

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 337**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 31/475** (2006.01)  
**A61K 31/573** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05783719 .7**  
96 Fecha de presentación: **09.08.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1781255**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para tratar la leucemia**

30 Prioridad:  
**10.08.2004 US 651482 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.06.2012**

73 Titular/es:  
**Talon Therapeutics, Inc.**  
**2207 Bridgepointe Parkway, Suite 250**  
**San Mateo, CA 94404 , US**

72 Inventor/es:  
**THOMAS, Deborah, A.**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

ES 2 382 337 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para tratar la leucemia

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para el tratamiento de una neoplasia en un mamífero y, en particular, a formulaciones farmacológicas liposómicas para el tratamiento de la leucemia.

**Descripción de la técnica relacionada**

15 A pesar de los años de investigación en el desarrollo de nuevos procedimientos de tratamiento, con los actuales regímenes terapéuticos no se abordan bien las neoplasias malignas hematológicas. Además, la leucemia y el linfoma afectan a una proporción significativa de la población. Por ejemplo, todos los años se diagnostica a más de 60.000 personas en EE.UU., incluidos más de 55.000 casos de linfoma no Hodgkin (LNH) y estas cifras están en constante crecimiento. Además, el pronóstico de los afectados por estas enfermedades suele ser malo, ya que los índices de supervivencia en los pacientes de leucemia y linfoma siguen siendo bajos. Claramente se necesitan nuevos procedimientos para tratar estas enfermedades.

20 Aunque los tratamientos tradicionales del linfoma suelen depender del tipo de linfoma, así como los antecedentes médicos del paciente, el tratamiento de primera línea de muchos linfomas normalmente incluye quimioterapia. Dicha quimioterapia a menudo implicará la administración de un "cóctel" de compuestos, por ejemplo la formulación CHOP, que incluye ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona. Además, ciertos tratamientos de cáncer de primera línea también incluyen otras formas de terapia para el cáncer, tales como radioterapia.

25 De un modo similar, en pacientes con leucemia, tales como leucemia linfoblástica aguda (LLA), que también se denomina leucemia linfocítica aguda, el tratamiento suele incluir quimioterapia de combinación. Los regímenes de combinación usados en el tratamiento de la LLA con frecuencia incluyen los agentes L-asparaginasa, vincristina, corticosteroides y antraciclinas. Aunque se ha informado que las combinaciones que incluyen una antraciclina (p. ej., VAD, que incluye vincristina, doxorubicina (adriamicina) y dexametasona) mejoran la tasa de respuesta completa, la cardiotoxicidad sigue siendo un problema importante, particularmente en pacientes ancianos con LLA. Claramente se necesitan agentes y combinaciones más eficaces que puedan proporcionar tasas de respuesta sin producir toxicidades graves potencialmente mortales.

30 En muchos casos, los pacientes responden inicialmente a dichos tratamientos de primera línea, pero después sufren una recaída, es decir el tumor reaparece o continúa su crecimiento. Después de una de estas recaídas, a menudo se trata a los pacientes con otra quimioterapia, por ejemplo con CHOP o con otras formulaciones. En algunos casos, se trata a los pacientes con otros procedimientos, tales como trasplante de médula ósea. De nuevo, en muchos casos, los pacientes responden inicialmente a dichos tratamientos adicionales, pero después sufren otra recaída. En general, cuantas más recaídas sufre un paciente, menos acuerdo existe en la técnica sobre el siguiente tratamiento óptimo. En otros casos, un paciente no responde en absoluto a ningún tratamiento, incluso inicialmente, y, por tanto, se dice que tiene un cáncer resistente. En estos casos, tampoco existe mucho acuerdo en la técnica sobre el siguiente tratamiento óptimo.

35 Se ha demostrado que los alcaloides aislados de la planta vincapervinca (*Vinca rosea*), denominados "alcaloides de la vinca" son eficaces para tratamiento de primera línea de muchos tipos de linfomas, leucemia, y otros cánceres. Uno de estos alcaloides de la vinca, la vincristina, está incluida en los regímenes de combinación quimioterapéuticos habituales CHOP y VAD. La vincristina, que despolimeriza los microtúbulos y, de este modo, inhibe la proliferación celular, se administra en su forma libre en CHOP y VAD.

40 Se ha informado sobre vincristina encapsulada en liposomas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.741.516, o la patente de EE.UU. N° 5.714.163). En concreto, estos pacientes tratan el uso de vincristina encapsulada en fosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina o esfingomielina, además de colesterol. El uso de vincristina liposómica en el tratamiento de las neoplasias, incluidos linfomas y leucemias, también se ha descrito en general (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.723.338).

45 En general, las formulaciones de fármacos encapsulados en lípidos pueden proporcionar ventajas sobre los procedimientos tradicionales de liberación de fármacos. Por ejemplo, algunas formulaciones basadas en lípidos proporcionan semividas más prolongadas *in vivo*, están mejor dirigidas al tejido y presentan menor toxicidad. Para ciertos cánceres, incluidos leucemias y linfomas, estas propiedades pueden ser ventajosas. Se han descrito numerosos procedimientos para la formulación de vehículos de liberación de fármacos basados en lípidos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.741.516). No obstante, existe la necesidad en la técnica de formulaciones farmacológicas liposómicas y terapias de combinación que comprenden estas formulaciones farmacológicas liposómicas, para el tratamiento de muchas leucemias y linfomas, incluida la LLA.

**Breve resumen de la invención**

Ahora, se ha descubierto que el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma, vincristina, es especialmente eficaz en combinación con dexametasona para el tratamiento de la leucemia. Por tanto, en el presente documento se proporcionan composiciones y procedimientos para el tratamiento de la leucemia.

En una realización, la presente invención proporciona una composición para usar en un procedimiento para tratar una leucemia en un mamífero, en el que el procedimiento comprende administrar al mamífero una composición farmacéutica que comprende el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma, vincristina, en combinación con dexametasona.

En varias realizaciones, la leucemia es leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células peludas o síndrome mielodisplásico.

El alcaloide de la vinca es vincristina. En otras realizaciones, el liposoma comprende diestearoilfosfatidilcolina o esfingomiélna. En otra realización, el liposoma comprende además colesterol. En otra realización más relacionada, el liposoma comprende un gradiente de pH. En otra realización, el pH en el interior de los liposomas es menor que el pH en el exterior.

En una realización concreta, el mamífero es un ser humano. En una realización, el tratamiento es un tratamiento de primera línea. En otra realización, el mamífero ha experimentado previamente al menos un tratamiento de quimioterapia. En una realización específica, el tratamiento de quimioterapia anterior comprendía la administración de un alcaloide de la vinca en forma libre, tal como vincristina, vinblastina, vindesina o vinorelbina. En otras realizaciones, el tratamiento con quimioterapia incluyó una terapia de combinación que contiene antraciclina. En una de estas realizaciones, la antraciclina era doxorubicina, idarubicina o daunorubicina. En otra realización, el mamífero ha exhibido una respuesta parcial o completa a la quimioterapia antes de una recaída del cáncer. En otra realización, la recaída es una segunda recaída.

En una realización adicional, el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se administra sistémicamente por vía intravenosa. La vincristina encapsulada en liposoma se coadministra con dexametasona. En otra realización el alcaloide de la vinca encapsulada en liposoma se coadministra con un tratamiento profiláctico o terapéutico para la neurotoxicidad, tal como gabapentina (Neurotonin™).

En otra realización más, el alcaloide de la vinca encapsulada en liposoma se administra al mamífero una vez cada 7-21 días, mientras que en realizaciones relacionadas, el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se administra una vez cada 7 días o una vez cada 14 días. En otra realización, el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se administra a una dosis que entra dentro de un intervalo de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,4 mg/m<sup>2</sup> o a aproximadamente 1,4 a aproximadamente 1,8 mg/m<sup>2</sup>. En una realización relacionada, el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se administra a una dosis que entra dentro de un intervalo de 1,4 a 2,4 mg/m<sup>2</sup> o de 1,4 a 2,8 mg/m<sup>2</sup>.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una mejora sobre los procedimientos convencionales de tratar el cáncer. En concreto, la presente invención proporciona una composición para usar en un procedimiento para tratar una leucemia en un mamífero, en el que el procedimiento comprende administrar al mamífero el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma, vincristina, en combinación con dexametasona en ausencia de una antraciclina.

También están incluidos los kit que incluyen las formulaciones descritas en el presente documento y para preparar las formulaciones descritas en el presente documento, así como instrucciones para su uso.

La presente invención también proporciona el uso del alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma vincristina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una neoplasia, incluida la leucemia, en ausencia de una antraciclina. En ciertos usos, la leucemia es leucemia linfoblástica aguda (LLA). En ciertos usos, la neoplasia es una neoplasia recurrente, indolente, agresiva o transformada, por ejemplo linfoma no Hodgkin. En usos concretos, el medicamento se usa como tratamiento de primera línea para una neoplasia. En otros usos preferidos, el alcaloide de la vinca está presente en el medicamento a una dosis de, por ejemplo, aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,4 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,8 mg/m<sup>2</sup>, de 1,4 a 2,4 mg/m<sup>2</sup>, o de 1,4 a 2,8 mg/m<sup>2</sup> y se administra una vez cada 7-21 días, preferentemente cada 14 días o cada 7 días.

En otra realización más, la invención proporciona una composición para usar en un procedimiento de tratar un cáncer recurrente en un ser humano, que comprende administrar a dicho ser humano una composición farmacéutica que comprende el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma, vincristina, en combinación con un esteroide, en el que dicho cáncer recurrente es una leucemia. El alcaloide de la vinca es vincristina. En una realización, la vincristina se administra a una dosis de entre 1,4 a 2,4 mg/m<sup>2</sup> o entre 1,4 y 2,8 mg/m<sup>2</sup>. El esteroide es dexametasona. En otra realización más, dicha dexametasona se administra a una dosis de entre 25-75 mg y, en una realización, 40 mg. En

ciertas realizaciones, el liposoma comprende esfingomielina y colesterol. En realizaciones concretas, la proporción entre esfingomielina y colesterol está entre 75/25 (%mol de esfingomielina/%mol de colesterol) y 50/50 (mol de esfingomielina/%mol de colesterol) o es aproximadamente 55/45 (mol de esfingomielina/%mol de colesterol). En otra realización, dicha leucemia es leucemia linfoblástica aguda (LLA).

5 En una realización relacionada, la invención proporciona también una composición para usar en un procedimiento de tratar la leucemia linfoblástica aguda (LLA) en un ser humano, que comprende coadministrar a dicho ser humano una composición farmacéutica que comprende el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma, vincristina, en combinación con un esteroide, en ausencia de antraciclina. El alcaloide de la vinca es vincristina. En ciertas realizaciones, la vincristina se administra a una dosis de entre 1,4 a 2,4 mg/m<sup>2</sup> o entre 1,4 y 2,8 mg/m<sup>2</sup>. En otras realizaciones, la vincristina se administra a una dosis superior a 1,4 mg/m<sup>2</sup> o si limitar la dosis a 2,0 o 2,5 mg de dosis total. El esteroide es dexametasona. En otra realización más, dicha dexametasona se administra a una dosis de entre 25-75 mg y, en una realización, 40 mg. En ciertas realizaciones, el liposoma comprende esfingomielina y colesterol. En realizaciones concretas, la proporción entre esfingomielina y colesterol está entre 75/25 (%mol de esfingomielina/%mol de colesterol) y 50/50 (mol de esfingomielina/%mol de colesterol) o es 55/45 (mol de esfingomielina/%mol de colesterol).

20 La invención proporciona también una composición para usar en un procedimiento de tratar la leucemia linfoblástica aguda en un ser humano, que comprende coadministrar a dicho ser humano una composición farmacéutica que comprende vincristina encapsulada en liposoma con dexametasona. En una realización concreta, el liposoma comprende esfingomielina y colesterol en una proporción de entre 75/25 (%mol de esfingomielina/%mol de colesterol) y 50/50 (mol de esfingomielina/%mol de colesterol) o es 55/45 (mol de esfingomielina/%mol de colesterol). En otra realización, la vincristina se administra a una dosis de entre 1,4 a 2,4 mg/m<sup>2</sup> o entre 1,4 y 2,8 mg/m<sup>2</sup>. En otras realizaciones, la vincristina se administra a una dosis superior a 1,4 mg/m<sup>2</sup> o si limitar la dosis a 2,0 o 2,5 mg de dosis total. En otra realización más, dicha dexametasona se administra a una dosis de entre 25-75 mg y, en una realización, 40 mg. En realizaciones concretas, la LLA es LLA recurrente o resistente. En otras realizaciones, el tratamiento es un tratamiento de primera línea. La invención proporciona un procedimiento que no comprende además administración de una antraciclina.

### 30 Definiciones

"Neoplasia," como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier crecimiento aberrante de células, tumores, derrames malignos, verrugas, pólipos, tumores no sólidos, quistes y otras excrescencias. Una ubicación de neoplasia puede contener varios tipos de células, incluidas, entre otras, células neoplásicas, vasculares endoteliales o del sistema inmunitario, tales como macrófagos y leucocitos etc.

40 Un "cáncer" en un mamífero se refiere a cualquiera de una serie de afecciones producidas por un crecimiento anormal e incontrolado de células. Las células capaces de producir cáncer, denominadas "células cancerosas", poseen una serie de propiedades características, tales como proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, crecimiento rápido y velocidad de proliferación, y ciertas características morfológicas típicas. A menudo, las células cancerosas estarán en forma de un tumor, pero dichas células pueden también existir solas en un mamífero o puede ser una célula cancerosa no tumorigénica, tal como una célula de leucemia. Un cáncer se puede detectar en cualquiera de una serie de modos, incluidos, entre otros, detectar la presencia de un tumor o tumores (p. ej., por medios clínicos o radiológicos), analizando células dentro de un tumor o de otra muestra biológica (p. ej., de una biopsia tisular), midiendo los marcadores sanguíneos indicativos de cáncer (p. ej., CA125, PAP, PSA, CEA, AFP, HCG, CA19-9, CA15-3, CA27-29, LDH, NSE, y otros), y detectando un genotipo indicativo de un cáncer (p. ej., TP53, ATM, etc.). No obstante, un resultado negativo en uno o más de los procedimientos de detección anteriores no necesariamente indica la ausencia de cáncer, por ejemplo un paciente que ha mostrado una respuesta completa a un tratamiento de cáncer puede seguir teniendo cáncer, que se pone de manifiesto por una recaída posterior.

55 "Liberación sistémica", como se usa en el presente documento, se refiere a la liberación que da lugar a una amplia biodistribución de un compuesto dentro de un organismo. Liberación sistémica significa que la mayoría de las partes del cuerpo están expuestas a una cantidad útil, preferentemente terapéutica, de un compuesto. Para obtener una biodistribución amplia en general se requiere una vía de introducción tal que el compuesto no se degrade o elimine rápidamente (tal como mediante órganos de primer pase (hígado, pulmón etc.) o mediante unión celular rápida inespecífica) antes de alcanzar un punto de enfermedad. La liberación sistémica de alcaloides de la vinca encapsulados en liposoma se obtiene, preferentemente, por liberación intravenosa.

60 "Linfoma" se refiere a un crecimiento maligno de linfocitos B o T en el sistema linfático. "Linfoma" incluye numerosos tipos de crecimientos malignos, incluido el linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin (LNH).

65 "Linfoma no Hodgkin" se refiere a un crecimiento maligno de linfocitos B o T en el sistema linfático que no es un linfoma de Hodgkin (que se caracteriza por, por ejemplo, la presencia de células de Reed-Sternberg en el área cancerosa). Los linfomas no Hodgkin" abarcan unos 29 tipos de linfoma, las distinciones entre los cuales se basan

en el tipo de las células cancerosas. La clasificación concreta depende del sistema concreto de clasificación usado, tal como la formulación de Working, la clasificación de Rappaport y la clasificación REAL. En realizaciones preferidas, se usa la clasificación REAL.

5 “Leucemia” se refiere a un crecimiento maligno de glóbulos blancos en la médula ósea y/o la sangre. Hay tres tipos principales de leucemias: (1) Leucemia linfocítica aguda (LLA), que se caracteriza por formas inmaduras de glóbulos blancos linfoides en la médula ósea y es el cáncer más común en la infancia; (2) leucemia mielógena aguda (LMA), en la que la médula ósea contiene células inmaduras del tipo mieloide. Se han estimado 10.000 nuevos casos anuales (la leucemia promielocítica aguda, o LAP, es un subtipo de la LMA); (3) leucemia mielógena crónica (LMC), que es una forma moderadamente progresiva de leucemia que se caracteriza por la presencia de una cifra elevada de granulocitos en la sangre.

15 Un “cáncer recurrente”, leucemia o linfoma, se refiere a un cáncer o linfoma que ha recurrido tras una remisión completa o parcial previa en respuesta a un tratamiento anterior. La recurrencia se puede definir de cualquier modo, incluida una reaparición o recrecimiento de un tumor detectado mediante ensayos clínicos, radiológicos o bioquímicos, o mediante un incremento de los niveles de un marcador canceroso. Los tratamientos anteriores pueden incluir, entre otros, quimioterapia, radioterapia y trasplante de médula ósea.

20 Un linfoma no Hodgkin “indolente” es una clasificación que incluye formas de crecimiento lento de linfoma. Abarcan los que se denominan de grado bajo y algunas categorías de LNH de grado intermedio en la Formulación de Working. En ocasiones, los LNH indolentes no responden a terapias convencionales contra el cáncer, tales como quimioterapia y radioterapia.

25 Un linfoma no Hodgkin “transformado” es una clasificación que en ocasiones se usa para describir un LNH indolente que adquiere un aspecto agresivo y se convierte en más respondedor a quimioterapias estándar.

30 Los pacientes con “cáncer resistente” o “linfoma resistente” son aquéllos que no han alcanzado la remisión completa durante su primer ciclo de quimioterapia de combinación o pacientes que no han alcanzado una remisión completa o parcial con la quimioterapia posterior. Pacientes “resistentes primarios” son aquéllos que nunca han alcanzado una remisión completa, ni siquiera con el primer tratamiento.

35 Una “enfermedad estable” es un estado en el que una terapia produce el cese del crecimiento o la prevalencia de un tumor o tumores, medido por los medios clínicos, radiológicos y bioquímicos habituales, aunque no haya regresión o disminución del tamaño o la prevalencia del tumor o tumores, es decir cáncer cuya extensión o gravedad no disminuye ni aumenta.

40 “Respuesta parcial” o “remisión parcial” se refiere a la mejora de un estado canceroso, medido mediante el tamaño del tumor y/o los niveles de marcadores de cáncer, en respuesta a un tratamiento. Normalmente, una “respuesta parcial” significa que un tumor o un marcador en sangre indicativo de tumor ha disminuir de tamaño o nivel en aproximadamente un 50 % en respuesta a un tratamiento. El tratamiento puede ser cualquier tratamiento dirigido contra el cáncer, pero habitualmente incluye quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, cirugía, trasplante de células o de médula ósea, inmunoterapia y otros. El tamaño de un tumor se puede detectar por medios clínicos o radiológicos. Los marcadores indicativos de tumor se pueden detectar por medios bien conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo ELISA u otros ensayos basados en anticuerpos.

45 Una “respuesta completa” o “remisión completa” significa que un estado canceroso, medido mediante, por ejemplo, el tamaño del tumor y/o los niveles de marcadores cancerosos, ha desaparecido tras un tratamiento tal como quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, cirugía o trasplante de células o de médula ósea, o inmunoterapia. La presencia de un tumor se puede detectar por medios clínicos o radiológicos. Los marcadores indicativos de tumor se pueden detectar por medios bien conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo ELISA u otros ensayos basados en anticuerpos. Una “respuesta completa” no necesariamente indica que el cáncer se ha curado, no obstante, dado que a una respuesta completa le puede seguir una recaída.

50 “Quimioterapia” se refiere a la administración de agentes químicos que inhiben el crecimiento, la proliferación y/o la supervivencia de las células cancerosas. Dichos agentes químicos a menudo están dirigidos a procesos intracelulares necesarios para el crecimiento o la división celular y, por tanto, son particularmente eficaces contra las células cancerosas, que, en general, crecen y se dividen rápidamente. Por ejemplo, la vincristina despolimeriza los microtúbulos y, por tanto, inhibe la entrada de las células en mitosis. En general, la quimioterapia puede incluir cualquier agente químico que inhiba, o esté diseñado para inhibir, una célula cancerosa o una célula con probabilidad de convertirse en cancerosa. Dichos agentes se suelen administrar, y a menudo son más eficaces así, en combinación, por ejemplo en la formulación CHOP.

60 “Radioterapia” se refiere a la administración de radiactividad a un animal con cáncer. La radiación mata o inhibe el crecimiento de las células en división, tales como las células cancerosas.

65

“Cirugía” es la eliminación o ablación directa de células, por ejemplo células cancerosas, de un animal. Más a menudo, las células cancerosas estarán en forma de un tumor (p. ej., resultante de un linfoma), que se extrae del animal.

5 “Terapia hormonal” se refiere a la administración de compuestos que contrarrestan o inhiben las hormonas, tales como estrógenos o andrógenos, que tienen un efecto mitogénico en las células. A menudo, estas hormonas actúan incrementando las propiedades cancerosas de las células cancerosas in vivo.

10 “Inmunoterapia” se refiere a procedimientos de potenciar la capacidad del sistema inmunológico de un animal para destruir las células cancerosas dentro del animal.

15 Un agente terapéutico en “forma libre” o agente terapéutico “libre” se refiere a un agente terapéutico que no está encapsulado en liposoma. Normalmente, se supone que un fármaco está “libre” o en “forma libre” a menos que se especifique lo contrario. Un alcaloide de la vinca en forma libre puede seguir presente en combinación con otros reactivos, no obstante, dichos otros compuestos quimioterapéuticos, un vehículo farmacéutico o agentes de formación de complejos, es decir, como se usa en el presente documento el término solo excluye específicamente las formulaciones lipídicas de los alcaloides de la vinca.

### 20 Descripción detallada de la invención

25 La presente invención proporciona procedimientos de tratar las neoplasias en un paciente. La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que los alcaloides de la vinca encapsulados en liposoma son inesperadamente bien tolerados e inusualmente eficaces en combinación con dexametasona. En concreto, se realizó el sorprendente descubrimiento de que la vincristina encapsulada en liposoma se puede administrar a dosis altas según un programa semanal en combinación con dexametasona sin inducir toxicidades graves. En una realización, vincristina, encapsulada en un liposoma basado en esfingomielina y colesterol, se usa en el tratamiento de la leucemia, especialmente la leucemia linfoblástica aguda (LLA). De acuerdo con esto, la invención proporciona, entre otros, procedimientos de tratar la leucemia.

30 Los alcaloides de la vinca encapsulados en liposoma en combinación con dexametasona se pueden usar en el tratamiento de primera línea de la leucemia o para el tratamiento de pacientes que han recaído tras terapia previa de la leucemia.

35 La presente invención proporciona además dosificaciones y programas de dosificaciones de alcaloides de la vinca liposómicos en combinación con dexametasona para el tratamiento de la leucemia.

### Cánceres tratables con alcaloides de la vinca encapsulados en lípidos

40 Los procedimientos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar cualquier tipo de cáncer. Por ejemplo, estos procedimientos se aplican a los cánceres de la sangre y del sistema linfático, incluidos linfomas, leucemia y mielomas.

45 En realizaciones preferidas, los presentes procedimientos se usan para tratar cualquiera de un gran número de leucemias. Por ejemplo, la leucemia linfoblástica aguda (LLA), la leucemia promielocítica aguda, la leucemia mieloide aguda, la leucemia mieloide crónica, la leucemia linfocítica crónica, la leucemia de células peludas y el síndrome mielodisplásico se pueden tratar usando los procedimientos descritos en el presente documento. De hecho, cualquier forma linfocítica y mielógena, aguda o crónica de la enfermedad se puede tratar usando los procedimientos de la presente invención. Los procedimientos descritos en el presente documento también se aplican a cualquier forma de leucemia, incluidas las formas de adulto y de la infancia de la enfermedad. En realizaciones concretas, los procedimientos se usan para tratar la LLA en pacientes adultos o pediátricos. Otros tipos de leucemia que se pueden tratar de acuerdo con los procedimientos de la presente invención incluyen los descritos por la Asociación Americana de Leucemia en [www.leukemia.org](http://www.leukemia.org).

55 Además, los procedimientos y las composiciones descritos en el presente documento tienen aplicación en el tratamiento de los linfomas. Dichos linfomas incluyen, entre otros, linfomas de grado bajo, de grado intermedio y de grado alto, así como linfomas tanto de linfocitos B como de linfocitos T. En estas categorías se incluyen los diversos tipos de linfomas de células pequeñas, de células grandes, de células escindidas, linfocítico, folicular, difuso, de Burkitt, de células de Mantle, de células NK, del SNC, relacionado con el SIDA, linfoblástico, linfoblástico adulto, indolente, agresivo, transformado y otros tipos de linfomas. Los procedimientos de la presente invención se pueden usar para formas adultas o de la infancia del linfoma, así como linfomas en cualquier estadio, por ejemplo estadio I, II, III o IV. Los diversos tipos de linfomas son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen en, por ejemplo, la Sociedad Americana del Cáncer (véase, por ejemplo, [www3.cancer.org](http://www3.cancer.org)).

65 La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia maligna más frecuente en la infancia, que representa casi un tercio de todos los cánceres pediátricos, aunque la LLA también se produce en adultos. La LLA se puede conocer por varios nombres, incluida la leucemia linfocítica aguda y la leucemia linfoblástica aguda. La incidencia anual de la

LLA es de aproximadamente 30 casos por millón de población, con una incidencia máxima en pacientes de 2-5 años de edad. Aunque un pequeño porcentaje de casos se asocia con síndromes genéticos hereditarios, la causa de la LLA sigue desconociéndose en gran medida. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría concreta, se cree que en muchos casos de LLA, una célula progenitora linfoide se convierte en genéticamente alterada y, después, sufre alteración de la regulación de la proliferación y expansión clonal. En la mayoría de los casos, la fisiopatología de las células linfoides transformadas refleja la expresión alterada de los genes cuyos productos contribuyen al desarrollo normal de los linfocitos B y linfocitos T. En general, se piensa que la LLA aparece en la médula ósea, pero los blastos leucémicos pueden estar presentes sistémicamente en el momento de la presentación, incluido en la médula ósea, el timo, el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, los testículos y el sistema nervioso central (SNC).

La LLA se puede desarrollar a partir de linfocitos primitivos que están en varios estadios de desarrollo, lo que tiene como resultado diferentes subtipos de LLA. Los principales subtipos se identifican mediante inmunofenotipo e incluyen los tipos de linfocitos T y linfocitos B. Además, el tipo de linfocito B se puede dividir también en un tipo de linfocito B precursor. Una vez que se determinan estas características, los subtipos se pueden denominar leucemia linfoblástica T aguda o leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B precursores (o pre). Un ejemplo de un marcador útil en la clasificación de los subtipos de LLA es el antígeno común de la LL, cALLa, también denominado CD10.

A pesar de las mejoras globales en los desenlaces, el pronóstico de los pacientes cuyas células blastos leucémicas portan la fusión *BCR-ABL* (creado por t[9;22]) o reordenaciones del gen *MLL* (creadas mediante translocación que afecta a 11c238 es malo, con estimaciones de la supervivencia sin acontecimientos (SSA) de únicamente aproximadamente el 30 %. De hecho, hasta recientemente se creía que el trasplante alogénico de células madres hematopoyéticas (HSCT) durante la primera remisión era la única opción terapéutica curativa para estos dos grupos de pacientes.

Otros tipos de tumores también se pueden tratar usando los procedimientos descritos en el presente documento, incluidos, entre otros, neuroblastomas, mielomas, cánceres de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas y otros.

#### Tratamientos de primera línea

En numerosas realizaciones de la presente invención, los alcaloides de la vinca encapsulados en liposomas se usan como tratamiento de primera línea para el cáncer. En realizaciones referidas, los alcaloides de la vinca encapsulados en liposomas se usan para tratar la leucemia, en concreto la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Como se usa en el presente documento, el "tratamiento de primera línea" se refiere a un tratamiento primario para un paciente que se presenta primero con un cáncer, en contraste con un cáncer recurrente o resistente.

En dichas realizaciones, los alcaloides de la vinca encapsulados en liposoma se pueden usar solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En ciertas realizaciones, un agente terapéutico adicional es un esteroide. En una realización, es dexametasona.

#### Formas recurrentes o resistentes de las enfermedades

Los presentes procedimientos también se pueden usar para tratar formas primarias, recurrentes, transformadas o resistentes de cáncer. A menudo, los pacientes con cánceres recurrentes han recibido uno o más tratamientos, incluidos quimioterapia, radioterapia, trasplantes de médula ósea, terapia hormonal, cirugía y similares. De los pacientes que responden a dichos tratamientos, pueden exhibir enfermedad estable, una respuesta parcial (es decir, el tumor o el nivel de marcador de cáncer disminuyen en al menos un 50 %) o una respuesta completa (es decir, el tumor y los marcadores no son detectables). En cualquiera de estas situaciones, el cáncer puede reaparecer después, lo que significa una recurrencia del cáncer.

En ciertas realizaciones, los procedimientos proporcionados por el presente documento se usarán para tratar a un paciente que ha recibido un único curso de tratamiento para un cáncer, ha respondido parcial o completamente a dicho tratamiento y, después, ha sufrido una recaída. En otras realizaciones, se trata a los pacientes que han recibido más de un ciclo de tratamiento, han respondido más de una vez y han sufrido después más de una recaída. El ciclo previo de tratamiento puede incluir cualquier tratamiento anticanceroso, incluyendo quimioterapia, radioterapia, trasplante de médula ósea etc.

En ciertas realizaciones de la presente invención, se emplean alcaloides liposómicos contra cánceres "resistentes", es decir, cánceres que han exhibido previamente una respuesta completa a un tratamiento, pero después manifiestan una resistencia a un segundo o posterior ciclo de tratamiento.

#### Alcaloides de la vinca y de otros tipos

La presente invención puede incluir el uso de vincristina natural o de cualquier derivado sintético de vincristina natural. Todos los compuestos anteriores son bien conocidos para los expertos y están fácilmente disponibles a partir de fuentes comerciales, mediante síntesis o mediante purificación a partir de fuentes naturales.

El alcaloide de la vinca usado en la presente invención es vincristina. La vincristina, también conocida como sulfato de leurocristina, 22-oxovincalécoblastina, Kiocristina, vincósido, vincrex, oncovina, Vincasar PFS®, o VCR, también está disponible comercialmente en cualquiera de una serie de fuentes, por ejemplo Pharmacia & Upjohn, Lilly, IGT, etc. A menudo suministrado como sulfato de vincristina, por ejemplo como una solución de 1 mg/ml.

La presente invención incluye el uso de un único alcaloide de la vinca. Además, el alcaloide de la vinca se puede combinar con otros compuestos o moléculas, tales como otros agentes antineoplásicos. En ciertas realizaciones, dichas combinaciones de alcaloide de la vinca y/u otros compuestos se pueden realizar antes de la formulación en liposoma, de modo que se crea una combinación dentro de un único liposoma. En otras realizaciones, el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se formula y, después, se combina con las otras moléculas, que pueden ser, ellas mismas, una forma libre o estar encapsuladas en liposomas.

Cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento, incluido el alcaloide de la vinca encapsulado en liposomas, se puede someter a ensayos preclínicos en modelos bien conocidos de enfermedades humanas. Modelos *in vivo* de linfoma humano incluyen ratones portadores de la línea de linfocitos B no Hodgkin DoHH2 (Kluin-Nelemans HC, y col. (1991) *Leukemia* 5(3) 221-224), o ratones portadores de xenoinjertos de células Daudi o Raji (véase, por ejemplo, Hudson, WA y col. (1998) *Leukemia* 12(12): 2029-2033). También se pueden usar muchos otros modelos oncológicos y son conocidos para los expertos en la técnica.

### Lípidos

Se puede usar cualquiera de una serie de lípidos para preparar los liposomas de la presente invención, incluidos lípidos antipáticos, neutros, catiónicos y aniónicos. Dichos lípidos se pueden usar solos o en combinación y también pueden incluir componentes estabilizantes de la bicapa, tales como oligómeros de poliamida (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 09/218.988, presentado el 22 de diciembre de 1998), péptidos, proteínas, detergentes, derivados de lípidos, tales como PEG acoplado a fosfatidiletanolamina y PEG conjugado a ceramidas (véase, la solicitud de EE.UU. nº de serie 08/485.608). En una realización preferida, también se pueden incluir agentes de encubrimiento, que reducen la eliminación de liposomas por el sistema inmunológico del huésped, tales como conjugados de poliamida-oligómero, por ejemplo lípidos-ATTA (véase la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 08/996.783) y conjugados de PEG-lípido (véase las solicitudes de patente de EE.UU. nº 08/486.214, 08/316.407 y 08/485.608).

Se puede incluir cualquiera de una serie de lípidos neutros, en referencia a cualquiera de una serie de especies lipídicas que existen en una forma zwitteriónica sin carga o neutra a pH fisiológico, incluyendo diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomiélna, cefalina, colesterol, cerebrósidos y diacilglicerol.

En una realización, el lípido usado es esfingomiélna. En realizaciones concretas, el lípido comprende esfingomiélna y colesterol. En dichas realizaciones, la proporción entre esfingomiélna y colesterol normalmente está entre aproximadamente 75/25 (%mol de esfingomiélna/%mol de colesterol) y aproximadamente 50/50 (mol de esfingomiélna/%mol de colesterol), aproximadamente 70/30 y 55/45 (mol de esfingomiélna/%mol de colesterol) o aproximadamente 55/45 (%mol de esfingomiélna/%mol de colesterol). No obstante, dichas proporciones se pueden alterar mediante la adición de otros lípidos en las presentes formulaciones.

Los lípidos catiónicos, que portan una carga positiva neta a pH fisiológico, pueden incorporarse fácilmente en liposomas para usar en la presente invención. Dichos lípidos incluyen, entre otros, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio ("DODAC"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trietilamonio ("DOTMA"); bromuro de N,N-distearil-N,N-dimetil-amonio ("DDAB"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio ("DOTAP"); 3β-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol ("DC-Chol"), trifluoroacetato de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N-2-(esperminacarboxamido)etil)-N,N-dimetilamonio ("DOSPA"), dioctadecilamidoglicil carboxiespermina ("DOGS"), 1,2-dioleil-sn-3-fosfoetanolamina ("DOPE"); y bromuro de N-(1,2-dimiriloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio ("DMRIE"). Adicionalmente se puede usar una serie de preparaciones comerciales de lípidos catiónicos, tales como LIPOFECTIN (incluyendo DOTMA y DOPE, disponible en GIBCO/BRL), LIPOFECTAMINE (que comprende DOSPA y DOPE, disponible en GIBCO/BRL), y TRANSFECTAM (que comprende DOGS, en etanol, de Promega Corp.).

Los lípidos aniónicos para usar en la presente invención incluyen, entre otros, fosfatidilglicerol, cardiopina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-dodecanoilfosfatidiletanolamina, N-succinilfosfatidiletanolamina, N-glutarilfosfatidoletanolamina, lisilfosfatidilglicerol y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

En numerosas realizaciones se usan lípidos antipáticos. Los "lípidos antipáticos" se refieren a cualquier material adecuado, en el que la porción hidrófoba del material lipídico se orienta hacia la fase hidrófoba, mientras que la porción hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Dichos compuestos incluyen, entre otros, fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos. Fosfolípidos representativos incluyen esfingomiélna, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoilfosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina o

dilinoleoilfosfatidilcolina. También se pueden usar otros compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glicoesfingolípidos, diacilgliceroles y  $\beta$ -aciloxiácidos. Adicionalmente, dichos lípidos antipáticos se pueden mezclar fácilmente con otros lípidos, tales como triglicéridos y esteroides.

- 5 Los liposomas usados en la presente invención pueden ser multilamelares o unilamelares, que se pueden formar usando los procedimientos divulgados en el presente documento y otros procedimientos conocidos para los expertos en la técnica.

10 También son adecuados para incluir en la presente invención formulaciones de lípidos programables. Dichas formulaciones tienen poca tendencia a fusionarse con las membranas celulares y liberar su carga hasta que se produce un acontecimiento señal dado. Esto permite que la formulación lipídica se distribuya más uniformemente tras la inyección en un organismo o sitio de enfermedad antes de comenzar a fusionarse con las células. El acontecimiento señal puede ser, por ejemplo, un cambio en el pH, la temperatura, el ambiente iónico o el tiempo. En el último caso, un componente de retraso o "de encubrimiento" de la fusión, tal como un conjugado lípido-ATTA o un  
15 conjugado PEG-Lípido, puede simplemente intercambiar la membrana del liposoma con el tiempo. Para cuando la formulación se ha distribuido adecuadamente en el cuerpo, ha perdido suficiente agente de encubrimiento como para ser fusogénica. Con otros acontecimientos señal, es deseable escoger una señal que se asocie con el sitio de enfermedad o la célula diana, tal como un incremento de la temperatura en un sitio de inflamación.

## 20 Preparación de liposomas

Se dispone de diversos procedimientos para preparar liposomas, como se describe en, por ejemplo, Szoka, y col., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9:467 (1980), las patentes de EE.UU. n° 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028, 4,946,787, la publicación PCT N° WO 91/17424, Deamer y Bangham,  
25 Biochim. Biophys. Acta, 443:629-634 (1976); Fraley, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352 (1979); Hope, y col., Biochim. Biophys. Acta, 812:55-65 (1985); Mayer, y col., Biochim. Biophys. Acta, 858:161-168 (1986); Williams, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 85:242-246 (1988), el texto Liposomes, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, Capítulo 1, y Hope, y col., Chem. Phys. Lip., 40:89 (1986), todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Procedimientos adecuados incluyen, entre otros, sonicación, extrusión,  
30 homogeneización/presión alta, microfluidificación, diálisis en detergente, fusión inducida por calcio de vesículas liposómicas pequeñas y procedimientos de infusión en éter.

Un procedimiento produce vesículas multilamelares de tamaños heterogéneos. En este procedimiento, los lípidos formadores de vesículas se disuelven en un disolvente orgánico adecuado o sistema de disolventes y se secan al vacío o en un gas inerte para formar una película lipídica fina. Si se desea, la película se puede volver a disolver en un disolvente adecuado, tal como butanol terciario y, después, liofilizarse para formar una mezcla de lípidos más homogénea, que es una forma similar a polvo que se hidrata con mayor facilidad. Esta película está cubierta con una solución acuosa tamponada y se deja hidratar, habitualmente en un periodo de 15-60 minutos con agitación. La distribución por tamaño de las vesículas multilamelares resultantes se puede desplazar hacia tamaños más pequeños hidratando los lípidos en condiciones de agitación más enérgica o añadiendo detergentes de solubilización, tales como desoxicolato.

Las vesículas unilamelares se pueden preparar mediante sonicación o extrusión. En general, la sonicación se realiza con un sonificador de punta, tal como un sonificador de punta Branson, en un baño de hielo. Normalmente, la suspensión se somete a varios ciclos de sonicación. La extrusión se puede llevar a cabo mediante extrusores de biomembrana, tal como el Lipex Biomembrane Extruder. El tamaño de poro definido en los filtros de extrusión puede generar vesículas liposómicas unilamelares de tamaños específicos. Los liposomas también se pueden formar mediante extrusión a través de un filtro cerámico asimétrico, tal como un Ceraflow Microfilter, disponible comercialmente en Norton Company, Worcester MA. Las vesículas unilamelares también se pueden fabricar resolviendo fosfolípidos en etanol e inyectando los lípidos en un tampón, haciendo que los lípidos formen espontáneamente vesículas unilamelares. Asimismo, los fosfolípidos se pueden solubilizar en un detergente, por ejemplo colatos, Triton X o n-alkilglucósidos. Tras la adición del fármaco a las micelas de lípido-detergente solubilizadas, el detergente se elimina mediante cualquiera de una serie de posibles procedimientos, incluidos diálisis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, centrifugación y ultrafiltración.

Tras la preparación de liposomas, los liposomas que no se han adaptado en tamaño durante la formación, se pueden adaptar para alcanzar un intervalo de tamaños deseado y una distribución relativamente estrecha de tamaños de liposomas. Un intervalo de tamaños de aproximadamente 0,2-0,4 micrómetros permite esterilizar la suspensión de liposomas mediante filtración a través de un filtro convencional. El procedimiento de esterilización en filtro se puede llevar a cabo sobre una base de alto rendimiento si se ha reducido el tamaño de los liposomas a aproximadamente 0,2-0,4 micrómetros.

Se dispone de varias técnicas para adaptar el tamaño de los liposomas hasta un tamaño deseado. Un procedimiento de adaptación del tamaño se describe en la patente de EE.UU. N° 4,737,323. La sonicación de una suspensión de liposomas mediante sonicación en baño o en sonda produce una reducción progresiva del tamaño hasta vesículas unilamelares pequeñas de un tamaño inferior a aproximadamente 0,05 micrómetros. La homogeneización es otro

procedimiento que depende de la energía de cizalladura para fragmentar los liposomas grandes en otros más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, las vesículas multilamelares se hacen recircular a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan tamaños de liposomas seleccionados, normalmente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micrómetros. El tamaño de las vesículas liposómicas se puede

5 determinar mediante dispersión de luz cuasielétrica (QELS), como se describe en Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-450 (1981). El diámetro medio de los liposomas se puede reducir mediante sonicación de los liposomas formados. Los ciclos de sonicación intermitente se pueden alternar con evaluación QELS para guiar la síntesis eficiente de liposomas.

10 La extrusión de liposomas a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño o una membrana cerámica simétrica también es un procedimiento eficaz para reducir los tamaños de los liposomas a una distribución de tamaño relativamente bien definida. Normalmente, la suspensión se cicla a través de la membrana una o más veces hasta conseguir la distribución de tamaño del liposoma deseada. Los liposomas se pueden extruir a través de membranas de poro sucesivamente más pequeño, para conseguir una reducción gradual del tamaño del liposoma.

15 En ciertas realizaciones de la presente invención, los liposomas tienen un tamaño que varía de aproximadamente 0,05 micrómetros a aproximadamente 0,40 micrómetros. En realizaciones concretas, los liposomas están entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,2 micrómetros.

20 Los liposomas vacíos se pueden preparar usando cualquier procedimiento convencional conocido para los expertos en la técnica.

Normalmente, como se trata más adelante, los liposomas usados en la presente invención comprenderán un potencial transmembrana, de modo que los agentes antineoplásicos, tales como los alcaloides de la vinca, se cargan de un modo eficaz en el liposoma y son retenidos en el mismo. En realizaciones concretas, el potencial se efectuará

25 creando un gradiente de pH a través de la membrana. En una realización, el pH es inferior en el interior de los liposomas que en el exterior. Dichos gradientes se pueden conseguir mediante, por ejemplo, formulación de los liposomas en presencia de un tampón con un pH bajo, por ejemplo que tienen un pH entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6, y transfiriendo después los liposomas a una solución de pH mayor. En ciertas realizaciones, el pH está entre aproximadamente 3 y 5, y, en realizaciones concretas, el pH es de aproximadamente 4. Se puede

30 usar cualquiera de una serie de tampones, tales como citrato.

Posteriormente, antes o después de la adaptación del tamaño, el pH externo se puede elevar hasta, por ejemplo, aproximadamente 7 o 7,5, mediante la adición de un tampón adecuado, tal como un tampón de fosfato sódico. La elevación del pH externo crea un gradiente de pH a través de la membrana del liposoma, de modo que estimula la

35 carga y la retención eficiente del fármaco.

Los liposomas preparados de acuerdo con estos procedimientos se pueden almacenar durante periodos sustanciales de tiempo antes de cargar el fármaco y administrar a un paciente. Por ejemplo, los liposomas se pueden deshidratar, almacenar y, después, rehidratar, cargar con uno o más alcaloides de la vinca, y administrar. La

40 deshidratación se pueden conseguir usando, por ejemplo aparatos de liofilización estándar, es decir se deshidratan en condiciones de presión baja. Asimismo, los liposomas se pueden congelar en, por ejemplo, nitrógeno líquido, antes de la deshidratación. Se pueden añadir azúcares al entorno liposómico, por ejemplo al tampón que contiene los liposomas, antes de la deshidratación, estimulando de este modo la integridad del liposoma durante la deshidratación. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 5.077.056 y 5.736.155.

45 En numerosas realizaciones, los liposomas vacíos se formulan primero en tampón de pH bajo y después se manipulan en uno de varios modos de obtener liposomas del tamaño deseado. Los procedimientos para adaptar el tamaño de los liposomas incluyen sonicación, mediante baño o mediante sonda, u homogeneización. En realizaciones concretas, tras estos tratamientos, los liposomas están entre aproximadamente 0,05 y 0,45 micrómetros. En ciertas realizaciones, los liposomas están entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,2 micrómetros. Dichos liposomas de tamaño adaptado se pueden esterilizar después mediante filtración. Asimismo, la distribución del tamaño de partícula se puede monitorizar mediante discriminación del tamaño de partícula con haz

50 láser convencional o similares. Además, se conocen procedimientos de reducir los tamaños del liposoma hasta una distribución del tamaño relativamente bien definida, por ejemplo uno o más ciclos de extrusión de los liposomas a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño o una membrana cerámica asimétrica.

55

#### Preparación de alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma

60 Se puede usar cualquiera de una serie de procedimientos para cargar el alcaloide de la vinca y/u otros fármacos en los liposomas. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, varias técnicas de encapsulación y un procedimiento de carga del potencial transmembrana. En general, tras estos procedimientos, los alcaloides de la vinca están presentes en el liposoma a aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml. En ciertas realizaciones, los alcaloides de la vinca están presentes a aproximadamente 0,15 a 0,2 mg/ml.

65

En una técnica de encapsulación, el fármaco y los componentes del liposoma se disuelven en un disolvente orgánico en el que todas las especies son miscibles y se concentran hasta una película seca. Después se añade un tampón a la película seca y se forman liposomas que tienen el fármaco incorporado en las paredes de la vesícula. Como alternativa, el fármaco se puede introducir en un tampón y añadir a una película seca de únicamente componentes lipídicos. De este modo, el fármaco quedará encapsulado en el interior acuoso del liposoma. El tampón usado en la formación de los liposomas puede ser cualquier solución tampón biológicamente compatible de, por ejemplo, solución salina isotónica, solución salina tamponada con fosfato u otros tampones de fuerza iónica baja. Los liposomas resultantes que abarcan los alcaloides de la vinca se pueden adaptar en tamaño como se ha descrito anteriormente.

La carga del potencial transmembrana se ha descrito con detalle en las patentes de EE.UU. n° 4.885.172; 5.059.421; 5.171.578; y 5.837.282 (que enseña la carga de ionóforos). Brevemente, el procedimiento de carga del potencial transmembrana se puede usar con esencialmente cualquier fármaco convencional que pueda existir en estado cargado cuando se disuelve en un medio acuoso adecuado. Preferentemente, el fármaco será relativamente lipófilo de modo que se repartirá en las membranas liposómicas. Un potencial transmembrana se crea a través de las bicapas de los liposomas o complejos proteína-liposoma y el fármaco se carga en el liposoma por medio del potencial transmembrana. El potencial transmembrana se genera creando un gradiente de concentraciones para una o más especies cargadas (p. ej., Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, y/o H<sup>+</sup>) a través de las membranas, Este gradiente de concentraciones se genera produciendo liposomas que tienen diferentes medios interno y externo y tiene un gradiente de protones asociado. Después, se puede producir acumulación del fármaco del modo predicho por la ecuación de Henderson-Hasselbach.

Las descripciones de ciertos procedimientos de preparar alcaloides de la vinca encapsulados en liposoma para usar en la presente invención se tratan en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.741.516 ,5.814:335 y 5.543.152. En una realización, los alcaloides de la vinca liposómicos se preparan antes de usar a partir de un kit que incluye tres o más viales. A menos uno de los viales contiene una solución de vincristina que contiene, por ejemplo 1 mg/ml, 2 mg/ml, o 5 mg/ml de sulfato de vincristina en tampón que contiene, por ejemplo, 100 o 200 mg/ml de manitol (obtenibles de, por ejemplo, SP Pharmaceuticals LLC, Albuquerque, NM); también se pueden usar otros excipientes que son farmacéuticamente aceptables y en los que la vincristina permanece estable durante periodos extensos) y acetato sódico de pH ajustado a 3,5 a 5,5, o pH 4,5 a pH 4,7. Uno de los viales contiene una solución que contiene liposomas que comprenden esfingomiélin y colesterol (cada uno de los cuales está disponible comercialmente en, por ejemplo, NEN Life Sciences, Avanti Polar Lipids, etc.) y suspendida en tampón citrato 300 mM a, por ejemplo, un pH de 4,0. Otro vial o viales contiene un tampón fosfato alcalino (p. ej., pH 9,0), tal como fosfato sódico dibásico, 14,2 mg/ml (20 ml/vial).

En realizaciones preferidas se usa un kit que contiene dos viales que contienen componentes que se pueden usar para formular la vincristina encapsulada en liposoma reivindicada o un kit que contiene un vial que contiene una preparación estable de liposomas que comprende vincristina precargada. Dichas preparaciones estables se pueden conseguir en cualquiera de una serie de modos, incluidos, entre otros (1) una preparación hidratada almacenada a temperaturas ambiente i refrigerada y que contiene una o más modificaciones o componentes para potenciar la estabilidad química, por ejemplo antioxidantes; (2) una preparación hidratada que se congeló y que incluye un excipiente adecuado para proteger de daños inducidos por congelación/descongelación; o (3) una preparación liofilizada. Normalmente, cualquiera de los kit descritos anteriormente también contienen instrucciones de uso y pueden comprender además materiales desechables de limpieza.

Para preparar los liposomas, el sulfato de vincristina y las soluciones de liposomas se añaden cada una a un vial estéril y se mezclan a una proporción de concentración adecuada, por ejemplo de 0,01/1,0 a 0,2/1,0 (peso del alcaloide de la vinca/peso del lípido). La mezcla se mezcla, por ejemplo, mediante inversión del vial múltiples veces. Tras la formación de los liposomas en tampón a pH bajo, y antes o después de la adaptación del tamaño de los liposomas, los liposomas se introducen en tampón de un pH mayor, por ejemplo un tampón de fosfato sódico, de modo que se crea un gradiente de pH a través de la superficie del liposoma. En ciertas realizaciones, el ambiente externo de los liposomas está entre aproximadamente pH 7,0 y un pH de aproximadamente 7,5. Los liposomas y los alcaloides de la vinca se pueden mezclar durante una cantidad de tiempo suficiente para conseguir la proporción alcaloide/lípido deseada. La mezcla se puede mezclar mediante, por ejemplo, múltiples inversiones, y se puede calentar hasta temperaturas entre aproximadamente 55 °C y aproximadamente 80 °C o entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 65 °C, durante aproximadamente 5, 10 o más minutos. Dicho tratamiento hace que más de aproximadamente el 90 % de la vincristina quede atrapada dentro del liposoma.

En otras realizaciones, estas etapas se siguen a una escala mayor y la vincristina liposómica cargada se suministra a, por ejemplo, una farmacia hospitalaria en formato de lista para administrar. Dichas formulaciones a mayor escala se pueden preparar a partir de diferentes materiales de partida con respecto a los descritos para el kit; en concreto, los tampones pueden ser diferentes.

#### Liposomas dirigidos

En ciertas realizaciones es deseable dirigir los liposomas de la presente invención usando restos diana que son específicos de un tipo de célula o tejido. La direccionalidad de los liposomas usando diversos restos diana, tales como ligandos, receptores de superficie celular, glicoproteínas, vitaminas (p. ej., riboflavina) y anticuerpos monoclonales, se ha descrito anteriormente (véase, p. ej., las patentes de EE.UU. N° 4.957.773 y 4.603.044. Los restos diana pueden comprender la proteína entera o fragmentos de la misma.

En general, los mecanismos de direccionalidad requieren que los agentes dirigidos se coloquen sobre la superficie del liposoma de un modo tal que el resto diana esté disponible para interactuar con la diana, por ejemplo un receptor de superficie celular. El liposoma está diseñado para incorporar una porción conectora en la membrana en el momento de la formación del liposoma. La porción conectora debe tener una porción lipófila que está firmemente incluida y anclada en la membrana. También debe tener una porción hidrófila que está químicamente disponible sobre la superficie acuosa del liposoma. La porción hidrófila se selecciona de un modo tal que sea químicamente adecuada con el agente dirigido, de modo que la porción y el agente formen un enlace químico estable. Por tanto, la porción conectora se suele extender hacia fuera de la superficie liposómica y está configurada para colocar correctamente el agente dirigido. En algunos casos es posible unir el agente dirigido directamente a la porción conectora, pero, en muchos casos, es más adecuado usar una tercera molécula para que actúe como "puente molecular". El puente une la porción conectora y el agente dirigido de la superficie del liposoma, haciendo que el agente dirigido quede libremente disponible para la interacción con la diana celular.

Se pueden usar procedimientos estándar para acoplar los agentes dirigidos. Por ejemplo, se puede usar fosfatidiletanolamina, que se puede activar para la unión de agentes dirigidos, o derivar compuestos lipófilos, tales como bleomicina derivada de lípidos. Los liposomas dirigidos a anticuerpos se pueden construir usando, por ejemplo, liposomas que incorporan la proteína A (véase Renneisen, y col., J. Bio. Chem., 265:16337-16342 (1990) y Leonetti, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 87: 2448-2451 (1990)). Otros ejemplos de conjugación de anticuerpos se divulgan en la solicitud de patente de EE.UU. número 08/316,394. Ejemplos de restos diana también pueden incluir otras proteínas, específicas de componentes celulares, incluidos antígenos asociados con neoplasias o tumores. Las proteínas usadas como restos diana pueden estar unidas a los liposomas a través de enlaces covalentes (véase, Heath, Covalent Attachment of Proteins to Liposomes, 149 Methods in Enzymology 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Otros procedimientos de direccionalidad incluyen el sistema biotina-avidina.

#### Administración de alcaloides de la vinca encapsulados en lípidos

El alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se puede administrar en cualquiera de una serie de modos, incluidos parenteral, intravenoso, sistémico, local, intratumoral, intramuscular, subcutáneo, intraperitoneal, inhalación o cualquier procedimiento de liberación similar. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa mediante inyección. En una realización, un paciente recibe una infusión intravenosa del alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma (p. ej., un solo agente) a través de una vía intravenosa durante, por ejemplo, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos o más. En una realización se usa una infusión de 60 minutos. Dichas infusiones se pueden administrar periódicamente, por ejemplo una vez cada 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 o 28 días o más. En ciertas realizaciones, las infusiones se administran cada 7-21 días y, en realizaciones concretas, una vez cada 7 días o una vez cada 14 días. Como se usa en el presente documento, cada administración de un alcaloide de la vinca liposómico se considera un "ciclo" de tratamiento.

Formulación adecuada para usar en la presente invención se puede encontrar en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th Ed. (1985). A menudo, las composiciones intravenosas comprenderán una solución de los liposomas suspendidos en un vehículo aceptable, tal como un vehículo acuoso. Se puede usar cualquiera de una serie de vehículos acuosos, por ejemplo agua, agua tamponada, solución salina al 0,4 %, solución salina isotónica al 0,9 %, glicina al 0,3 %, dextrosa al 5 % y similares, y puede incluir glicoproteínas para estabilidad potenciada, tal como albúmina, lipoproteínas, globulina etc. A menudo se usará solución salina tamponada normal (NaCl 135-150 mM). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiere para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste de pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina etc. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, tales como filtración, o se pueden producir en condiciones estériles. La concentración de los liposomas en el vehículo puede variar. En general, la concentración será de aproximadamente 20-200 mg/ml; no obstante, los expertos pueden variar la concentración para optimizar el tratamiento con diferentes componentes del liposoma o para pacientes concretos. Por ejemplo, se puede aumentar la concentración para disminuir la carga de fluido asociada con el tratamiento.

La cantidad de alcaloide de la vinca administrado por dosis se selecciona de modo que esté por encima de la dosis terapéutica mínima pero por debajo de una dosis tóxica. La elección de la cantidad por dosis dependerá de una serie de factores, tales como los antecedentes médicos del paciente, el uso de otras terapias y la naturaleza de la enfermedad. En ciertas realizaciones, se administrará una dosis inicialmente baja, que se puede aumentar en base a la respuesta y/o tolerancia del paciente a la dosis inicial. En realizaciones concretas, el alcaloide de la vinca se administra a una dosis de al menos 0,5, al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al

menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2,0, al menos 2,5 o al menos 3,0 mg/m<sup>2</sup> (es decir, el alcaloide de la vinca vincristina por m<sup>2</sup> de área de superficie corporal). En realizaciones relacionadas, el alcaloide de la vinca vincristina se administra a una dosis de entre 1,4 a 2,4 mg/m<sup>2</sup> o entre 1,4 y 2,8 mg/m<sup>2</sup>. En realizaciones concretas, una dosis es de 1,4 a 2,4 mg/m<sup>2</sup> o de 1,4 a 2,8 mg/m<sup>2</sup>. Por ejemplo, en ciertas realizaciones se administran 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,4, 2,8 mg/m<sup>2</sup> (mg del alcaloide de la vinca vincristina por m<sup>2</sup> de área de superficie corporal) o concentraciones mayores. En una realización concreta, se administra a los pacientes una dosis de 2,4 mg/m<sup>2</sup>, correspondiente a una dosis de lípidos de aproximadamente 48 mg/m<sup>2</sup> o de aproximadamente 1,3 mg/kg de lípidos o 0,06 mg/kg de vincristina para un paciente medio de 70 kg, o de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 6 mg de vincristina por dosis. En otra realización concreta, se administra a los pacientes una dosis de 2,0 mg/m<sup>2</sup>, correspondiente a una dosis de lípidos de aproximadamente 40 mg/m<sup>2</sup> o de aproximadamente 1,1 mg/kg de lípidos o 0,05 mg/kg de vincristina para un paciente medio de 70 kg, o de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 6 mg de vincristina por dosis,

Normalmente, los pacientes recibirán al menos dos ciclos de dicho tratamiento y posiblemente más, en función de la respuesta del paciente al tratamiento. En los regímenes de un único agente, los ciclos totales de tratamiento son determinados por el paciente y el médico en base a respuestas y toxicidad observadas. De forma similar, el número de ciclos de tratamiento usando vincristina encapsulada en liposoma en combinación con dexametasona será determinado por el paciente y el médico.

Dado que las dosis de vincristina están limitadas por neurotoxicidad en seres humanos, en ocasiones es útil coadministrar vincristina liposómica con un tratamiento para la neurotoxicidad. Este tratamiento puede ser profiláctico o terapéutico. Un ejemplo es la administración de gabapentina Neurontin™ (Parke-Davis), o neurotonina, para el tratamiento del dolor neuropático, por ejemplo se administran 100-200 mg de Neurontin™ 3 veces al día a un paciente adulto. Si el dolor neuropático mejora, los tratamientos con vincristina liposómica pueden continuar. Dado que este tipo de tratamiento profiláctico o terapéutico sólo es para tratar efectos secundarios de la vincristina liposómica, se considera por separado de las terapias de combinación indicadas más adelante. Los procedimientos y dosificaciones de la presente invención se asocian con mejor toxicidad, por ejemplo cardiotoxicidad, en comparación con el uso de vincristina.

Esta invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que, en contraste con la forma libre de los alcaloides de la vinca, se puede usar un alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma sin un límite en la dosificación total. Por ejemplo, mientras que la forma libre de vincristina suele administrarse con un límite de 2,0 o 2,5 mg, la vincristina encapsulada en liposoma se puede administrar a dosificaciones constantes de, por ejemplo, 2,0 mg/m<sup>2</sup> o 2,4 mg/m<sup>2</sup> sin un límite de 2,0 o 2,5 mg de la dosis total. De acuerdo con esto, en realizaciones concretas, el alcaloide de la vinca liposómico vincristina se administra a una dosificación constante si un límite de la dosis. En realizaciones concretas, la dosificación constante es de al menos 0,5, al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2,0, al menos 2,5, o al menos 3,0 mg/m<sup>2</sup>. Por tanto, en realizaciones concretas, para un paciente típico de 1,5 a 3,0 m<sup>2</sup> de área de superficie, se administran dosis de aproximadamente 3,6 a aproximadamente 7,2 mg de vincristina o de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 6,0 mg de vincristina.

#### Terapias de combinación

Dado que, en general, diferentes clases de agentes quimioterapéuticos tienen mecanismos de acción diferentes, a menudo se usan combinaciones de agentes quimioterapéuticos en un esfuerzo por atacar las células tumorales a través de múltiples mecanismos y, de este modo, detener con más eficacia el crecimiento del tumor y matar las células tumorales. La terapia de combinación usando múltiples clases de agentes quimioterapéuticos también se usa para evitar la resistencia cruzada a los fármacos. Por ejemplo, se han usado taxanos en combinación con otros diversos fármacos antitumorales, incluidos, por ejemplo, el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, flavopiridol, el fármaco a base de platino, carboplatino, el inhibidor peptidomimético de la farnesil transferasa, ER-51785, el inhibidor de la tirosina quinasa selectiva de EGFR, IRESSA (ZD1839), ciclosporina, y trastuzumab. Schwartz, G.K., y col. J. Clin. Oncol. 20(8):2157-70 (2002), Ogawara, M., y col., Jpn J. Clin. Oncol. 32(2):48-53 (2002), Nakamura, K., y col., Oncol. Res. 12(11-12):477-84 (2001), Ciardiello, F. y col., Int. J. Cancer 98(3):463-9 (2002), Chiou, W.L., y col., J. Clin. Oncol. 20(7):1951-2 (2002), y Esteva, F.J., y col., J. Clin. Oncol. 20(7):1800-8 (2002).

La terapia de combinación de fármacos con frecuencia está limitada por los efectos secundarios tóxicos asociados con la combinación de fármacos. Estos efectos secundarios indeseables se pueden asociar con el fármaco o con su vehículo de liberación. Por ejemplo, el uso de paclitaxel combinado con otros agentes quimioterapéuticos está limitado por la toxicidad letal aguda del vehículo Cremophor y la neutropenia asociada con paclitaxel. Dichos efectos secundarios plantean problemas concretos para la terapia de combinación cuando los fármacos producen efectos secundarios similares o contienen el mismo vehículo tóxico. En estas circunstancias, con frecuencia no es posible administrar cada fármaco a la dosis encontrada que es la más eficaz cuando se usa solo. De acuerdo con esto, se pueden usar dosis subóptimas, con la eficacia de cada fármaco comprometida.

65

El alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se administra en combinación con uno o más compuestos o terapias adicionales. Por ejemplo, el alcaloide de la vinca se puede administrar junto con otro compuesto terapéutico, tal como ciclofosfamida, prednisona, otros alcaloides tales como los taxanos, camptotecinas y/o podofilinas y/u otros agentes quimioterapéuticos, tales como fármacos antisentido o vacunas antitumorales. La vincristina encapsulada en liposoma se coadministra con dexametasona. En ciertas realizaciones, múltiples compuestos se cargan en los mismos liposomas. En otras realizaciones, el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se forma de forma individual y después se combina con otros compuestos para una única coadministración. Como alternativa, ciertas terapias se administran secuencialmente en un orden predeterminado, tal como en CHOP o lipo-CHOP.

La vincristina encapsulada en liposoma se administra en combinación con otro agente terapéutico, tal como dexametasona, sin administración adicional de una antraciclina.

El alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma también se puede combinar con agentes antitumorales, tales como anticuerpos monoclonales, incluidos, entre otros, Oncolym™ (Techniclone Corp. Tustin, CA) o Rituxan™ (IDEC Pharmaceuticals), Bexxar™ (Coulter Pharmaceuticals, Palo Alto, CA), o IDEC-Y2B8 (IDEC Pharmaceuticals Corporation). Además, el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se puede administrar junto con uno o más tratamientos no moleculares, tales como radioterapia, trasplante de médula ósea, terapia hormonal, cirugía, etc.

En una realización, el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se administra en combinación con un compuesto o tratamiento anticanceroso que proporciona una mejora mayor o sinérgica en la reducción del tumor en base a un mecanismo de acción y perfiles de toxicidad no solapantes. En realizaciones concretas, el alcaloide de la vinca liposómico se puede liberar con un taxano, que opcionalmente también puede ser un taxano liposómico. Aunque se piensa que los alcaloides de la vinca despolimerizan los microtúbulos y los taxanos estabilizan los microtúbulos, se ha descubierto que los dos compuestos actúan de forma sinérgica en la alteración del crecimiento tumoral, posiblemente porque ambos están implicados en la inhibición de la dinámica de los microtúbulos. Véase, Dumontet, C. y Sikic, B.I., (1999) J. Clin Onc. 17(3) 1061-1070. Por tanto, las formulaciones liposómicas del alcaloide de la vinca de acuerdo con la presente invención disminuyen significativamente la toxicidad mieloide y neurológica asociada con la administración secuencial de los alcaloides de la vinca en forma libre y los taxanos.

Los alcaloides de la vinca encapsulados en liposoma se pueden liberar con uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales. En ciertas realizaciones, el fármaco encapsulado en liposoma y el otro tratamiento o fármaco usado en combinación tienen mecanismos de acción diferentes y pueden actuar de forma aditiva, cooperativa o sinérgica, para combatir una enfermedad. En otras realizaciones, el fármaco encapsulado en liposoma y el otro tratamiento o fármaco usado en combinación tienen los mismos mecanismos de acción o similares y también pueden actuar de forma aditiva, cooperativa o sinérgica, para combatir una enfermedad. Por ejemplo, los fármacos que son activos durante la fase S del ciclo celular se pueden usar en combinación con fármacos que son activos durante la fase M.

Los fármacos quimioterapéuticos se pueden clasificar en un gran número de grupos en base a su mecanismo de acción, incluidos, por ejemplo, platinatos, agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales, agentes antimicrotúbulos, antibióticos, esteroides, agentes hormonales, interleucinas, inhibidores de la mitosis, inhibidores de la angiogénesis, promotores de la apoptosis y modificadores de la respuesta biológica. Normalmente, cada una de estas clases de fármacos actúa inhibiendo el crecimiento o la proliferación celular a través de un mecanismo molecular diferente. Por ejemplo, los moduladores selectivos del receptor de estrógenos se unen a los receptores de estrógenos de las células de cáncer de mama dependientes de estrógenos y previenen la unión de los estrógenos, de modo que privan de comida a estas células cancerosas de un modo eficaz. En modos de acción completamente diferentes, los análogos nucleosídicos, tales como azacitidina y fluorouracilo, inhiben la síntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo. En realizaciones concretas, el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se libera en combinación con otro fármaco de la misma clase, mientras que en otras realizaciones, el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se administra con fármacos de una clase diferente. Dado que, en general, diferentes clases de agentes quimioterapéuticos tienen mecanismos de acción diferentes, a menudo se usan combinaciones de agentes quimioterapéuticos en un esfuerzo por atacar las células tumorales a través de múltiples mecanismos y, de este modo, detener con más eficacia el crecimiento del tumor y matar las células tumorales. La terapia de combinación usando múltiples clases de agentes quimioterapéuticos también se usa para evitar la resistencia cruzada a los fármacos.

En realizaciones concretas, el alcaloide de la vinca encapsulado en liposoma se administra en combinación con otra terapia usada para el tratamiento de la LLA. Se usan diversas terapias para el tratamiento de la LLA, incluida quimioterapia, radioterapia y trasplantes de células madre.

Cuando se usan para el tratamiento de la LLA, los agentes quimioterapéuticos se liberan, en general, mediante uno o más de varios medios diferentes. Los agentes quimioterapéuticos se pueden liberar sistemáticamente, bien por boca o mediante inyección en una vena o músculo. Un agente quimioterapéutico también se puede liberar por vía intratecal, directamente en la médula espinal (intratecal), una cavidad o un órgano, de modo que el fármaco afecta principalmente a las células cancerosas en dichas áreas. La quimioterapia intratecal con frecuencia se usa para tratar la LLA que se ha extendido, o que se puede extender, al cerebro y a la médula espinal. Cuando se usa para

prevenir la diseminación del cáncer al cerebro y la médula espinal, se denomina terapia santuario del sistema nervioso central (SNC) o profilaxis del SNC. La quimioterapia intratecal a menudo se administra además de quimioterapia por boca o vena.

5 Ejemplos de agentes quimioterapéuticos específicos que se pueden administrar en combinación con el alcaloide d el avinca encapsulado en liposoma vincristina de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otros, dexametasona, fludarabina, ciclofosfamida, imatinib, valsopodar, asparaginasa, citarabina, dexrazoxano, hidrocortisona, leucovorina cálcica, mercaptopurina, metotrexato, metilprednisolona, prednisolona y prednisona.

10 La vincristina liposómica se administra en combinación con dexametasona.

Otras terapias de combinación conocidas para los expertos en la técnica se pueden usar junto con los procedimientos de la presente invención.

## 15 Ejemplos

Los ejemplos siguientes se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención reivindicada.

### 20 Ejemplo 1

#### FABRICACIÓN DE VINCRISTINA ENCAPSULADA EN LIPOSOMA

La vincristina encapsulada en liposoma (inyección de sulfato de vincristina en liposoma) se preparó usando un kit de 5 viales. Los viales 1 y 2 contenían una solución de sulfato de vincristina (1 mg/ml de Vincasar PFS®, SP  
25 Pharmaceuticals LLC, Albuquerque, NM) en tampón que comprende manitol y acetato sódico, pH 4,5-4,7; el vial 3 contenía liposomas vacíos (100 mg/ml esfingomiolina/colesteriliposomas, a una proporción de entre aproximadamente 60/40 a 50/50, o, más preferentemente, 58/42 mol%/mol%) en tampón, que comprende citrato 300 mM a pH 4,0; el vial 4 contenía un tampón fosfato alcalino (14,2 mg/ml de fosfato sódico dibásico heptahidrato);  
30 y el vial 5 era un vial vacío estéril. Los liposomas vacíos anteriores se prepararon mediante dilución de una solución de etanol de esfingomiolina y colesterol en tampón citrato para formar vesículas multilamelares grandes. A continuación, éstas se extruyeron usando técnicas estándar, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.741.516, para formar vesículas unilamelares grandes (diámetro de aproximadamente 100-120 nm).

De los viales 1 y 2 se extrajeron 4 ml de solución de sulfato de vincristina y se añadieron al vial 5 estéril.  
35 Posteriormente, se extrajeron 0,8 ml de esfingomiolina/colesteriliposomas del vial 3 y se añadieron al vial 5. El vial 5 se invirtió cinco veces para mezclar los materiales. 20 ml de la solución de fosfato sódico del vial 4 se añadieron al vial 5. De nuevo, el vial 5 se invirtió cinco veces sin agitación, para mezclar los materiales. Después, el vial 5 se calentó en un baño de agua a 60-65 °C durante cinco minutos, tras los cuales se invirtió de nuevo el vial cinco veces.  
40 Después, el vial se calentó de nuevo durante cinco minutos y se invirtió cinco veces más.

El producto final (vincristina esfingosómica, VE) contenía 0,16 mg/ml de sulfato de vincristina y 3,2 mg/ml de lípido total.

### 45 Ejemplo 2

#### TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA (LLA) RECURRENTE O RESISTENTE CON VINCRISTINA ESFINGOSÓMICA (VE) Y DEXAMETASONA

50 En general, la vincristina y la dexametasona se usan en la fase de inducción de remisión de la terapia para la LLA, pero debe combinarse con una antraciclina (doxorubicina o daunorubicina) para conseguir una tasa de respuesta completa (RC) alta (Gottlieb y col., Blood 64:267-274, 1984). No obstante, por desgracia, este régimen a menudo produce toxicidad grave, incluida mielosupresión y cardiotoxicidad. Dado que muchos pacientes tienen comprometida la función de la médula ósea a causa de la expansión de los blastos leucémicos en la médula, las  
55 combinaciones mielosupresoras pueden incluir una neutropenia grave con susceptibilidad acompañante a sufrir infecciones potencialmente mortales. Además, particularmente en ancianos, las comorbidades pueden reducir de forma significativa la capacidad del paciente para tolerar la quimioterapia intensiva. La inclusión de antraciclina en la combinación puede también inducir cardiotoxicidades, que limita además dichos regímenes en pacientes con afecciones cardíacas subyacentes.

60 Se analizó el efecto del uso de vincristina encapsulada en liposoma en una combinación con otro agente quimioterapéutico para el tratamiento de la LLA recurrente o resistente, con el fin de determinar su el uso de vincristina encapsulada en liposoma anularía la necesidad de usar también una antraciclina (doxorubicina i daunorubicina) para alcanzar una respuesta completa (RC) alta, de modo que se reducen las toxicidades, incluida  
65 mielosupresión y cardiotoxicidad, asociadas con las antraciclina, sin comprometer el desenlace terapéutico global.

Se realizó un ensayo clínico de fase I en veinte pacientes diagnosticados con LLA recurrente o resistente (incluida LLA de células de Burkitt) sin neuropatía periférica (NP) o central activa o previa superior al grado 2. La mediana de edad de los pacientes fue de 36 años (intervalo, 21-62). El treinta por ciento de los pacientes fue resistente a la terapia de inducción y la mediana del número de regímenes de rescate previos fue dos (intervalo, 0-3).

Se trató a los pacientes con vincristina encapsulada en liposoma (VE, como se ha descrito anteriormente) semanalmente (dosis escalada en tres sujetos de cada corte y expansión a seis por toxicidad) y pulsos de dexametasona (40 mg al día los días 1-4 y 11-14). Un ciclo de tratamiento se definió como cuatro dosis semanales de VE. Se trató a tres pacientes con VE semanalmente a 1,5 mg/m<sup>2</sup>; se trató a tres pacientes con VE semanalmente a 1,825 mg/m<sup>2</sup>; se trató a cinco pacientes con VE semanalmente a 2,0 mg/m<sup>2</sup>; se trató a siete pacientes con VE semanalmente a 2,25 mg/m<sup>2</sup>; y se trató a dos pacientes con VE semanalmente a 2,4 mg/m<sup>2</sup> (Tabla 1).

Tabla 1. Cohortes de escalado de la dosis para vincristina esfingosómica

Dosis de vincristina <sup>1</sup>	Dosis de dexametasona <sup>2</sup>	Número de pacientes
1,5 mg/m <sup>2</sup>	40 mg	3
1,825 mg/m <sup>2</sup>	40 mg	3
2,0 mg/m <sup>2</sup>	40 mg	5
2,25 mg/m <sup>2</sup>	40 mg	7
2,4 mg/m <sup>2</sup>	40 mg	2

<sup>1</sup> Semanalmente sin limitar la dosis

<sup>2</sup> Días 1-4 y 11-14

Las toxicidades no hematológicas atribuidas a la VE incluyeron NP de grado 1-2 en casi todos los pacientes y síndrome de lisis tumoral en un paciente. Cinco pacientes presentaban elevaciones transitorias de grado 3-4 en los niveles de transaminasas hepáticas atribuidas a profilaxis antifúngica de azol. Las infecciones de grado 3 (p. ej., bacteriemia o procesos fúngicos) estaban relacionadas con neutropenia basal en seis pacientes y neutropenia inducida por VE en cuatro pacientes. No se han observado toxicidades limitantes de la dosis a las dosis evaluadas hasta la fecha y se realizan estudios adicionales usando dosificaciones más elevadas.

Los resultados del estudio de toxicidad fueron sorprendentes, ya que, en general, la vincristina libre se administra a 1,4 mg/m<sup>2</sup>, a menudo con límite de dosis a 2,0 o 2,5 mg de la dosis total. Las dosis de VE no estaban limitadas y, por tanto, se administraron dosis totales de vincristina de aproximadamente 4,1 mg para la cohorte de dosis más elevada (en base a la BSA media de 1,7 m<sup>2</sup>). Además, estas dosis altas se administraron según un programa semanal, observándose sólo neurotoxicidad periférica moderada (grados 1-2).

De los veinte pacientes evaluables, se alcanzaron las siguientes mejores respuestas (Tabla 2). Seis pacientes (30 %) alcanzaron remisión completa (RC) y un paciente alcanzó una respuesta parcial. La tasa de respuesta global observada en este estudio de fase I fue, por tanto, del 35 %. Esta es una inesperada tasa de respuesta alta, dado que los pacientes habían recurrido o eran resistentes a la terapia previa y dado que muchos pacientes fueron tratados a dosis de vincristina liposómica inferiores a la dosis máxima tolerada. De los trece pacientes restantes, dos mostraron alguna mejora hematológica. Dos pacientes suspendieron la terapia de forma prematura (uno por PO tras 3 dosis de VE y uno retiró el consentimiento tras 3 dosis) y en un paciente se interrumpió la terapia tras una dosis de VE debido a colitis por *C. difficile*. Un paciente con RC sufrió recaída tras tres meses y alcanzó una tercera RC con hiper-CVAD, seguido de trasplante alogénico de células madre (SCT). Tres pacientes fueron sometidos a SCT durante la RC (uno murió tras sepsis).

Tabla 2. Evaluación de la respuesta para vincristina esfingosómica y dexametasona en LLA por dosis de vincristina y tasa de respuesta global

Dosis de vincristina	Número de pacientes	Número de pacientes con respuesta parcial	Número de pacientes con respuesta completa
1,5 mg/m <sup>2</sup>	3	-	1
1,825 mg/m <sup>2</sup>	3	-	1
2,0 mg/m <sup>2</sup>	5	1	1
2,25 mg/m <sup>2</sup>	7	-	2
2,4 mg/m <sup>2</sup>	2	-	1
Todas las dosis	20	1	6

Estos resultados demuestran que la vincristina encapsulada en liposoma en combinación con dexametasona es particularmente eficaz en el tratamiento de la LLA recurrente y resistente, y, además, establecen que los alcaloides de la vinca encapsulados en liposoma son una alternativa superior a los alcaloides de la vinca libres en el tratamiento de cánceres, incluidas leucemias y linfomas recurrentes y resistentes. La vincristina encapsulada en liposoma se puede usar a una dosis mayor que la vincristina libre y no requiere el uso combinado de una antraciclina. Esto reduce considerablemente las toxicidades asociadas, de modo que se permite un tratamiento más seguro para un número mayor de pacientes.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de vincristina encapsulada en liposoma en combinación con dexametasona para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un ser humano, en el que dicho cáncer es un linfoma o leucemia y en el que el tratamiento no comprende además administrar una antraciclina a dicho ser humano.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho liposoma comprende esfingomielina y colesterol.
- 10 3. El uso de la reivindicación 2, en el que la proporción entre esfingomielina y colesterol está entre 75/25 (%mol de esfingomielina/%mol de colesterol) y 50/50 (mol de esfingomielina/%mol de colesterol).
4. El uso de la reivindicación 3, en el que la proporción entre esfingomielina y colesterol es de aproximadamente 55/45 (%mol de esfingomielina/%mol de colesterol).
- 15 5. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha vincristina es para administración a una dosis de entre 1,4 -2,8 mg/m<sup>2</sup>.
- 20 6. El uso de la reivindicación 5, en el que dicha vincristina es para administración a una dosis de entre 1,4 -2,4 mg/m<sup>2</sup>.
7. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha vincristina es para administración a una dosis superior a 1,4 mg/m<sup>2</sup>.
- 25 8. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha dexametasona es para administración a una dosis de entre 25 -75 mg.
9. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha leucemia es leucemia linfoblástica aguda (LLA).
10. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento es un tratamiento de primera línea.
- 30 11. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho cáncer es un cáncer recurrente o resistente.
12. Uso de vincristina encapsulada en liposoma en combinación con dexametasona para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) en un ser humano, en el que el tratamiento no comprende además administrar una antraciclina a dicho ser humano.
- 35 13. El uso de la reivindicación 12, en el que dicho tratamiento es un tratamiento de primera línea.
14. El uso de la reivindicación 12, en el que dicha LLA es una LLA recurrente.
- 40 15. El uso de la reivindicación 12, en el que dicho liposoma comprende esfingomielina y colesterol.
16. El uso de la reivindicación 15, en el que la proporción entre esfingomielina y colesterol está entre 75/25 (%mol de esfingomielina/%mol de colesterol) y 50/50 (mol de esfingomielina/%mol de colesterol).
- 45 17. El uso de la reivindicación 16, en el que la proporción entre esfingomielina y colesterol es 55/45 (%mol de esfingomielina/%mol de colesterol).
18. El uso de la reivindicación 12, en el que dicha vincristina es para administración a una dosis de entre 1,4 -2,8 mg/m<sup>2</sup>.
- 50 19. El uso de la reivindicación 18, en el que dicha vincristina es para administración a una dosis de entre 1,4 -2,4 mg/m<sup>2</sup>.
20. El uso de la reivindicación 12, en el que dicha vincristina es para administración a una dosis superior a 1,4 mg/m<sup>2</sup>.
- 55 21. El uso de la reivindicación 12, en el que dicha dexametasona es para administración a una dosis de entre 25 -75 mg.
22. El uso de la reivindicación 12, en el que dicha vincristina es para administración a una dosis superior a 1,4 mg/m<sup>2</sup>, dicha dexametasona es para administración a una dosis de entre 25 -75 mg.
- 60 23. Una combinación de vincristina y dexametasona encapsuladas en liposoma para usar en el tratamiento del cáncer en un ser humano, en el que dicho cáncer es un linfoma o leucemia y en el que el tratamiento no comprende además administrar una antraciclina a dicho ser humano.
- 65

24. Una combinación de vincristina y dexametasona encapsuladas en liposoma para usar en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) en un ser humano, en el que el tratamiento no comprende además administrar una antraciclina a dicho ser humano.