	73 mg	87 mg
4	222 mg	73 mg	87 mg

[0098] <Preparazione della composizione liposomiale>

Analogamente alla Forma di realizzazione 1, è stato ottenuto il liquido di dispersione di liposoma. Inoltre, mesilato di eribulina è stato

disciolto in soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM, ed è stato ottenuto mesilato di eribulina 5 mg/ml.

4,8 ml di ciascuno dei liquidi di dispersione di liposoma e 0,6 ml di soluzione di mesilato di eribulina sono stati mescolati in recipienti di vetro di 10 ml, che sono stati incubati per 3 minuti in acqua a 60°C per ottenere composizioni di liposoma con mesilato di eribulina introdotto nei liposomi. 24,6 ml della soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM sono stati aggiunti a ciascuna delle composizioni di liposoma, ed un filtro di polivinilidenefluoruro da 0,22 µm (PVDF) è stato utilizzato per il filtraggio e la sterilizzazione, ottenendo un campione di somministrazione (concentrazione di mesilato di eribulina: 0,1 mg/ml). Analogamente alla Forma di realizzazione 1, il rapporto di intrappolamento è stato misurato e confermato essere almeno il 90% in ciascuna delle ricette.

[0099] Topi nudi femmina (NU/NU, Charles River Laboratories Giappone, Inc.) sono stati inoculati per via sottocutanea con cellule LOX di melanoma umano, e 11 o 12 giorni più tardi, i campioni sono stati somministrati nelle vene caudali in modo da essere 10 ml/kg (1,0 mg/kg per il mesilato di eribulina). Un campione di sangue è stato preso e l'estrazione del tessuto tumorale è stata effettuata con una puntura cardiaca a periodi fissi dopo la somministrazione (15 minuti, 30 minuti, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, e 48 ore) (n = 3). Il sangue è stato campionato in una provetta di test contenente eparina, ed entro 30 minuti dal campionamento, il sangue è stato separato mediante centrifugazione a

1500 x g per 10 minuti a 4°C per ottenere il plasma di sangue. Tutto il tessuto tumorale è stato estratto, lavato con PBS, e asciugato con carta assorbente, e quindi il peso del tessuto è stato immediatamente pesato e registrato. Il tessuto è stato posto in una provetta di test e raffreddato in acqua ghiacciata, e quindi conservato a -80°C fino a quando l'analisi è stata effettuata.

[0100] Il mesilato di eribulina nel plasma di sangue e nel tessuto tumorale è stato misurato usando LC/MS/MS.

I parametri PK sono stati calcolati utilizzando un software di analisi del modello non compartimentale (WinNonlin versione 5.0.1). I risultati dei parametri PK di plasma di sangue ed i parametri PK di tessuto tumorale del mesilato di eribulina sono mostrati rispettivamente nella Tabella 2 e nella Tabella 3.

[0101] (Tabella 2)

Parametri PK di plasma del sangue di Rp. 1-4 e mesilato di eribulina in topi con cancro di LOX							
Ricetta	AUC <sub>0-1</sub> (ng-ora/ml)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng-ora/ml)	CL (ml/ora/kg)	V <sub>ss</sub> (ml/kg)	t <sub>1/2</sub> (ora)	MRT (ora)	Rapporto 1
Rp.1	253049	258274	3,87	43,99	8,7	11,4	707,1
Rp.2	176148	177893	5,62	56,40	6,8	10,0	487,0
Rp.3	228151	233067	4,29	48,93	8,4	11,4	638,1
Rp.4	221494	230541	4,34	55,88	9,4	12,9	631,2
Mesilato di eribulina	363,02	365,247	2420	8032	3,7	3,3	1,0
Rapporto 1 = $AUC_{\text{plasma liposoma}}/AUC_{\text{plasma mesilato di eribulina}}$							

[0102] (Tabella 3)

Parametri PK di plasma del sangue di Rp. 1-4 e mesilato di eribulina in topi con cancro di LOX								
Ricetta	C <sub>[max]</sub> (ng/g)	T <sub>[max]</sub> (ora)	AUC <sub>0-1</sub> (ng·ora/ ml)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng·ora/ ml)	t <sub>1/2</sub> (ora)	MRT (ora)	TPI (ml/g)	Rap port o 2
Rp. 1	692,1	4,0	24960,7	34581,8	22,8	38,8	0,13	5,5
Rp.2	1002,9	8,0	16759,6	22301,1	22,2	34,5	0,13	3,5
Rp.3	3965,7	12,0	41643,7	46297,3	16,1	23,3	0,20	7,4
Rp.4	1132,8	12,0	28377,4	45005,6	23,7	44,3	0,20	7,2
Mesilat o di eribulin a	323,425	0,25	4649,521	6294,283	17,8	27,7	17,23	1,0
Rapporto 2 = AUC <sub>tumore liposoma</sub> /AUC <sub>tumore mesilato di eribulina</sub>								

[0103] Dalla Tabella 2 e dalla Tabella 3, può essere visto che la AUC del plasma di sangue e del tessuto di tumore è aumentata rispetto al mesilato di eribulina libero in tutte e quattro le composizioni di liposoma Rp. da 1 a 4, e di conseguenza, la quantità di migrazione di tumore e la ritenzione del mesilato di eribulina sono migliorate.

[0104] (Forma di realizzazione 5)

<Preparazione della soluzione acquosa per la fase interna di liposoma>

Analogamente alla Forma di realizzazione 1, è stata preparata solfato di ammonio 100 mM/acido citrico acquoso 30 mM (pH = 5,5).

[0105] <Preparazione del liquido di preparazione di liposoma>

221,8 mg di fosfatidilcolina di soia idrogenata, 72,5 mg di colesterolo e 86,9 mg di polietilenglicole 2000-fosfatidiletanolamina sono stati pesati. Dopo averli disciolti in 3 ml di cloroformio, il

cloroformio è stato rimosso sotto pressione ridotta in un evaporatore rotante, e una pellicola lipidica è stata creata. 10 ml della soluzione acquosa creata per la fase interna di liposoma sono stati riscaldati ad approssimativamente 80°C e aggiunti alla pellicola lipidica ottenuta, e questa è stata agitata per preparare un liquido di preparazione di liposoma. Questo è stato granulato usando un estrusore (prodotto da Lipex Biomembranes) riscaldato ad approssimativamente 80°C, ed è stato ottenuto un liquido di preparazione di liposoma granulato. Quando le dimensioni delle particelle dei liposomi nel liquido di preparazione di liposoma ottenuto sono state misurate utilizzando un metodo di dispersione della luce dinamica, esse sono state di approssimativamente 90 nm.

[0106] <Preparazione del liquido di dispersione di liposoma>

Usando colonne di Sephadex G-50, il liquido di preparazione di liposoma ottenuto è stato eluito con soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM (pH = 7,6), sostituendo la fase esterna di liposoma con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM. Dopo aver sostituito la fase esterna di liposoma, questa è stata centrifugata per 30 minuti a 400000 x g. Dopo la centrifugazione, questa è stata ri-dispersa, e la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM è stata utilizzata per preparare 10 ml di liquido, creando un liquido di dispersione di liposoma.

[0107] <Preparazione della soluzione di farmaco>

Mesilato di eribulina è stato disciolto nella soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM ed è stata ottenuta una soluzione di mesilato di eribulina 1 mg/ml. Inoltre, come campioni di somministrazione di corpi liberi, la soluzione di mesilato di eribulina è stata diluita con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM, ed un filtro PVDF di 0,22 µm è stato utilizzato per il filtraggio e la sterilizzazione per ottenere campioni di somministrazione (concentrazioni di mesilato di eribulina: 0,3 mg/ml e 0,4 mg/ml).

[0108] <Preparazione della composizione liposomiale>

1,8 ml del liquido di dispersione di liposoma e 1,2 ml della soluzione di mesilato di eribulina sono stati mescolati ciascuno in un recipiente di vetro di 10 ml, che è stato incubato per 3 minuti in acqua a 60°C per ottenere una composizione liposomiale con mesilato di eribulina introdotto nei liposomi. La composizione liposomiale ottenuta è stata diluita con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM, ed un filtro PVDF di 0,22 µm è stato utilizzato per il filtraggio e la sterilizzazione per ottenere un campione di somministrazione (concentrazione di mesilato di eribulina: 0,2 mg/ml). Analogamente alla Forma di realizzazione 1, il rapporto di intrappolamento è stato misurato e confermato essere almeno il 90%.

[0109] FaDu (ottenuta dalla American Type Culture Collection), che è una linea di carcinoma a cellule squamose faringee umana, è stata coltivata e cresciuta in coltura MEM contenente siero fetale di

bovino al 10%. Le cellule sono state separate dalla fiasca con una soluzione di tripsina allo 0,05%-EDTA e raccolte. Dopo il lavaggio con PBS, le cellule sono state sospese in PBS in modo da essere  $5 \times 10^7$  cellule/ml e tenute in ghiaccio. 0,1 ml di liquido di sospensione cellulare sono stati iniettati per via sottocutanea nella porzione ventrale destra di topi nudi di 6 settimane (Charles River Laboratories Giappone, Inc.). Ogni topo è stato osservato quotidianamente, e sono state fatte osservazioni in modo appropriato nei casi in cui sono state trovate condizioni anomale. Calibri sono stati utilizzati per misurare le dimensioni del tumore nel tempo, e la dimensione del tumore è stata calcolata secondo la formula di calcolo: asse maggiore x (asse minore al quadrato) ÷ 2. Nel momento in cui la dimensione del tumore è stata da 100 a 200 mm<sup>3</sup>, i topi sono stati separati in gruppi in modo tale che i valori medi delle dimensioni del tumore ed i pesi corporei dei topi fossero uniformi tra i gruppi di test (cinque topi per gruppo di test), e il farmaco è stato somministrato nella vena caudale (0,2 ml/20 g; 3 volte ad intervalli di 7 giorni).

I cambiamenti risultanti in volume medio del tumore dopo la somministrazione di campione sono mostrati in Fig. 2.

Come mostrato in Fig. 2, l'effetto di riduzione di tumore non è stato ottenuto neanche a 4 mg/kg, che è la massima dose tollerata per i corpi liberi, dal momento che FaDu è una linea di cellule con una bassa sensibilità per il mesilato di eribulina. Nel frattempo, nel caso del composito di liposoma, un effetto di riduzione di tumore chiaro è stato

trovato anche con la somministrazione di 2 mg/kg, che è al di sotto della dose di massima tolleranza, indicando che può essere ottenuto un effetto farmacologico estremamente elevato anche per tipi di cancro contro i quali non vi è stato alcun successo con mesilato di eribulina.

[0110] (Forma di realizzazione 6)

<Preparazione della soluzione acquosa per la fase interna di liposoma>

Analogamente alla Forma di realizzazione 1, è stata preparata soluzione di solfato di ammonio 100 mM/acido citrico acquoso 30 mM (pH = 5,5).

[0111] <Preparazione della soluzione di farmaco>

Analogamente alla Forma di realizzazione 5, sono stati ottenuti campioni di somministrazione (concentrazioni di mesilato di eribulina: 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, e 0,4 mg/ml) di corpi liberi.

[0112] <Preparazione della composizione liposomiale>

Ad eccezione dell'uso della soluzione acquosa per la fase interna di liposoma preparata come descritto sopra, la composizione liposomiale (concentrazione di mesilato di eribulina: 0,3 mg/ml) è stata ottenuta in modo simile alla Forma di realizzazione 5. Analogamente alla Forma di realizzazione 1, il rapporto di intrappolamento è stato misurato e trovato essere almeno il 90%.

[0113] ACHN (ottenuta dalla American Type Culture Collection), che è una linea di cellule di cancro renale umana, è stata coltivata e cresciuta in coltura MEM contenente siero fetale di bovino al 10%. Le cellule sono state separate dalla fiasca usando una soluzione di tripsina

allo 0,05%-EDTA e raccolte. Dopo il lavaggio con PBS, le cellule sono state sospese in PBS in modo da essere  $5 \times 10^7$  cellule/ml e quindi tenute in ghiaccio. 0,1 ml di liquido di sospensione cellulare sono stati iniettati per via sottocutanea nella porzione ventrale destra di topi nudi di 6 settimane di età (Charles River Laboratories Giappone, Inc.). Ogni topo è stato osservato quotidianamente, e sono state fatte osservazioni in modo appropriato nei casi in cui sono state trovate condizioni anomale. Calibri sono stati utilizzati per misurare le dimensioni del tumore nel tempo, e la dimensione del tumore è stata calcolata sulla base della formula di calcolo: asse maggiore x (asse minore al quadrato) ÷ 2. Nel momento in cui la dimensione del tumore è stata da 150 a 200 mm<sup>3</sup>, i topi sono stati separati in gruppi in modo tale che i valori medi delle dimensioni del tumore e i pesi corporei dei topi fossero uniformi tra i gruppi di test (cinque topi per gruppo di test), e il farmaco è stato somministrato nella vena caudale (0,2 ml/20 g; 3 volte ad intervalli di 7 giorni)

I risultati del cambiamento in volume medio del tumore dopo somministrazione di campione sono mostrati in Fig. 3.

Come mostrato in Fig. 3, dal momento che ACHN è una linea cellulare che è resistente al mesilato di eribulina, nessuna differenza significativa è stata trovata tra qualsiasi dei gruppi di somministrazione di corpo libero 2 mg/kg, somministrazione di corpo libero 3 mg/kg e somministrazione di corpo libero 4 mg/kg (dose di massima tolleranza) e il gruppo non trattato 45 giorni dopo l'inizio della somministrazione del

campione. Nel frattempo, nel gruppo di somministrazione di composizione liposomiale 3 mg/kg, è stato trovato un effetto di soppressione di crescita tumorale, e un valore di volume del tumore significativamente minore è stato indicato per il gruppo non trattato e i gruppi di somministrazione di corpo libero 45 giorni dopo l'avvio della somministrazione di campione. Come così indicato, è possibile ritardare la crescita di un tumore preparando una formulazione liposomiale per un tumore per il quale non è mai stato ottenuto prima un effetto terapeutico con mesilato di eribulina.

[0114] (Forma di realizzazione 7)

<Preparazione della soluzione acquosa per la fase interna di liposoma>

Sono stati creati i 12 tipi di soluzioni acquose per la fase interna mostrati di seguito in Tabella 4.

[0115] <Preparazione del liquido di preparazione di liposoma>

120 mg di una miscela lipidica (fosfatidilcolina di soia idrogenata:colesterolo: polietilenglicole 2000- fosfatidiletanolamina = 58,6:19,2:22,2 (in peso)) sono stati pesati in provette di test, e 3 ml di ciascun campione della soluzione acquosa per la fase interna sono stati riscaldati a 80°C.

Questo liquido di preparazione di liposoma è stato granulato usando un estrusore riscaldato ad approssimativamente 80°C, ed è stato ottenuto il liquido di preparazione di liposoma.

[0116] <Preparazione della soluzione di dispersione di liposoma>

Usando colonne di Sephadex G-50, il liquido di preparazione di liposoma ottenuto è stato eluito con soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM, sostituendo la fase esterna di liposoma con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM.

Dopo la sostituzione della fase esterna di liposoma, questa è stata centrifugata per 1 ora a 400000 x g ed il filtrato è stato completamente rimosso. Il precipitato è stato risospeso con soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM (pH = 7,5) in modo da essere approssimativamente 2 ml.

La dimensione delle particelle del liquido di dispersione di liposoma ottenuta è stata misurata utilizzando un metodo di dispersione della luce dinamica, e tutte sono state di approssimativamente 80 nm.

[0117] <Preparazione della soluzione di farmaco>

Mesilato di eribulina è stato sciolto nella soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM, ed è stata ottenuta la soluzione di mesilato di eribulina 5 mg/ml.

[0118] <Preparazione della composizione liposomiale>

Il liquido di dispersione di liposoma e la soluzione di mesilato di eribulina sono stati mescolati in un recipiente di vetro da 10 ml in modo tale che il mesilato di eribulina fosse 0,2 mg/ml e la concentrazione totale di lipidi fosse 16 mmoli/ml. Questa è stata riscaldata per 5 minuti

a 60°C per ottenere una composizione liposomiale con mesilato di eribulina introdotto nei liposomi.

[0119] <Misurazione del rapporto di intrappolamento>

Il rapporto di intrappolamento è stato misurato in modo simile alla Forma di realizzazione 1, ed i risultati sono riportati nella Tabella 4. Come può essere visto dalla Tabella 4, indipendentemente da quale sale di ammonio è stato utilizzato nella fase interna, il rapporto di intrappolamento di mesilato di eribulina è nettamente migliorato. In particolare, il miglioramento del rapporto di intrappolamento è stato marcato usando solfato di ammonio, citrato di ammonio, fosfato di ammonio e tartrato di ammonio.

[0120] (Tabella 4)

No.	Composizione	pH	Pressione osmotica	Rapporto di intrappolamento (%)
1	50 mM di solfato di ammonio	7,5 (regolato con acido cloridrico o idrossido di sodio)	300 mOsm (regolata con saccarosio)	69,4
2	50 mM di solfato di sodio			7,2
3	50 mM di acetato di ammonio			36,8
4	50 mM di acetato di sodio			10,2
5	50 mM di fosfato di ammonio			45,8
6	50 mM di fosfato di sodio			14,6
7	50 mM di citrato			65,8

	di ammonio			
8	50 mM di citrato di sodio			8,7
9	50 mM di succinato di ammonio			14,7
10	50 mM di succinato di sodio			10,0
11	50 mM di tartrato di ammonio			74,7
12	50 mM di tartrato di sodio			11,6

[0121] (Forma di realizzazione 8)

<Preparazione della soluzione acquosa per la fase interna di liposoma>

Analogamente alla Forma di realizzazione 7, la soluzione acquosa della fase interna di liposoma è stata preparata da solfato di ammonio 100 mM/acido citrico acquoso 30 mM (pH = 7,5).

[0122] <Preparazione del liquido di preparazione di liposoma>

Analogamente alla Forma di realizzazione 7, è stata utilizzata la soluzione acquosa menzionata sopra per la fase interna di liposoma per preparare un liquido di preparazione di liposoma.

[0123] <Preparazione del liquido di dispersione di liposoma>

Usando colonne di Sephadex G-50, il liquido di preparazione di liposoma ottenuto è stato eluito con soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM, sostituendo la fase esterna di liposoma con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM.

Dopo la sostituzione della fase esterna di liposoma, questa è stata centrifugata per 1 ora a 400000 x g, rimuovendo completamente il filtrato. Il precipitato è stato risospeso con soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM (pH = 7,5), la fase esterna di liposoma è stata sostituita con soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM (pH = 7,5), ed è stato ottenuto un liquido di dispersione di liposoma. La dimensione delle particelle del liquido di dispersione di liposoma ottenuto è stata misurata utilizzando un metodo di dispersione della luce dinamica, ed è stata di approssimativamente 80 nm.

Il liquido di dispersione di liposoma è stato erogato in sette fiale, e solfato di ammonio (regolato ad un pH di 7,5 utilizzando idrossido di sodio acquoso) di una quantità conosciuta è stato aggiunto alla fase esterna di liposoma in modo tale che le fiale avessero le concentrazioni di Tabella 5, ed è stato ottenuto un liquido di dispersione di liposoma in cui il solfato di ammonio nella fase esterna di liposoma è stato di una concentrazione conosciuta.

[0124] <Preparazione della soluzione di farmaco>

Mesilato di eribulina è stato sciolto nella soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM ed è stata ottenuta una soluzione di mesilato di eribulina 5 mg/ml.

[0125] <Preparazione della composizione liposomiale>

Il liquido di dispersione di liposoma e la soluzione di mesilato di eribulina sono stati mescolati in un recipiente di vetro da 10 ml in modo

tale che il mesilato di eribulina fosse 0,2 mg/ml e la concentrazione totale di lipidi fosse di 16 mM. Questa è stata riscaldata per 5 minuti a 60°C per ottenere una composizione liposomiale con mesilato di eribulina introdotto nei liposomi.

[0126] <Misurazione del rapporto di intrappolamento>

Il rapporto di intrappolamento è stato misurato in modo simile alla Forma di realizzazione 1, ed i risultati sono mostrati nella Tabella 5. Questo mostra che anche se solfato di ammonio 0,4 mM è presente nella fase esterna di liposoma, il rapporto di intrappolamento cala marcatamente, e non vi è quasi nessun intrappolamento se è presente 10 mM di solfato di ammonio.

[0127] (Tabella 5)

No.	Fase acquosa interna	Concentrazione (mM) di solfato di ammonio di fase esterna	Rapporto di intrappolamento (%)
1	solfato di ammonio 100 mM acido citrico 30 mM pH = 7,5	0	90,4
2		0,016	90,8
3		0,08	91,3
4		0,4	75,9
5		2	36,8
6		10	16,1
7		50	8,6

[0128] (Forma di realizzazione 9)

<Preparazione della soluzione acquosa per la fase interna di liposoma>

In maniera simile all'Esempio 7, la soluzione acquosa per la fase interna di liposoma è stata preparata da solfato di ammonio 100 mM/acido citrico acquoso 30 mM (pH = 7,5).

[0129] <Preparazione del liquido di preparazione di liposoma>

Analogamente all'Esempio 7, la soluzione acquosa menzionata sopra per la fase interna di liposoma è stata utilizzata per preparare il liquido di preparazione di liposoma.

[0130] <Preparazione della soluzione di dispersione di liposoma>

Usando colonne di Sephadex G-50, il liquido di preparazione di liposoma ottenuto è stato eluito con soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM, sostituendo la fase esterna di liposoma con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM.

Dopo la sostituzione della fase esterna di liposoma, questa è stata centrifugata per 1 ora a 400000 x g ed il filtrato completamente rimosso. Il precipitato è stato risospeso con soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM (pH = 7,5), la fase esterna di liposoma è stata sostituita con la soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM (pH = 7,5), ed è stato ottenuto il liquido di dispersione di liposoma. La dimensione delle particelle del liquido di dispersione di liposoma ottenuto è stata misurata usando un metodo di dispersione della luce dinamica, ed è stata di approssimativamente 80 nm.

[0131] <Preparazione della soluzione di farmaco>

Mesilato di eribulina è stato sciolto nella soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM ed è stata ottenuta una soluzione di mesilato di eribulina 5 mg/ml.

[0132] <Preparazione della composizione liposomiale>

Il liquido di dispersione di liposoma e la soluzione di mesilato di eribulina sono stati mescolati in un recipiente di vetro da 10 ml in modo tale che il mesilato di eribulina fosse 0,2 mg/ml e la concentrazione totale di lipidi fosse 16 mM. Come mostrato in Tabella 6, ciascun pH della fase esterna di liposoma è stato regolato usando una soluzione acquosa di idrossido di sodio 1 M. Questa è stata riscaldata per 5 minuti a 60°C per ottenere una composizione liposomiale con mesilato di eribulina introdotto nei liposomi. Successivamente, acido cloridrico è stato utilizzato per regolare il pH della fase esterna a 7,5.

[0133] <Misurazione del rapporto di intrappolamento>

Il rapporto di intrappolamento è stato misurato in modo simile alla Forma di realizzazione 1, ed i risultati sono mostrati in Tabella 6. Insieme con l'aumento nel pH della fase esterna di liposoma, il rapporto di intrappolamento dell'eribulina è aumentato notevolmente, raggiungendo un rapporto di intrappolamento di quasi il 100%.

[0134] (Tabella 6)

No.	Fase acquosa interna	pH di fase esterna	Rapporto di intrappolamento (%)
1	solfato di ammonio 100 mM acido citrico 30 mM pH = 7,5	7,5	72,9
2		8,0	79,8
3		8,5	86,4
4		9,0	92,8

No.	Fase acquosa interna	pH di fase esterna	Rapporto di intrappolamento (%)
5		9,5	98,5
6		10,0	100,0
7		10,5	99,3

[0135] (Forma di realizzazione 10)

<Preparazione della soluzione acquosa per la fase interna di liposoma>

Analogamente all'Esempio 7, la soluzione acquosa per la fase interna di liposoma è stata preparata da solfato di ammonio 100 mM/acido citrico acquoso 30 mM (pH = 7,5).

[0136] <Preparazione del liquido di preparazione di liposoma>

Analogamente all'Esempio 7, la soluzione acquosa menzionata sopra per la fase interna di liposoma è stata utilizzata per preparare il liquido di preparazione di liposoma.

[0137] <Preparazione della soluzione di dispersione di liposoma>

Usando colonne di Sephadex G-50, il liquido di preparazione di liposoma ottenuto è stato eluito con soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM, sostituendo la fase esterna di liposoma con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM.

Il liquido di dispersione di liposoma è stato erogato in quattro fiale che sono state centrifugate per 1 ora a 400000 x g, e il filtrato è stato completamente rimosso. Il precipitato di due delle fiale è stato risospeso con soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10

mM (pH = 7,5), e la fase esterna di liposoma è stata sostituita con la soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM (pH = 7,5). Il precipitato delle due fiale rimanenti è stato risospeso con soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM (pH = 7,5), e la fase esterna di liposoma è stata sostituita con la soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM (pH = 7,5). La dimensione delle particelle dei liquidi di dispersione di liposoma ottenuti è stata misurata utilizzando un metodo di dispersione della luce dinamica, e tutte sono state approssimativamente di 80 nm.

[0138] <Preparazione della soluzione di farmaco>

Mesilato di eribulina è stato sciolto in soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM, ed è stata ottenuta una soluzione di mesilato di eribulina 5 mg/ml. Analogamente, mesilato di eribulina è stato sciolto in soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM ed è stata ottenuta una soluzione di mesilato di eribulina 5 mg/ml.

[0139] <Preparazione della composizione liposomiale>

Il liquido di dispersione di liposoma e la soluzione di mesilato di eribulina sono stati mescolati in un recipiente di vetro da 10 ml in modo tale che il mesilato di eribulina fosse 0,2 mg/ml, e la concentrazione totale di lipidi fosse di 16 mM. Il pH della fase esterna di liposoma di una delle due fiale della soluzione acquosa di saccarosio 96 mg/ml/istidina 10 mM (pH = 7,5) è stato regolato a 9,5 aggiungendo idrossido di sodio. Analogamente, il pH della fase esterna di liposoma di

una delle due fiale della soluzione acquosa di cloruro di sodio allo 0,9%/istidina 10 mM (pH = 7,5) è stato regolato a 9,5 mediante l'aggiunta di idrossido di sodio. Questi sono stati riscaldati per 5 minuti a 60°C per ottenere una composizione liposomiale con mesilato di eribulina introdotto nei liposomi.

[0140] <Misurazione del rapporto di intrappolamento>

Il rapporto di intrappolamento è stato misurato in modo simile alla Forma di realizzazione 1, e i risultati sono mostrati nella Tabella 7. Rispetto al caso in cui la fase esterna di liposoma è un saccarosio, che non è un elettrolita, il caso del cloruro di sodio, che è un elettrolita, ottiene chiaramente un rapporto di intrappolamento estremamente elevato. In aggiunta all'effetto dell'elettrolita, l'applicazione del gradiente di pH per rendere la fase esterna di liposoma un prodotto alcalino, ha conseguito un rapporto di intrappolamento del 100%.

[0141] (Tabella 7)

No.	Fase acquosa interna	Composizione di fase esterna	Rapporto di intrappolamento (%)
1		saccarosio 96 mg/ml istidina 10 mM pH = 7,5	72,9
2	solfoato di ammonio 100 mM acido citrico 30 mM pH = 7,5	cloruro di sodio allo 0,9% istidina 10 mM pH = 7,5	95,9
3		saccarosio 96 mg/ml istidina 10 mM pH = 9,5	98,5

4		cloruro di sodio allo 0,9% istidina 10 mM pH = 9,5	100,0
---	--	---	-------

#### Applicabilità industriale

[0142] La presente invenzione è in grado di fornire un metodo per la fabbricazione di un liposoma con una stabilità di ritenzione elevata del composto attivo con un rapporto di intrappolamento elevato.

La composizione liposomiale della presente invenzione viene favorevolmente utilizzata in applicazioni terapeutiche attraverso l'effetto farmacologico di eribulina o di un suo sale farmacologicamente accettabile.

## RIVENDICAZIONI

1. Composizione liposomiale contenente un liposoma, e contenente (i) un composto attivo, (ii) sale di ammonio e (iii) sale, acido, base e/o amminoacido nella fase interna di liposoma, in cui il composto attivo è eribulina o un suo sale farmacologicamente accettabile.

2. Composizione liposomiale secondo la rivendicazione 1, in cui la composizione liposomiale è in una forma solida o liquida.

3. Composizione liposomiale secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la concentrazione di detto sale di ammonio è 10 mM o più elevata.

4. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui la concentrazione di detto sale è da 1 a 300 mM.

5. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui la concentrazione di detto acido è da 1 a 300 mM.

6. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui la concentrazione di detto amminoacido è da 1 a 300 mM.

7. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui la concentrazione di detta base è da 1 a 300 mM.

8. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui la concentrazione di detto composto attivo è da 0,01 a 300 mg/ml.

9. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui detto composto attivo è mescolato di eribulina.

10. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui la fase interna di liposoma contiene inoltre solfato di ammonio, acido citrico e un composto attivo.

11. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, in cui la fase esterna di liposoma contiene zucchero, elettrolita e/o amminoacido.

12. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 11, in cui la fase esterna di liposoma contiene zucchero, elettrolita e amminoacido.

13. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, in cui la fase esterna di liposoma contiene zucchero o elettrolita e amminoacido.

14. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 13, in cui la concentrazione di detto zucchero è dal 2 al 20%.

15. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 14, in cui la concentrazione di detto amminoacido è da 1 a 300 mM.

16. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 15, in cui la fase esterna di liposoma contiene saccarosio o cloruro di sodio, e istidina.

17. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 16, in cui detta fase interna di liposoma non contiene sostanzialmente ciclodestrina.

18. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 17, in cui il liposoma contiene fosfatidilcolina idrogenata.

19. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 18, in cui il liposoma contiene colesterolo.

20. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 19, in cui il liposoma contiene condensato di metossi-polietilenglicole.

21. Composizione liposomiale secondo la rivendicazione 20, in cui detto condensato di metossi-polietilenglicole è condensato di distearoilfosfatidil etanolammino polietilenglicole.

22. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 21, in cui il liposoma contiene fosfatidilcolina idrogenata, colesterolo, e condensato di distearoilfosfatidil etanolammino polietilenglicole.

23. Composizione liposomiale secondo la rivendicazione 22, che contiene dal 10 all'80% di detta fosfatidilcolina idrogenata, dall'1 al

60% di detto colesterolo, e dallo 0 al 50% di detto condensato di distearoilfosfatidil etanolammino polietilenglicole.

24. Composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 23, in cui il liposoma contiene fosfatidilcolina di soia idrogenata, colesterolo, e polietilenglicole 2000 fosfatidiletanolamina.

25. Metodo di fabbricazione della composizione liposomiale secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 24, comprendete:

una fase in cui viene fornito un liquido di dispersione di liposoma contenente un liposoma;

una fase in cui detto liquido di dispersione di liposoma viene miscelato con detto composto attivo; e

una fase in cui detto composto attivo viene introdotto nella fase interna di liposoma di detto liquido di dispersione di liposoma,

in cui la fase in cui viene fornito detto liquido di dispersione di liposoma include: una fase in cui viene fornita una soluzione di preparazione di liposoma che contiene un liposoma e che contiene sale di ammonio nella fase interna di liposoma e nella fase esterna di liposoma; e

una fase in cui la fase esterna di liposoma di detta soluzione di preparazione di liposoma viene sostituita o diluita, e

in cui la fase in cui detta fase esterna di liposoma viene sostituita o diluita è una fase in cui il pH della fase esterna di liposoma viene reso più elevato del pH della fase interna di liposoma.

26. Metodo secondo la rivendicazione 25, in cui detto liquido di dispersione di liposoma non contiene sostanzialmente sale di ammonio nella fase esterna di liposoma.

27. Metodo secondo la rivendicazione 25 o 26, in cui il pH della fase esterna di liposoma di detto liquido di dispersione di liposoma è da 3 a 10.

28. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 25 a 27, in cui il pH della fase esterna di liposoma di detto liquido di dispersione di liposoma è da 7 a 10.

29. Metodo secondo la rivendicazione 27 o 28, in cui detto pH è il pH della fase esterna di liposoma di detto liquido di dispersione di liposoma nella fase in cui detto liquido di dispersione di liposoma e detto composto attivo vengono miscelati.

30. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 25 a 29, in cui la fase in cui detta fase esterna di liposoma viene sostituita o diluita è una fase in cui la differenza tra il pH della fase interna di liposoma ed il pH della fase esterna di liposoma è da 1 a 5.

31. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 25 a 30, in cui il pH di detta fase interna di liposoma è da 3 a 9.

32. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 25 a 31, in cui il pH di detta fase interna di liposoma è da 4 a 9.

33. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 25 a 32, in cui il pH di detta fase interna di liposoma è da 5 a 8.

34. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 25 a 33, in cui la fase esterna di liposoma è una soluzione che contiene un elettrolita nella fase in cui viene introdotto detto composto attivo.

35. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 25 a 34, in cui detto liquido di dispersione di liposoma non contiene sostanzialmente ciclodestrina.

36. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 25 a 35, che contiene inoltre una fase in cui il pH della fase esterna di liposoma viene neutralizzato.

\*\*\* \*\*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede

## LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

### TAVOLA 1/2

Figura 1

Hours after incubation = ore dopo l'incubazione

% of initial retention = % di ritenzione iniziale

Without CyD, pH 5,5= Senza CyD, pH 5,5

Figura 2

Relative tumor volume = volume di tumore relativo

No treatment (3/5 dead) = nessun trattamento (3/5 morti)

Free 3 mg/kg (4/5 dead, no cure) = libero 3 mg/kg (4/5 morti, nessuna cura)

Free 4 mg/kg (3/5 dead, no cure) = libero 4 mg/kg (3/5 morti, nessuna cura)

Lipo (without CyD) 2 mg/kg (no death, no cure) = Lipo (senza CyD) 2 mg/kg (nessuna morte, nessuna cura)

Days after administration = giorni dopo la somministrazione

### TAVOLA 2/2

Figura 3

Tumor volume (mm<sup>3</sup>) = volume di tumore (mm<sup>3</sup>)

No treatment = nessun trattamento

Free = libero

Lipo (without CyD) 3 mg/kg = Lipo (senza CyD) 3 mg/kg

Days after administration = giorni dopo la somministrazione

CyD: HP- $\beta$ -cyclodextrin = CyD: HP- $\beta$ -ciclodestrina

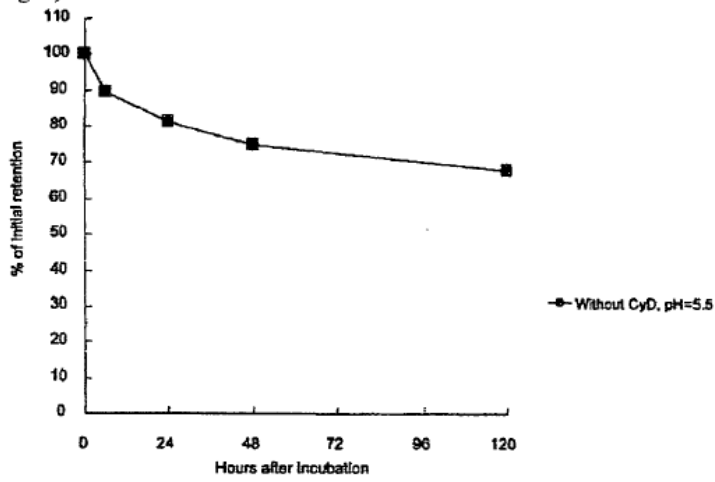
\* $P < 0.05$  compared to no treatment = \* $P < 0,05$  rispetto a nessun trattamento

† $P < 0.05$  compared to Free 3 mg/kg = † $P < 0,05$  rispetto a libero 3 mg/kg

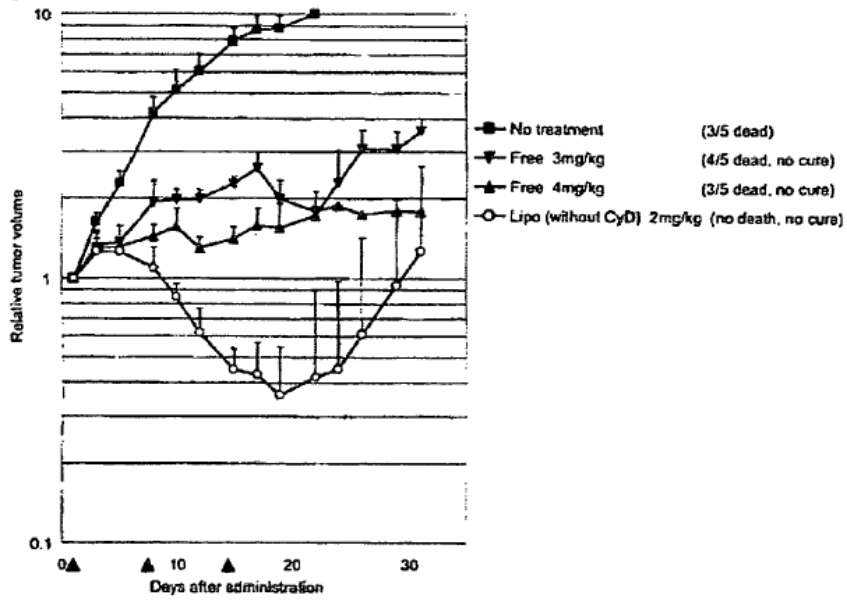
\*\*\* \*\*\* \*\*\*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

(Fig. 1)



(Fig. 2)



(Fig. 3)

