

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 844**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/12** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 31/704** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 103/30** (2006.01)  
**A61K 103/40** (2006.01)  
**A61K 103/00** (2006.01)  
**A61K 101/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2005 E 05805163 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1812115**

54 Título: **Liposomas que encierran un radionucleido y doxorubicina para terapia de combinación**

30 Prioridad:

**22.10.2004 GB 0423565**

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

**09.10.2013**

73 Titular/es:

**ALGETA ASA (100.0%)**  
**Kjelsåsveien 172A**  
**0884 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**LARSEN, ROY y**  
**JONASDOTTIR, THORA JOHANNA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 424 844 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

Liposomas que encierran un radionucleido y doxorubicina para terapia de combinación

La presente invención se refiere a formulaciones de liposomas y, en particular, a liposomas para uso en terapia de combinación con endo-radionucleidos que emiten radiación alfa.

5 El tratamiento de enfermedades hiperplásicas o neoplásicas, tales como cánceres, requiere frecuentemente la administración de agentes citotóxicos con objeto de eliminar selectivamente células y poblaciones celulares que muestran patrones de crecimiento incontrolado o indeseable. En el caso de neoplasias localizadas, tales como tumores sólidos, se puede utilizar la cirugía para eliminar la mayoría de la masa de células indeseables, pero esto se está empleando cada vez más en combinación con un tratamiento citotóxico local, regional y/o sistémico para  
10 minimizar tanto el riesgo de recurrencia como la cantidad de tejido resecaado.

En el caso de enfermedades neoplásicas dispersas, tales como cánceres metastásicos, no se puede utilizar generalmente la cirugía como único modo de tratamiento, y los agentes citotóxicos regionales o sistémicos serán típicamente una parte principal del régimen terapéutico. Por lo tanto, existe una considerable y progresiva necesidad de sistemas citotóxicos nuevos y mejorados, particularmente para el tratamiento de la enfermedad neoplásica.

15 Durante muchos años se han utilizado radionucleidos emisores de radiación beta como agentes citotóxicos en productos radiofarmacéuticos para la terapia del cáncer. Sin embargo, en los últimos años también se han realizado esfuerzos para utilizar emisores de radiación alfa en agentes antitumorales.

Los emisores de radiación alfa presentan varias características que les distinguen de los emisores de radiación beta y les proporcionan potencialmente una eficacia aumentada en la terapia. Aquéllas incluyen sus mayores energías y sus alcances más cortos en los tejidos.  
20

El alcance de la radiación de los emisores de partículas alfa típicos en los alrededores fisiológicos es generalmente inferior a 100 micrómetros, el equivalente a sólo unos pocos diámetros celulares. Esto hace que estas fuentes sean bien adecuadas para el tratamiento de tumores, incluyendo micrometástasis, ya que poca de la energía irradiada pasará más allá de las células diana y, de este modo, se podrá minimizar el daño al tejido sano circundante. Por  
25 contraste, una partícula beta tiene un alcance de 1 mm o más en agua.

La energía de la radiación de partículas alfa es también elevada en comparación con la energía de las partículas beta, los rayos gamma y los rayos X, siendo típicamente 5-8 MeV, o de 5 a 10 veces la de una partícula beta y 20 veces o más la energía de un rayo gamma. Por lo tanto, este depósito de una gran cantidad de energía a lo largo de una distancia muy corta proporciona a la radiación alfa una transferencia lineal de energía (LET; del inglés, linear energy transfer) excepcionalmente elevada en comparación con la de una radiación gamma o beta. Esto explica la excepcional citotoxicidad de los radionucleidos emisores de radiación alfa y también impone exigencias rigurosas en cuanto al nivel de control y el estudio de la distribución de radionucleidos, necesarias para evitar efectos secundarios inaceptables.  
30

Otros factores que hacen que ciertos radionucleidos emisores de radiación alfa sean muy adecuados como agentes citotóxicos y también muy estimuladores como agentes para un preciso direccionamiento *in vivo* son las propiedades de sus nucleidos hijos. En particular, muchos radionucleidos emisores de radiación alfa forman parte de una cadena de desintegraciones de varias transformaciones alfa y/o beta entre el nucleido inicial y un isótopo hijo estable. Cuando cualquier nucleido hijo es también un emisor de radiación alfa, este nucleido debe ser también dirigido y controlado ya que, si no, causará efectos tóxicos indeseables al acumularse en tejido sano. Desafortunadamente,  
35 tanto los factores físicos como los químicos hacen que sea muy difícil alcanzar este control.  
40

Cuando un radionucleido se desintegra, el nucleido hijo generado es a menudo químicamente bastante diferente del isótopo original. El radio-224, por ejemplo, es un emisor de radiación alfa pero es químicamente un metal alcalinotérreo que adopta el estado de oxidación 2+. Sin embargo, el producto inmediato de la desintegración alfa del <sup>224</sup>Ra es el radón-220, que es un gas noble. En consecuencia, cualesquiera que sean los efectos de coordinación o quelación que previamente puedan haber estado manteniendo establemente el ion parental de radio en un agente controlado de direccionamiento, es poco probable que se mantenga el control sobre el radón hijo, que puede por ello difundirse lejos y desintegrarse en otra parte del organismo. Obviamente, puede seguir una cadena completa de más procesos de desintegración sin ningún control sobre dónde tienen lugar estos procesos en el organismo.  
45

El efecto físico de una desintegración alfa sobre el nucleido hijo resultante puede ser también bastante drástico. El núcleo de helio de una partícula alfa tiene una masa atómica relativa de 4 y se emite típicamente a una velocidad de aproximadamente el 2% de la velocidad de la luz. Evidentemente, esto imparte una considerable energía al núcleo hijo resultante, del que, por una simple conservación del momento, podría esperarse que retrocediera a una velocidad superior a 100 km/s. Evidentemente, las fuerzas destructivas combinadas de la partícula alfa de muy alta  
50

5 velocidad y del retroceso impartido al núcleo hijo masivo pueden romper enlaces químicos, expulsar a los núcleos de la quelación y causar problemas considerables en cualquier intento para controlar el destino de los núcleos situados más abajo en la cadena de desintegraciones nucleares. Como resultado, se han proporcionado muy pocos métodos mediante los cuales se puedan utilizar en terapia núcleos que presentan desintegraciones alfa, a causa de las dificultades para mantener el control sobre las subsiguientes desintegraciones. A continuación se muestran las cadenas de desintegraciones de algunos isótopos emisores de radiación alfa que podrían ser útiles en terapia.

Tabla 1

Nucleido	Modo de desintegración	Energía media de partícula (MeV)	Semivida
<sup>227</sup> Th	α	6,02	18,72 días
<sup>223</sup> Ra	α	5,78	11,43 días
<sup>219</sup> Rn	α	6,88	3,96 segundos
<sup>215</sup> Po	α	7,53	1,78 ms
<sup>211</sup> Pb	β	0,45	36,1 minutos
<sup>211</sup> Bi	α	6,67	2,17 minutos
<sup>207</sup> Tl	β	0,49	4,77 minutos
<sup>207</sup> Pb			Estable

Tabla 2

Nucleido	Modo de desintegración	Energía media de partícula (MeV)	Semivida
<sup>225</sup> Ac	α	5,8	10 días
<sup>221</sup> Fr	α	6,3	4,8 minutos
<sup>217</sup> At	α	7,0	32 ms
<sup>213</sup> Bi	β	0,44	45,6 minutos
<sup>213</sup> Po	α	8,3	4 μs
<sup>209</sup> Pb	β	0,6	3,25 horas
<sup>209</sup> Bi			Estable

10 Como se puede ver en las tablas anteriores, si se utiliza un emisor de partículas alfa relativamente alto en la cadena de desintegraciones, existe la posibilidad de que un solo núcleo proporcione 4 o 5 desintegraciones alfa muy energéticas y muy citotóxicas antes de que se alcance un isótopo estable. Esto podría proporcionar posiblemente una muerte celular dirigida muy eficaz. Sin embargo, el problema con esto es que, si no se controla el destino de estos hijos, para cada núcleo parental que se desintegra en el sitio de acción deseado pueden tener entonces lugar 3 o 4 desintegraciones alfa más en sitios indeseados. Por lo tanto, dichos núcleos tienen un poder muy elevado pero exigen controles físicos y químicos rigurosos sobre su distribución.

20 Se han propuesto algunos métodos que implican la quelación de núcleos metálicos que emiten radiación alfa, pero son generalmente inadecuados para mantener el control sobre una cadena global de desintegraciones que comienza en cualquier radioisótopo que tiene uno o más núcleos hijos que emiten radiación alfa porque con la simple quelación no se puede mantener el control sobre estos núcleos hijos por las razones anteriormente consideradas. En el pasado se propusieron ciertos métodos para ayudar a controlar la distribución de núcleos hijos después de una desintegración alfa y para permitir así un direccionamiento eficaz y el uso de emisores alfa en terapia. Estos métodos incluyen la incorporación del emisor alfa a superficies óseas que necesitan tratamiento, donde los hijos pueden permanecer atrapados (por ejemplo, el documento WO 00/40275), y la incorporación de emisores alfa a liposomas para que los núcleos hijos que retroceden permanezcan atrapados en la región central del liposoma (por ejemplo, el documento WO 01/60417).

30 Aún otra dificultad con la administración de radionúcleos que emiten radiación alfa es el efecto destructivo de la radiación alfa y de los núcleos hijos en retroceso sobre la composición. La altísima energía del proceso de desintegración no sólo puede expulsar el radionucleido de la quelación sino que puede ejercer un considerable efecto destructivo sobre la propia formulación. Por lo tanto, incluso si el radionucleido tiene una semivida de varios días, puede que sea necesario preparar una composición farmacéutica directamente antes de la administración ya que la energía destructiva liberada por la desintegración de incluso una pequeña cantidad del radioisótopo puede

alterar el resto de la composición.

Un modo mediante el cual se ha potenciado en los últimos años la eficacia de los tratamientos para la enfermedad neoplásica, especialmente los cánceres, es por el concepto de la terapia de combinación. La idea que yace bajo la terapia de combinación es que se utilizan simultáneamente, o en una sucesión relativamente rápida, dos o más fármacos o métodos para combatir poblaciones celulares indeseadas. De este modo, células diana que pueden haber resultado debilitadas por un primer método de tratamiento pueden volverse más susceptibles a la muerte por un método subsiguiente. Además, los efectos secundarios de dos o más métodos de tratamiento usados en combinación pueden ser aditivos o preferiblemente menos que aditivos mientras el efecto terapéutico es aditivo o preferiblemente más que aditivo. Por lo tanto, se puede proporcionar un mayor efecto terapéutico usando un régimen de tratamiento que permanece tolerable al paciente.

Uno de los métodos más eficaces para proporcionar una terapia de combinación es generar un medicamento con más de un modo de actividad. Esto da lugar al tratamiento simultáneo de células diana con más de un agente terapéutico. Esto puede dar lugar a un aumento de eficacia mayor que el aditivo ya que, para sobrevivir, la célula debe soportar simultáneamente dos modos de ataque. Igualmente, cualquier subpoblación de células diana que pueda presentar cierta resistencia a un modo de tratamiento será probablemente aniquilada por el otro modo y, de este modo, se retrasará el desarrollo de resistencia.

En la actualidad, no hay un método eficaz para generar agentes terapéuticos que puedan controlar y suministrar la elevada citotoxicidad de un radionucleido metálico pesado emisor de radiación alfa y sus isótopos hijos en combinación con un agente terapéutico (especialmente citotóxico) secundario en el mismo sistema de suministro de tratamientos. Esto es así porque la combinación de los dos en la misma molécula dependería de un efecto de quelación para atrapar el emisor alfa, lo que sería inadecuado para mantener el control sobre los núcleos hijos. Por lo tanto, existe una considerable necesidad de un medicamento y un sistema de suministro que puedan proporcionar una terapia de combinación que incluya el suministro y el control de un metal pesado emisor de radiación alfa en combinación con el suministro simultáneo de un agente secundario en el mismo sistema de suministro.

Las dificultades a las que hay que enfrentarse en la preparación de un medicamento de combinación eficaz que incluya un radionucleido emisor de radiación alfa son mucho mayores que a las que hay que enfrentarse en la preparación de, por ejemplo, combinaciones de emisores de radiación beta y otros agentes terapéuticos. Entre estas dificultades están los problemas con el mantenimiento del control sobre los núcleos parentales e hijos anteriormente descritos, la enorme y concentrada fuerza destructiva de la irradiación alfa local, y el hecho de que no se puedan administrar isótopos de larga vida a causa del daño a largo plazo que dicha irradiación podría causar al sujeto. En el caso de, por ejemplo, un emisor de radiación beta, el retroceso nuclear es relativamente pequeño, lo que permite que se coordine un emisor de radiación beta con otro agente terapéutico mediante una simple quelación. Similarmente, el depósito de energía por unidad de volumen de la emisión beta es aproximadamente cuatro órdenes de magnitud menor que el de la emisión alfa y, por lo tanto, cualquier estructura química muy próxima a la irradiación alfa debe ser capaz de resistir un daño mucho mayor, mientras se mantiene funcional, que el que sería en el caso de los emisores de radiación beta. El aspecto de preparación es una dificultad significativa adicional. En particular, el eficaz y robusto control de los emisores de radiación alfa debe ser idealmente proporcionado por un agente de direccionamiento que pueda ser cargado rápida y fácilmente, preferiblemente en el "momento de asistencia" o muy poco antes. No se pueden emprender procedimientos sintéticos complejos en el corto período disponible antes de la desintegración de un emisor de radiación alfa adecuado.

De este modo, las combinaciones de emisores de radiación alfa y otros agentes terapéuticos se han visto previamente como casi imposibles de producir ya que deben tener una fácil síntesis, un robusto control sobre los radionúcleos y una estabilidad de la formulación frente a la destrucción o pérdida del medicamento secundario bajo un bombardeo prolongado de alta energía.

Los presentes inventores han establecido sorprendentemente ahora que se pueden preparar liposomas que contengan tanto un radionucleido metálico pesado emisor de radiación alfa como un agente terapéutico secundario que es doxorubicina. Más sorprendentemente aún, han establecido que dichos liposomas pueden ser hechos lo suficientemente estables frente a las elevadas energías de la desintegración alfa y el retroceso nuclear para que puedan permanecer estables en almacenamiento durante periodos de varias semanas y puedan conservar establemente el emisor de radiación alfa, el agente terapéutico secundario (doxorubicina) y, en algunos casos, los núcleos hijos después de la desintegración alfa. Esto es una considerable sorpresa ya que el liposoma será perforado muchas veces por las partículas de alta energía durante este periodo.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un agente citotóxico que comprende liposomas, en donde dichos liposomas encierran una disolución que comprende al menos un radionucleido emisor de radiación alfa como se define en las reivindicaciones y al menos otro agente terapéutico que es doxorubicina. Preferiblemente, el radionucleido emisor de radiación alfa es un metal pesado emisor de radiación alfa, como se define en las reivindicaciones. Los liposomas también encierran preferiblemente al menos un agente quelante o

complejante. Los liposomas también encierran preferiblemente al menos un ionóforo.

En otro aspecto, la presente invención también proporciona un método para la síntesis de liposomas que encierran una disolución que comprende al menos un radionucleido emisor de radiación alfa como se define en las reivindicaciones y al menos otro agente terapéutico que es doxorubicina, método que comprende poner liposomas que encierran una disolución que comprende al menos un agente terapéutico (doxorubicina) distinto de un radionucleido emisor de radiación alfa, en contacto con una disolución que comprende al menos un ionóforo y al menos un radionucleido emisor de radiación alfa como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, el método de la invención es un método para la formación de un agente citotóxico de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un agente citotóxico de la presente invención y, opcional y preferiblemente, al menos un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente tolerables. En aún otro aspecto, la invención proporciona un agente citotóxico de la presente invención para uso en terapia.

Los agentes citotóxicos de la presente invención y las composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden dichos agentes son muy adecuados para uso en el tratamiento de una enfermedad, particularmente en el tratamiento de una enfermedad hiperplásica o neoplásica.

De este modo, en aún otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para uso en el tratamiento de una enfermedad, preferiblemente una enfermedad hiperplásica o neoplásica, tratamiento que comprende administrar a un sujeto (humano o no humano), preferiblemente un mamífero, un agente citotóxico de la presente invención. En aún un aspecto más, la presente invención proporciona el uso de un agente citotóxico de la presente invención en la fabricación de un medicamento para uso en un método de tratamiento de una enfermedad hiperplásica o neoplásica. El agente citotóxico debería ser preferiblemente administrado en una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico, profiláctico y/o paliativo del dolor.

Los agentes citotóxicos de la presente invención comprenden liposomas que encapsulan una disolución que comprende al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o al menos un radionucleido emisor indirecto de radiación alfa como se define en las reivindicaciones, y al menos otro agente terapéutico que es doxorubicina. Preferiblemente, los radionucleidos de la presente invención serán radionucleidos metálicos pesados ya que tendrán una masa isotópica relativa de al menos 150 unidades de masa atómica. Preferiblemente, los radionucleidos tendrán una masa isotópica de al menos 200, más preferiblemente de entre 210 y 230. Los radioisótopos metálicos pesados emisores de radiación alfa muy preferidos incluyen  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  y  $^{227}\text{Th}$ .

Como se emplea en esta memoria, la expresión "radionucleido emisor de radiación alfa" abarca núcleos con un único modo (alfa) de desintegración radiactiva y también núcleos con múltiples modos de desintegración, en donde al menos una porción de los núcleos de este isótopo se desintegran por emisión alfa. Cuando un núcleo tiene más de un modo de emisión, es preferible que al menos el 1% se desintegre por emisión alfa, preferiblemente al menos el 10%, y más preferible que al menos el 30% se desintegre por emisión alfa. En una realización, sustancialmente todos los núcleos se desintegrarán por emisión alfa. Sin embargo, cuando un emisor de radiación alfa de "ramificación" que tiene dos o más modos de desintegración produce una proporción relativamente baja de partículas alfa, éste puede ser también un emisor "indirecto" de radiación alfa, como se describe en esta memoria más adelante, ya que el producto de la desintegración no alfa puede dar lugar (directa o indirectamente) a otro emisor de radiación alfa. Los emisores de radiación alfa usados en la presente invención son:  $^{211}\text{At}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  y  $^{227}\text{Th}$ .

Como se emplea en esta memoria, la expresión "radionucleido emisor de radiación alfa" también se utiliza, cuando lo permite el contexto, para indicar un radionucleido emisor "indirecto" de radiación alfa. Dichos emisores indirectos de radiación alfa pueden ser radioisótopos que no experimenten en sí mismos una desintegración alfa en grado significativo sino que se desintegren por otro modo (por ejemplo, por emisión beta) para formar un emisor de radiación alfa. Preferiblemente, este emisor de radiación alfa será el producto hijo directo del emisor "indirecto" de radiación alfa, pero puede ser el resultado de más de una desintegración no alfa. Preferiblemente, el emisor de radiación alfa formado a partir de la desintegración de un emisor "indirecto" de radiación alfa tendrá una corta semivida (por ejemplo, inferior a 24 horas, más típicamente inferior a 1 hora y preferiblemente inferior a 10 minutos). Los emisores indirectos de radiación alfa de la presente invención son  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{212}\text{Bi}$  y  $^{213}\text{Bi}$  (siendo los dos últimos también emisores de radiación alfa de "ramificación" en sí mismos).

En general, la semivida de los emisores de radiación alfa será suficiente para permitir su preparación, transporte y almacenamiento limitado antes de su uso como agentes radioterapéuticos pero, típicamente, no será tan larga como para plantear un riesgo sanitario a largo plazo al sujeto si queda retenida una cierta cantidad del isótopo en el organismo durante y después del tratamiento. Por lo tanto, los emisores de radiación alfa (incluyendo los emisores indirectos de radiación alfa) tendrán típicamente semividas de al menos 30 minutos, preferiblemente de al menos 6 horas, y más preferiblemente de al menos 1 día. Los emisores de radiación alfa usados más preferidos tendrían una

semivida de al menos 3 días.

En general, con objeto de evitar una exposición de larga duración, la semivida de los emisores de radiación alfa debería ser inferior a un año, preferiblemente inferior a 6 meses y más preferiblemente inferior a 1 mes. El organismo también estará potencialmente expuesto a la radiación de cualquier hijo emisor de radiación alfa generado por una desintegración subsiguiente. De este modo, cuando la cadena de desintegraciones del emisor de radiación alfa administrado incluye uno o más emisores de radiación alfa distintos, es preferible que ningún isótopo generado en esa cadena de desintegraciones, hasta, e incluyendo, el último isótopo emisor de radiación alfa antes de la formación de un núcleo estable, tenga una semivida superior a 1 año. Más preferiblemente, ésta no debería ser superior a 6 meses y, lo más preferiblemente, no superior a 1 mes.

Los agentes citotóxicos de la presente invención comprenden típicamente al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o un emisor indirecto de radiación alfa como se define en las reivindicaciones y al menos un agente terapéutico que es doxorubicina en cantidades combinadas para alcanzar eficacia desde el punto de vista terapéutico, profiláctico y/o paliativo del dolor. Evidentemente, esta cantidad dependerá del (de los) isótopo(s) particular(es) seleccionado(s) para el uso, la naturaleza y el número de los otros agentes terapéuticos, el (los) estado(s) que se va(n) a tratar, prevenir y/o paliar, la especie, la edad, el sexo, el peso, la salud y el pronóstico del sujeto, el modo de administración, la eficacia del direccionamiento, el tiempo de permanencia, el modo de aclaramiento, el tipo y la gravedad de los efectos secundarios de la composición farmacéutica, y muchos otros factores que resultarán evidentes a quienes tienen experiencia en la técnica. Típicamente, la dosis de radiación total estará en el intervalo de 10 kBq a 10 GBq por cada administración individual, siendo un intervalo más preferido de 1 MBq a 1 GBq por cada administración individual. Similarmente, la doxorubicina y el (los) otro(s) agente(s) terapéutico(s) se utilizarán en un nivel con el cual se espere una eficacia desde el punto de vista terapéutico, profiláctico y/o paliativo del dolor en combinación con el emisor de radiación alfa o el emisor indirecto de radiación alfa de la presente invención. Puesto que, en general, el (los) otro(s) agente(s) terapéutico(s) será(n) un (unos) agente(s) farmacéutico(s) conocido(s), se empleará(n) típicamente en un nivel de entre el 10% de su dosis terapéutica mínima normal y el 500% de su dosis terapéutica normal máxima. Más preferiblemente, este intervalo será del 25% de la dosis mínima normal al 200% de la dosis máxima normal.

En una realización preferida, el nivel total de emisión alfa en los agentes citotóxicos de la invención está por debajo de la dosis mínima requerida para una eficacia desde el punto de vista terapéutico, profiláctico y/o paliativo del dolor cuando se utilizan como una sola terapia (por ejemplo, el 10-99%, preferiblemente del 25 al 75%, de esa dosis mínima). Esto permite la reducción de los efectos secundarios causados por la terapia con endo-radionucleidos, pero la terapia se vuelve eficaz porque, en combinación con el al menos otro agente terapéutico, los agentes citotóxicos de la invención son en conjunto eficaces. En otra realización preferida, el otro agente terapéutico, o cada uno de los otros agentes terapéuticos, se utiliza en un nivel por debajo de la dosis terapéutica normal mínima, tal como, por ejemplo, 10-99% de la dosis terapéutica mínima normal, preferiblemente del 25 al 75% de su dosis terapéutica normal. De nuevo, esto sirve para reducir el peligro de efectos secundarios y permite un mayor nivel de eficacia total sin exponer al sujeto a efectos secundarios inaceptables.

En un aspecto preferido de la presente invención, en los agentes citotóxicos de la invención, el radionucleido emisor de radiación alfa o el emisor indirecto de radiación alfa de la presente invención y el al menos otro agente terapéutico que es doxorubicina son sinérgicos con respecto a sus dosificaciones. Esto quiere decir que el efecto proporcionado por el agente citotóxico de la presente invención es mayor que el que se podría prever a partir de los efectos aditivos de las dosis incorporadas del radionucleido emisor de radiación alfa o el emisor indirecto de radiación alfa de la presente invención y del al menos otro agente terapéutico que es doxorubicina, cuando se utilizan separadamente. En una realización alternativa pero igualmente preferida, en los agentes citotóxicos de la invención, el radionucleido emisor de radiación alfa o el emisor indirecto de radiación alfa como se define en las reivindicaciones y el al menos otro agente terapéutico que es doxorubicina son sinérgicos con respecto a sus efectos secundarios. Esto quiere decir que los efectos secundarios causados por el agente citotóxico de la presente invención son menores que los que se podrían prever cuando un efecto terapéutico equivalente es proporcionado por el radionucleido emisor de radiación alfa o emisor indirecto de radiación alfa o por el al menos otro agente terapéutico (doxorubicina), cuando se usan separadamente.

Una considerable ventaja de una realización de la invención es que los agentes citotóxicos son sorprendentemente capaces de mantener los núcleos hijos producidos por la desintegración alfa del radionucleido dentro del liposoma. Esto es particularmente importante cuando el nucleido hijo y/o cualquier otro nucleido generado en la cadena de desintegraciones radiactivas entre el primer radionucleido y un isótopo estable son también radionucleidos emisores de radiación alfa. De esta manera, en una realización, los liposomas encapsulan preferiblemente una disolución que comprende un radionucleido emisor de radiación alfa que genera durante su desintegración al menos otro radionucleido emisor de radiación alfa. Es preferible que el liposoma sea capaz de retener establemente este otro radionucleido emisor de radiación alfa. Es más preferible que el liposoma sea capaz de retener cualesquier radionucleidos emisores de radiación alfa subsiguientes que puedan ser generados por otra desintegración radiactiva.

- En realizaciones alternativas de la presente invención, cuando el núcleo padre es un emisor de radiación alfa como se definen las reivindicaciones, los núcleos hijos no pueden ser retenidos en un grado significativo. Sin embargo, esto es aceptable bajo ciertas circunstancias, particularmente cuando la desintegración del hijo es rápida y, por lo tanto, el isótopo hijo no tiene tiempo para translocarse significativamente después de la formación. Dicha rápida desintegración podría ser, por ejemplo, con una semivida inferior a 1 hora, preferiblemente inferior a 20 minutos y lo más preferiblemente inferior a 1 minuto. Similarmente, cuando la semivida del hijo es larga en comparación con su velocidad de aclaramiento del organismo, se desintegrará entonces poca cantidad del hijo antes de que sea expulsado y no resultará por ello un daño significativo. Esto podría ser con una semivida de al menos 1 día, preferiblemente al menos 3 días y más preferiblemente al menos 10 días.
- Un liposoma puede ser considerado capaz de retener establemente los núcleos hijos generados por la desintegración radiactiva si al menos el 10% de dichos núcleos hijos que resultan de esa desintegración radiactiva queda retenido en la disolución atrapada por el liposoma. Preferiblemente, se retiene al menos el 25% de los núcleos hijos y, más preferiblemente, se retiene al menos el 30% en esta disolución encapsulada. Esto es una considerable ventaja con respecto a otras formas de administración de radionucleidos alfa en las que se perderá eficazmente el 100% de los núcleos hijos a causa del retroceso nuclear tras la desintegración. Cuando los agentes citotóxicos de la presente invención se formulan para uso no sistémico (especialmente local o regional), los liposomas podrán ser más grandes y retendrán una proporción a un mayor de los radionucleidos alfa que se desintegran. En estas aplicaciones, se puede retener preferiblemente al menos el 40% e incluso al menos el 50% de los radionucleidos alfa que se desintegran.
- Un aspecto sorprendente y ventajoso de los agentes citotóxicos de la presente invención es que son capaces de retener los contenidos de los liposomas incluso bajo el bombardeo de alta energía de la desintegración alfa local. En una realización, los agentes citotóxicos retienen así al menos el 50% del otro agente terapéutico durante más de la semivida del radionucleido emisor de radiación alfa. Esto es preferiblemente mayor que el 60% y más preferiblemente de al menos el 75%.
- Los liposomas utilizados en la presente invención pueden ser formados a partir de cualquier lípido adecuado o mezcla del mismo y pueden ser unilaminares, bilaminares o multilaminares. Los presentes inventores han establecido sorprendentemente que los liposomas son capaces de mantener su estructura y retener los radionucleidos parentales e hijos y uno o más agentes terapéuticos adicionales incluso en unas condiciones bajo las cuales están expuestos al daño causado por un nivel terapéutico de irradiación alfa y por el retroceso nuclear resultante. Sin pretender ninguna vinculación teórica, es la creencia de los inventores que esta sorprendente capacidad es el resultado de la capacidad de los liposomas para "curarse" cuando son expuestos a un daño.
- Por lo tanto, es preferible que el lípido o la mezcla lipídica que forman la estructura laminar del liposoma tengan una temperatura de transición termotrópica cercana a, o por debajo de, las temperaturas fisiológicas o ambientales. De este modo, se potencia la fluidez de la membrana liposómica y se maximiza su capacidad para "curarse". En consecuencia, en una realización de la invención, los liposomas se forman a partir de un lípido o mezcla lipídica que tiene una temperatura de transición termotrópica de aproximadamente 10-50 °C, preferiblemente 18-45 °C y más preferiblemente 20-40 °C. Cuando se utiliza una mezcla de lípidos, no es necesario que todos los componentes tengan temperaturas de transición en estos intervalos, pero es preferible que al menos un componente lipídico tenga dicha temperatura de transición y, más preferiblemente, que la mezcla tenga en conjunto una temperatura de transición en este intervalo.
- De este modo, en una realización preferida, los agentes citotóxicos de la presente invención son estables frente a la pérdida de sus contenidos (especialmente la pérdida del radionucleido alfa y/o del al menos otro agente terapéutico) durante un almacenamiento de al menos 3 días, preferiblemente al menos 1 semana y lo más preferiblemente al menos 3 semanas cuando se almacenan a temperatura ambiental. Esta estabilidad es muy sorprendente ya que, durante este periodo de almacenamiento, los liposomas de los agentes citotóxicos serán repetidamente perforados por un nivel de partículas alfa y núcleos hijos en retroceso que será al menos equivalente a la dosis terapéutica capaz de una extensa muerte celular en el sujeto.
- En este contexto, por "establemente retenido" se quiere indicar que no se perderá más del 20%, preferiblemente no más del 10% y lo más preferiblemente no más del 5%, de los contenidos (especialmente el radionucleido alfa y/o el al menos otro agente activo) del liposoma en la disolución circundante durante el periodo de almacenamiento. Una vez más, sin pretender ninguna vinculación teórica, se cree que la capacidad de la membrana del liposoma para "autocurarse" después de ser "perforada" por la irradiación alfa y/o el retroceso permite este sorprendente grado de retención.
- Como se emplea en esta memoria, el término "liposoma" se utiliza para indicar una estructura vesicular que comprende al menos una bicapa lipídica que rodea y encierra al menos una región de disolvente. Puede estar presente más de una bicapa y, de este modo, el liposoma puede ser una vesícula unilaminar o una vesícula multilaminar (MLV; del inglés, multi-lamellar vesicle). Similarmente, puede estar encerrada más de una región al

haber regiones de disolvente entre las láminas de una MLV y/o por dos o más liposomas que están fusionados o unidos para encerrar dos o más regiones de disolvente separadas por al menos una bicapa lipídica. Se considera que cualquier región de disolvente esencialmente rodeada por una o más bicapas lipídicas es una región encerrada. Cuando está encerrada más de una región de disolvente, éstas comprenderán generalmente componentes de disolvente y disolución sustancialmente similares.

La región de disolvente encerrada por los liposomas de la presente invención será generalmente una disolución acuosa que llevará disueltos o suspendidos al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o emisor indirecto de radiación alfa como el descrito en esta memoria y al menos otro agente terapéutico que es doxorubicina. La región de disolvente puede comprender además otros componentes farmacéuticamente tolerables, incluyendo especialmente agentes quelantes y/o complejantes y/o ionóforos, modificadores del pH, modificadores de la tonicidad y agentes de direccionamiento.

Los liposomas sin grupos de direccionamiento tienden a incorporarse pasivamente a tumores sólidos a causa de una fenestración vascular asociada con tumores. Esto permite el direccionamiento "pasivo" de los agentes citotóxicos duales/múltiplemente activos de la presente invención cuando la enfermedad que se va a tratar incluye un tumor sólido. Es probable que el mecanismo responsable de la incorporación de liposomas a tumores sea la pérdida capilar que a menudo se halla en la neovasculatura de tumores, que permite que los liposomas se difundan a través de las paredes capilares y en el intersticio de los tumores pero no en tejidos normales.

Los liposomas de la presente invención pueden ser modificados con objeto de aumentar su capacidad para dirigirse al sitio de acción deseado del emisor alfa o emisor indirecto alfa y/o del al menos otro agente terapéutico (doxorubicina), y/o pueden ser modificados con objeto de controlar su velocidad de aclaramiento y/o su modo de aclaramiento. En particular, la velocidad de aclaramiento *in vivo* de los liposomas puede ser a menudo reducida mediante una modificación de la superficie del liposoma con una molécula que contiene polialquilenglicol. Dichas moléculas tendrán generalmente al menos una cadena de polialquileo (por ejemplo, polietileno, polipropileno o mezclas de los mismos) y al menos un grupo afín con la membrana (por ejemplo, una cadena de ácido graso o un grupo alcanilo o alqueno  $C_8$  a  $C_{24}$ ). Los ejemplos incluyen lípidos con injertos de polietilenglicol, y/o moléculas solubles en la membrana y modificadas con polipropilenglicol. Dicha modificación de la superficie resultará familiar a quien tiene experiencia en la técnica. Son muy preferidos los liposomas con superficie modificada, particularmente para uso sistémico, porque tienen generalmente un mayor tiempo de permanencia en la corriente sanguínea. Como resultado, tienen mayor probabilidad de aprovecharse de la naturaleza "con pérdidas" de la (neo)vasculatura tumoral y pueden proporcionar por ello un mayor efecto de direccionamiento tumoral.

Los liposomas pueden ser eficazmente dirigidos a su sitio de acción deseado mediante la modificación de la superficie con al menos un grupo de direccionamiento. Los grupos de direccionamiento adecuados incluyen polipéptidos tales como receptores de la superficie celular, fragmentos de receptor, moléculas de adhesión celular y fragmentos de las mismas, anticuerpos, construcciones de anticuerpo, fragmentos de anticuerpo y anticuerpos de cadena única, hormonas o compuestos análogos de hormona tales como estrógenos y testosteronas, y moléculas pequeñas tales como folatos o compuestos análogos de folato. En particular, los grupos de direccionamiento pueden ser ventajosamente grupos que se unen a la superficie celular, o agentes extracelulares producidos por células diana en concentraciones inusualmente elevadas. Dichos agentes incluyen receptores hormonales tales como receptores de testosterona y/o receptores de estrógeno. Al conjugar liposomas con anticuerpos monoclonales u otras moléculas con afinidad por receptores asociados a células tumorales, se pueden dirigir activamente a una sola célula o una enfermedad micrometastásica, y pueden también localizar tumores sólidos aún más eficazmente.

En una realización, los liposomas no son superficialmente modificados con folato conjugado con un anticuerpo monoclonal o fragmento Fab del mismo.

Típicamente, los liposomas utilizados en la presente invención serán adecuados para terapia sistémica, regional y/o local. Típicamente, los liposomas para uso local o regional (por ejemplo, intracavitario) serán más grandes que los destinados a aplicación sistémica a la corriente sanguínea. En general, los liposomas adecuados para administración a la corriente sanguínea (por ejemplo, por inyección o infusión intravenosa o intraarterial) tendrán su dimensión más grande no superior a 10  $\mu\text{m}$ , preferiblemente no superior a 1  $\mu\text{m}$  y más preferiblemente no superior a 200 nm. Puesto que puede que los liposomas muy pequeños no retengan sus contenidos tan eficazmente bajo el considerable efecto destructivo de la irradiación alfa terapéutica (y el resultante retroceso nuclear), los liposomas deberían tener generalmente su dimensión máxima no inferior a 10 nm, preferiblemente no inferior a 20 nm y más preferiblemente no inferior a 40 nm. En una realización preferida, los liposomas utilizados en los agentes citotóxicos de la presente invención tienen su dimensión máxima mayor que 100 nm (por ejemplo, 105 nm o más). Para un tratamiento distinto de por administración a la corriente sanguínea, la dimensión máxima de los liposomas será típicamente mayor y puede ser de hasta 100  $\mu\text{m}$ , preferiblemente hasta 50  $\mu\text{m}$  y más preferiblemente hasta 30  $\mu\text{m}$ . Con objeto de proporcionar un bajo aclaramiento en estos métodos de administración, los liposomas pueden tener una dimensión máxima de al menos 100 nm, preferiblemente al menos 2  $\mu\text{m}$  y más preferiblemente al menos 5  $\mu\text{m}$ .



En los agentes citotóxicos de la invención, la muestra de agente incluirá en su totalidad liposomas que contendrán tanto un radionucleido emisor de radiación alfa o emisor indirecto de radiación alfa como se define en las reivindicaciones, como al menos otro agente terapéutico que es doxorubicina. En general, el nivel de radionucleido alfa necesario para alcanzar un efecto terapéutico será muy bajo en comparación con el nivel de otro(s) agente(s) terapéutico(s) a causa de la citotoxicidad sumamente elevada de la radiación alfa. Como resultado, aunque una gran proporción de los liposomas contendrá el otro agente terapéutico (doxorubicina), no es necesario que todos contengan radionucleido alfa.

Es deseable que al menos el 80% en volumen de los liposomas contenga al menos un agente terapéutico distinto de un radionucleido emisor de radiación alfa. Este porcentaje será preferiblemente al menos el 90% y será lo más preferiblemente al menos el 95% (por ejemplo, sustancialmente el 100%). También es deseable que al menos el 10% en volumen de los liposomas contenga tanto el radionucleido como el otro agente activo. Esta proporción es preferiblemente al menos el 20%, más preferiblemente al menos el 30% y lo más preferiblemente al menos el 45%.

En otra realización, los agentes citotóxicos de la invención pueden comprender liposomas que contengan tanto al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o emisor indirecto de radiación alfa como se define en las reivindicaciones, como al menos otro agente terapéutico que es doxorubicina, como se indica en esta memoria, y contener también una pequeña proporción (30% o menos en volumen) de liposomas adicionales que sólo contengan el otro agente terapéutico (doxorubicina) o que sólo contengan preferiblemente radionucleido. Esto permite que las propiedades del agente citotóxico sean "bien afinadas" para una aplicación particular antes de la administración. Dichos liposomas adicionales son preferiblemente mezclados poco antes de la administración.

Los liposomas adecuados para uso en la formación de los agentes citotóxicos de la presente invención pueden ser formados mediante métodos conocidos en la técnica o pueden ser comercialmente adquiridos con apropiadas composiciones, tamaños y superficies opcionalmente modificadas. En una realización preferida, los agentes citotóxicos se forman a partir de liposomas comercialmente asequibles precargados con al menos un agente terapéutico no radiactivo. Las formulaciones liposómicas pegiladas de doxorubicina son particularmente preferidas y pueden ser sintetizadas o de procedencia comercial. Un liposoma precargado muy preferido es una formulación liposómica de doxorubicina, tal como la formulación comercial Caelyx (RTM).

El "otro agente terapéutico" distinto de doxorubicina al que se hace referencia en esta memoria es un agente adecuado para uso en terapia en combinación con un radionucleido emisor de radiación alfa o emisor indirecto de radiación alfa como se describe en esta memoria. Dichos agentes terapéuticos distintos de doxorubicina pueden estar presentes con objeto de reducir efectos secundarios indeseables del radioisótopo emisor de radiación alfa, pero serán típicamente agentes que en sí mismos son capaces de matar, o limitar el crecimiento de, al menos una porción de las células diana. En particular, puesto que tanto el radioisótopo emisor de radiación alfa como el (los) otro(s) agente(s) terapéutico(s) se distribuyen con los liposomas, es preferible que todos sean citotóxicos y muy preferible que sean citotóxicos por medio de diferentes mecanismos. Esto permite la máxima probabilidad de obtener una ventaja de la terapia de combinación puesto que las células que son resistentes a un mecanismo pueden ser susceptibles a otro y el estrés causado a la célula diana por un agente puede dejarla debilitada con respecto al otro agente. Los otros agentes terapéuticos adecuados distintos de la doxorubicina incluyen radioisótopos que emiten otras formas de radiación, tales como partículas beta, rayos gamma, rayos X, electrones de conversión, electrones Auger o combinaciones de los mismos; agentes quimioterapéuticos tales como compuestos análogos de folato, compuestos análogos de nucleósido, toxinas, inhibidores de la angiogénesis, etcétera; agentes terapéuticos basados en ácido nucleico, tales como genes operativamente enlazados a promotores, DNAs y/o RNAs antisentido y pequeños DNAs/RNAs de interferencia; virus, sean activos o inactivados, como tales o como vehículos para agentes terapéuticos de ácido nucleico; agentes inmunoterapéuticos, incluyendo anticuerpos monoclonales o construcciones o fragmentos de los mismos, opcionalmente funcionalizados; y agentes para potenciar otras terapias, tales como boro para uso en terapia por captura de boro.

Otros agentes terapéuticos también incluyen agentes formadores de imágenes y potenciadores de imágenes para facilitar la visualización del sitio diana y/o la distribución del agente citotóxico. Dichos agentes formadores de imágenes incluyen isótopos emisores de rayos gamma y/o X, agentes de contraste para resonancia magnética (por ejemplo, complejos de gadolinio), agentes de contraste para ultrasonidos y/o agentes potenciadores del contraste para rayos X (por ejemplo, compuestos que contienen metal pesado o yodo).

Preferiblemente, cuando el otro agente terapéutico es un agente formador de imágenes, este agente terapéutico también tendrá un efecto citotóxico (tal como un emisor beta citotóxico con una emisión gamma mensurable) o se utilizará como un tercer o más agente terapéutico en combinación con el emisor alfa y al menos un "otro" agente terapéutico citotóxico.

Es preferible que el otro agente terapéutico no sea un emisor alfa. Cuando el otro agente terapéutico es un radionucleido con más de un modo de desintegración, es preferible que menos del 1%, preferiblemente menos del 0,5%, de la desintegración sea por emisión alfa.

En la presente invención, está encapsulada doxorubicina en los liposomas.

Los agentes citotóxicos de la presente invención encapsulan preferiblemente una disolución que comprende al menos un agente complejante/quelante. Al proporcionarse una concentración adecuada de al menos un agente complejante/quelante apropiado, los liposomas pueden retener los radionucleidos parentales e hijos en mayor grado y se puede ejercer de este modo un control más eficaz sobre la distribución *in vivo* del efecto citotóxico. La disolución presente dentro de los liposomas puede contener también otros agentes para reducir la posibilidad de que el retroceso nuclear impulse al núcleo hijo fuera del liposoma o de que la desintegración radiactiva cause que el radionucleido y/o cualquier otro agente terapéutico que es doxorubicina escapen a través de cualesquier agujeros transitorios en la membrana lipídica. Los otros agentes internos adecuados incluyen polímeros solubles en agua u otros agentes modificadores de la viscosidad (para lentificar la difusión de los agentes activos fuera del liposoma en el caso de que se produzca un agujero transitorio) e iones de corte transversal grande, tales como iones de metales pesados (radiactivos o preferiblemente no radiactivos), para reducir la distancia que recorrerá un núcleo hijo en retroceso antes de una colisión.

El (los) agente(s) complejante(s)/quelante(s) presente(s) en la disolución encerrada por los liposomas será(n) típicamente al menos un agente quelante macrocíclico polidentado, tal como poliéteres cíclicos y/o poliaminas cíclicas sustituidas o no sustituidas, politioéteres cíclicos, o compuestos cíclicos que tienen una mezcla de heteroátomos. Los tamaños de anillo adecuados para los quelantes, que pueden ser monocíclicos o policíclicos, son preferiblemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 20 átomos, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 18, con entre 2 y 10, preferiblemente entre 3 y 7, heteroátomos en el anillo. El (los) quelante(s) cíclico(s) puede(n) estar también sustituido(s) en cualquier carbono o cualquier heteroátomo adecuado (tal como nitrógeno) con sustituyentes opcionales. Estos sustituyentes opcionales pueden incluir uno o más grupos complejantes adicionales, tales como grupos ácido carboxílico, ácido fosfónico, amida, amina (primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria), éster o éter, y/o pueden servir para otros fines, tal como enlazar los quelantes a, o sobre, una cadena principal polímera con objeto de aumentar la concentración local de grupos quelantes. Algunos ejemplos de agentes quelantes adecuados incluyen:

ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA);

ácido 1,4,7,10-tetraazaciclotridecano-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraacético (TRITA);

ácido 1,4,7,10-tetraazaciclotetradecano-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA);

ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetra(metileno)-fosfónico (DOTMP);

ácido 1,4,7,10-tetraazaciclotridecano-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetra(metileno)-fosfónico;

ácido 1,4,7,10-tetraazaciclotetradecano-1,4,7,10-N,N',N'',N'''-tetra(metileno)-fosfónico;

ácido dietilentriamina-N,N',N''-pentaacético y derivados isómeros del mismo;

criptato[2,2,2], criptato[3,2,2], criptato[2,2,1] y mono- y di-benzoderivados de los mismos;

calix[4]arenos con puentes, que contienen grupos ricos en electrones seleccionados de entre hidroxilo, carboxilo, éster, amida y amina;

ácido 1,10-diaza-4,7,13,16-tetraoxaciclooctadecano-1,10-N,N'-bis-acético; y

1,10-diaza-4,7,13,16-tetraoxaciclooctadecano-1,10-N,N'-bis-malonato.

Los quelantes serán preferiblemente seleccionados para que correspondan a las valencias y estados de oxidación comunes del (de los) radionucleido(s) metálico(s) pesado(s) y, si fuera apropiado, de cualesquier radionucleidos hijos que fueran deseablemente retenidos dentro del liposoma. Por ejemplo, si el radionucleido emisor de radiación alfa inicial comprende  $^{227}\text{Th}$ , éste es entonces un metal de transición más estable en el estado de oxidación 4+, pero, tras la desintegración alfa, genera  $^{223}\text{Ra}$ , que es un metal alcalinotérreo que adopta un estado de oxidación 2+. Puesto que el  $^{223}\text{Ra}$  es también un radionucleido emisor de radiación alfa, es importante retener una proporción lo mayor posible de ambos isótopos, el parental y el hijo. Por lo tanto, los liposomas adecuados pueden contener agentes de quelación adecuados para retener tanto metales de transición 4+ como metales alcalinotérreos 2+, así como, opcionalmente, quelantes adecuados para retener los iones de otros nucleidos de la cadena de desintegraciones (quelantes que, por supuesto, pueden ser los mismos que los previamente considerados para los dos primeros iones). Sin embargo, evidentemente, cuando la semivida de un isótopo es muy corta, será menos importante que esté presente la correspondiente quelación.

Por lo tanto, en una realización, los agentes citotóxicos de la invención comprenden liposomas que encapsulan una disolución que comprende al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o radionucleido emisor indirecto de

radiación alfa y doxorrubicina, como se define en las reivindicaciones, así como quelantes adecuados para quelar uno o más iones comunes de cada radionucleido de la cadena de desintegraciones, que comienza con dicho radionucleido emisor de radiación alfa y acaba con el último radionucleido emisor de radiación alfa, antes de que se alcance un isótopo estable. Sin embargo, no es necesario proporcionar quelación para los núcleos de muy corta vida y, por lo tanto, pueden estar estos quelantes con la excepción de la quelación para cualquier isótopo que tenga una semivida inferior a 10 segundos, preferiblemente inferior a 5 segundos y lo más preferiblemente inferior a 1 segundo. Puede que tampoco se proporcione quelación cuando un radionucleido es un elemento no reactivo, tal como un gas noble, aunque, en dichos casos, se pueden usar preferiblemente efectos de viscosidad para reducir la velocidad de difusión, y también se pueden usar concentraciones elevadas de iones de metales pesados.

Puesto que los ionóforos, como se describen en esta memoria, también sirven para quelar los iones de átomos pesados utilizados en la presente invención (como se describe más adelante en esta memoria), en una realización de la invención, los "quelantes, como se describen en esta memoria, pueden ser ionóforos. Cuando éste es el caso, los componentes ionóforo y quelante de los agentes citotóxicos de la invención pueden ser el mismo compuesto y estarán presentes en un nivel suficiente para ser eficaces en ambas funciones.

En una realización alternativa, el quelante puede estar presente además de cualquier efecto de quelación proporcionado por el ionóforo. En dicha realización, el quelante al que se hace referencia en esta memoria no será el componente ionóforo.

Además, puesto que ciertos agentes bioactivos pueden servir para complejar los radionucleidos emisores de radiación alfa y/o los radionucleidos hijos de la presente invención, el agente complejante puede ser también un "otro agente terapéutico" como el descrito en esta memoria. La doxorrubicina es también un agente terapéutico quelante.

Los agentes citotóxicos de la presente invención también encapsulan preferiblemente una disolución que comprende al menos un ionóforo. Los ionóforos adecuados permiten el transporte del radionucleido emisor de radiación alfa a través de la (al menos una) bicapa de membrana del liposoma y también sirven para ayudar a capturar el radionucleido (especialmente el parental) dentro del liposoma. Los ionóforos adecuados incluyen cualquier molécula capaz de transportar un ion de metal pesado a través de una bicapa de membrana. Algunos ionóforos (tal como el ionóforo de calcio A 23187) se presentan naturalmente y pueden ser utilizados en forma de un extracto considerable o sumamente purificado, y otros pueden ser formados sintéticamente. Los ionóforos sintéticos incluyen preferiblemente dos o tres grupos amida sustituidos para la quelación del ion metálico, y varios sustituyentes hidrófobos (especialmente dos por grupo amida) para proporcionar una suficiente solubilidad en lípidos. Son grupos adecuados, por ejemplo, los sustituyentes alquílicos  $C_1$  a  $C_{18}$ , especialmente  $C_3$  a  $C_{10}$ .

Ionóforos de calcio y magnesio tales como A 23187, N,N,N',N'-tetrabutyl-3,6-dioxaoctanodi[tioamida], N,N,N',N'-tetraciclohexil-3-oxapentandiamida, diamida N,N-diciclohexil-N',N'-dioctadecil-diglicólica, N,N'-diheptil-N,N'-dimetil-1-butanodiamida y N,N"-octametileno-bis[N'-heptil-N'-metilmalonamida], y otros bien conocidos en la técnica, pueden ser particularmente adecuados para iones metálicos que tienen un estado de oxidación 2+ estable, especialmente  $Ra^{2+}$ , tales como  $^{223}Ra$  y/o  $^{224}Ra$ . Similarmente, ionóforos de Pb conocidos tales como N,N-dioctadecil-N',N'-dipropil-3,6-dioxaoctanodiamida pueden ser particularmente adecuados para iones de metal pesado en el estado de oxidación 4+, tal como  $Th^{4+}$  (por ejemplo,  $^{227}Th$ ).

Los agentes citotóxicos de la presente invención son muy adecuados para una muerte celular específica y, por lo tanto, son eficaces para uso en el tratamiento de enfermedades hiperplásicas y/o neoplásicas y para la fabricación de medicamentos para dicho tratamiento. Los agentes citotóxicos de la invención son particularmente adecuados para uso en la eliminación de células morbosas en leucemias y/o cánceres benignos, malignos y/o metastásicos.

Los ejemplos específicos de enfermedades adecuadas para tratamiento por los agentes de la presente invención incluyen cánceres pulmonares de células pequeñas y células no pequeñas, melanoma maligno, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de huesos, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer cervical, sarcomas, linfomas, leucemias y tumores de la próstata. Otras enfermedades a las que se puede aplicar particularmente el invento incluyen enfermedades no cancerosas, especialmente hiperplásicas, y para la reducción del dolor en enfermedades (especialmente enfermedades de los huesos), incluyendo la artritis. Además, los agentes citotóxicos de la invención pueden utilizarse para dirigirlos al sistema reticuloendotelial (SRE) y, por lo tanto, pueden utilizarse para inmunomodulación. Las enfermedades preferidas para dicho tratamiento incluyen enfermedades autoinmunes y de rechazo de tejidos, y, en particular, los agentes de la invención pueden ser empleados para ayudar a prevenir el rechazo de injertos en cirugía de trasplantes.

De este modo, una realización de estos aspectos se refiere a una composición para uso en el tratamiento de una enfermedad y, especialmente, para el tratamiento local de un tumor. Dicho tratamiento puede ser preferiblemente aplicado por medio de una inyección o infusión intratumoral de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente citotóxico de acuerdo con la invención a un sujeto (generalmente un paciente humano) que necesita dicho tratamiento. Dicho método proporciona la irradiación local del tejido tumoral y/o la neovascularización tumoral y también

el suministro de al menos otro agente terapéutico en combinación con aquélla. Los radionucleidos emisores de radiación alfa como se definen en las reivindicaciones son muy eficaces en esta realización porque su alcance es corto y se minimiza el daño al tejido sano circundante. Los ejemplos de enfermedades que se pueden beneficiar particularmente de esta realización de la invención son aquéllas que causan tumores sólidos, tales como el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el melanoma maligno, el cáncer de ovario, el cáncer de colon, los sarcomas y los tumores de la próstata.

Otra realización de la invención se refiere a una composición para uso en el tratamiento de cánceres localmente diseminados, tales como, por ejemplo, tumores hepáticos, o enfermedades peritoneal o intracranealmente confinadas. Especial y preferiblemente, este tratamiento puede ser aplicado por medio de inyecciones o infusiones loco-regionales de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente o una composición citotóxicos de acuerdo con la invención a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

Aún otra realización de la invención es una composición para uso en el tratamiento de cánceres localmente diseminados, tales como tumores hepáticos, por medio de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación líquida que comprende un agente citotóxico de la invención a un sujeto que necesita dicho tratamiento, especialmente al aporte sanguíneo a la zona u órgano afectados de dicho sujeto, por ejemplo, al aporte sanguíneo al hígado en el caso de un tumor hepático. Esto puede promover el transporte del agente/composición al tumor.

Otra realización de la invención se refiere a una composición para uso en el tratamiento de un cáncer sistémicamente diseminado, mediante la inyección o infusión intravenosa, u otra administración sistémica, de una cantidad terapéuticamente eficaz de una preparación farmacéutica que comprende un agente citotóxico de acuerdo con la invención a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

Otra realización de la invención se refiere a una composición para uso en el tratamiento de tumores intracavitarios, en donde se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente citotóxico de la presente invención a un sujeto que necesita dicho tratamiento mediante, por ejemplo, inyección o infusión en la cavidad afectada por el tumor y se retiene allí durante un periodo suficiente para obtener un efecto terapéutico sobre las superficies de la cavidad. Dichas cavidades incluyen la cavidad craneal, la cavidad peritoneal y cavidades creadas por derrame pericárdico y mesotelioma, y la administración es adecuada para cánceres tales como cánceres intracraneales, cánceres intraperitoneales y cánceres localizados en las cavidades creadas por derrame pericárdico y mesotelioma.

En otra realización, la presente invención proporciona el uso de un agente citotóxico de la invención como un tratamiento local, regional y/o sistémico complementario después de otros métodos de terapia, particularmente la irradiación con un haz externo y particularmente la cirugía. En esta realización, el agente citotóxico se puede administrar con objeto de ayudar a eliminar toda célula morbosas restante que no haya sido matada por otros métodos o no haya sido extirpada por cirugía. En particular, cuando se reseca un tumor sólido de una cavidad corporal, se pueden tratar el sitio de fijación del tumor y/o la(s) superficie(s) de la cavidad con objeto de reducir el riesgo de que queden células morbosas. Esto sería una realización de tratamiento local, en donde el agente citotóxico se formularía como un líquido, un gel, una crema, un ungüento, una tintura, un producto pulverizable o similar para aplicación directa durante el procedimiento quirúrgico. En esta realización, es muy preferido un gel, una crema, un ungüento o una tintura, especialmente un gel. Alternativamente (o además), los agentes citotóxicos pueden ser administrados a la cavidad después de una cirugía, mediante, por ejemplo, inyección o infusión intracavitarias, para alcanzar un efecto similar de esterilización posquirúrgica.

En el caso de una enfermedad metastásica conocida, sospechosa o, si no, indicada, los agentes de la presente invención se pueden aplicar sistémicamente en combinación con resección quirúrgica u otro tratamiento del tumor primario. En tales casos, los agentes de la invención se formularán generalmente en forma de líquidos aptos para inyección y/o infusión, adecuados para administración a la corriente sanguínea.

Como se indicó anteriormente, en aplicaciones apropiadas los agentes de la presente invención pueden ser formulados como composiciones farmacéuticas en forma de líquidos aptos para inyección y/o infusión (opcionalmente para dilución antes de la administración), como cremas, geles, parches solubles o insolubles, pastas, tinturas, ungüentos, productos pulverizables, gases absorbibles o no absorbibles impregnadas y otras formulaciones adecuadas conocidas por quien tiene una experiencia normal en la técnica. Dichas composiciones comprenderán deseable mente al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente tolerable, tal como agua para inyección, disolución salina estéril, tampones, agentes espesativos, colorantes, estabilizantes, agentes ajustadores del pH, agentes modificadores de la viscosidad, agentes modificadores de la tonicidad, sales, azúcares, soportes físicos y otros agentes bien conocidos por el técnico experto. Las composiciones se pueden administrar mediante cualquier método adecuado, tal como infusión por medio de un catéter, inyección por medio de un dispositivo estándar de aguja y jeringa o de una jeringa sin aguja, o aplicación directa de una formulación local, tal como por pulverización, aplicación de tintura, etcétera.

En una realización preferida de la invención, los agentes citotóxicos descritos en esta memoria se administran como parte de un régimen de tratamiento que comprende al menos tres fases:

- a) Administración de liposomas que comprenden al menos un agente formador de imágenes o potenciador de imágenes para evaluar por ello la distribución de liposomas y el posible direccionamiento tumoral;
- 5 b) Pretratamiento con al menos una dosis de liposomas no radiactivos para reducir por ello la acumulación en el hígado/sistema reticuloendotelial (SRE); y
- c) Al menos una administración de un agente citotóxico de la presente invención.

10 En general, las operaciones a), b) y c) se llevarán a cabo en ese orden, aunque los liposomas de la operación a) pueden también servir como el pretratamiento de la operación b), en cuyo caso estas operaciones se realizan simultáneamente y el pretratamiento de la operación b) se puede llevar a cabo antes de la operación a) de formación de imágenes... Se deja preferiblemente un periodo de 12 horas a 10 días, preferiblemente de 24 horas a 7 días, más preferiblemente de 2 a 6 días, entre la operación b) de pretratamiento y la operación c) de administración. Preferiblemente, los liposomas de las operaciones a) y c) comprenderán esencialmente el mismo lípido o la misma mezcla lipídica en proporciones esencialmente iguales y tendrán esencialmente el mismo tamaño medio y la misma 15 distribución de tamaños para que la distribución de liposomas en la operación a) refleje exactamente la distribución terapéutica en la operación c). En una realización muy preferida, los liposomas de la operación b) llevarán al menos un agente terapéutico distinto de un radionucleido emisor de radiación alfa. Particularmente en esta realización, es preferible que los liposomas de la operación b) tengan también unas características similares a los de las operaciones a) y c), como se discutió anteriormente.

20 El anterior método puede ser potenciado mediante una o más repeticiones del método completo y/o de las operaciones b) y c).

En una alternativa al método anterior, por ejemplo cuando no se requiere visualización mediante el uso de liposomas, se pueden usar las operaciones b) y c) del método anterior sin, o independientemente de, la operación a). Las operaciones b) y c) proporcionan un método de administración muy preferido para los agentes citotóxicos de 25 la presente invención ya que de este modo se puede controlar la incorporación a ciertos tejidos no diana, tales como el hígado. Un método preferido es administrar liposomas que contienen el "otro" agente terapéutico pero no el emisor de radiación alfa en la operación b) y administrar luego el correspondiente agente citotóxico en la operación c) en un periodo de tiempo posterior, como se describió anteriormente.

30 La presente invención proporciona un método para la síntesis de liposomas que encierran una disolución que comprende al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o emisor indirecto de radiación alfa como se define en las reivindicaciones y al menos otro agente terapéutico que es doxorubicina. Este método comprende poner liposomas que encierran una disolución que comprende al menos un agente terapéutico (doxorubicina) distinto de un radionucleido emisor de radiación alfa, en contacto con una disolución que comprende al menos un ionóforo y al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o emisor indirecto de radiación alfa como se define en las 35 reivindicaciones. Preferiblemente, el método de la invención es un método para la formación de un agente citotóxico de la invención como el descrito en esta memoria. Los liposomas son preferiblemente como se describieron anteriormente en esta memoria y contendrán preferiblemente al menos un agente quelante además del al menos otro agente terapéutico.

40 En un método alternativo de la invención, el otro agente terapéutico que es doxorubicina puede ser cargado en el liposoma después de, y/o simultáneamente con, la carga del radionucleido en el liposoma. Cuando la carga es simultánea, ésta puede ser durante la formación/reformación de los liposomas o puede ser una vez que se han generado los liposomas.

45 El método de la presente invención puede comprender poner liposomas que encierran una disolución que comprende al menos un agente terapéutico (doxorubicina) distinto de un radionucleido emisor de radiación alfa y al menos un quelante (que puede ser un ionóforo, como se describió anteriormente), en contacto con una "disolución de carga" que comprende al menos un ionóforo y al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o emisor indirecto de radiación alfa como se define en las reivindicaciones. Alternativamente, la concentración total de quelante puede ser proporcionada por transporte desde la disolución de carga a través de la membrana del liposoma.

50 El contacto de los liposomas con la disolución de carga se lleva preferiblemente a cabo a una temperatura superior a la temperatura fisiológica. De este modo, esta temperatura es preferiblemente alrededor de 45-90 °C, más preferiblemente alrededor de 50-80 °C, y lo más preferiblemente alrededor de 60-75 °C. Además, el ionóforo puede ser preferiblemente seleccionado de modo que sea capaz de transportar el radionucleido metálico pesado a través de la membrana del liposoma a una temperatura elevada (como la descrita) pero no a una temperatura fisiológica 55 y/o ambiental y/o de almacenamiento refrigerado. La selección de un ionóforo adecuado para este aspecto

5 dependerá del (de los) lípido(s) usado(s) en los liposomas y se puede realizar mediante un ensayo rutinario de eficacia de carga en el método de la invención y de estabilidad de carga a temperaturas fisiológicas/ambientales/de almacenamiento refrigerado. Esto será fácilmente llevado a cabo por quien tiene una experiencia normal en la técnica, quien apreciará que el número y la naturaleza de los grupos hidrófobos del ionóforo se relacionan con la facilidad con que la molécula puede cruzar la membrana lipídica.

10 El método de la presente invención puede comprender además la operación de formar liposomas que contengan dicho al menos un agente terapéutico (doxorubicina) distinto de un radioisótopo emisor de radiación alfa, antes del contacto con la disolución de carga. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica y pueden ser empleados para obtener cualquier combinación deseada de agentes activos y/o quelantes y/o otros agentes como los indicados en esta memoria. Alternativamente, los liposomas que contienen ciertos agentes terapéuticos están comercialmente disponibles con pureza farmacéutica y pueden ser empleados como material de partida en este sentido.

Durante, o después de, la formación de los liposomas y/o después de su contacto con la disolución de carga, los liposomas pueden ser superficialmente funcionalizados y/o superficialmente modificados para obtener unas deseables características de permanencia y/o direccionamiento como las descritas en esta memoria.

15 Se prefiere que todas las operaciones de formación y funcionalización de los liposomas se lleven a cabo antes de su carga con radionucleido emisor de radiación alfa. De este modo, los liposomas pueden ser producidos eficazmente a escala relativamente grande y ser almacenados, si es necesario durante periodos superiores a varias semividas del radionucleido emisor de radiación alfa. Estos liposomas pre-preparados (que forman un elemento preferido de un kit de la invención, como se describe en esta memoria) pueden ser luego cargados con radionucleido relativamente poco antes de la administración. De esta manera, un laboratorio puede mantener una reserva del componente liposómico y generar el radionucleido según se requiera para una carga sencilla mediante el método de la invención. Esto proporciona una considerable ventaja al permitir el uso rutinario de radionucleidos alfa de vida relativamente corta en terapia de combinación, sin dificultad y sin extensas operaciones de preparación cada vez que se requiera un lote. En esta realización del método de la invención, se pone un ionóforo en contacto con una muestra fresca de un adecuado radionucleido emisor de radiación alfa (como se describe en esta memoria) para formar por ello una disolución de dicho ionóforo y dicho radionucleido alfa. Esta disolución es luego puesta en contacto con liposomas adecuados de acuerdo con el método de la invención, como se describe en esta memoria.

20 También se describe un kit para la formación de un agente citotóxico que comprende liposomas, en donde dichos liposomas encierran una disolución que comprende al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o emisor indirecto de radiación alfa como se define en las reivindicaciones y al menos otro agente terapéutico que es doxorubicina, kit que comprende:

liposomas que encapsulan una disolución que comprende dicho al menos otro agente terapéutico (doxorubicina) y preferiblemente al menos un agente quelante, estando preferiblemente dichos liposomas en forma de una suspensión acuosa;

35 dicho al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o emisor indirecto de radiación alfa, como se define en las reivindicaciones; y

un ionóforo, *preferiblemente* en forma de una disolución.

Opcionalmente, los kits descritos en el contexto de la presente invención también comprenden otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y/o medios para la administración del agente citotóxico y/o instrucciones para la formación de agentes citotóxicos de la presente invención.

40 Puesto que los agentes citotóxicos de la invención pueden ser simplemente generados a partir de liposomas pre-preparados adecuados mediante el método de la invención, en un aspecto más se describe en esta memoria un kit que comprende:

45 liposomas, opcional y preferiblemente precargados con una disolución que comprende al menos un agente terapéutico distinto de un radionucleido emisor de radiación alfa, que es doxorubicina, y preferiblemente al menos un agente quelante, estando preferiblemente dichos liposomas en forma de una suspensión acuosa;

un ionóforo, preferiblemente en forma de una disolución; y

50 opcional y preferiblemente, instrucciones para cargar dichos liposomas para generar por ello un agente citotóxico de la presente invención, instrucciones que indican lo más preferiblemente que el ionóforo debe ser puesto en contacto con una muestra fresca de radionucleido alfa o emisor indirecto de radiación alfa como se define en las reivindicaciones para formar por ello una disolución de dicho ionóforo y dicho radionucleido alfa o emisor indirecto de radiación alfa, y, posterior o simultáneamente, que la disolución así generada debe ser puesta en contacto con dichos liposomas.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

#### Preparación del radionucleido

5 Se produjo radio-223 a partir de  $^{227}\text{Ac}$  ( $t_{1/2} = 21$  años) y  $^{227}\text{Th}$  ( $t_{1/2} = 18,7$  días) de acuerdo con el método previamente presentado de Henriksen [Henriksen et al., *Radiochim. Acta* **89**, 661-666 (2001)]. En resumen, se separó el  $^{223}\text{Ra}$  de los actínidos  $^{227}\text{Ac}$  y  $^{227}\text{Th}$  mediante el uso de una resina para actínidos seguida de cromatografía de intercambio catiónico y filtración a través de un filtro estéril (Millex GV 0,22 mm, Millipore Carrigtwohill Co., Irlanda).

#### Ejemplo 1 – Carga de $^{223}\text{Ra}$ en liposomas

10 1.1. Se sometió doxorubicina liposómica (Caelyx<sup>®</sup>, Schering Plough AS, Eiksmarka, Noruega), correspondiente a 2 mg de doxorubicina por ml, a intercambio de tampón con un tampón que contenía HEPES 20 mM y sacarosa 300 mM, se ajustó el pH a a 7-8 con NaOH, y se concentró 3 veces mediante un cartucho (Millipore UFV2BTK10, membrana 30 KNMWL, volumen máximo de 15 ml, Millipore, Bedford, Illinois, EE.UU.) para concentración en centrífuga insertado en una centrífuga Eppendorf 5810R (Eppendorf, Alemania) hecha funcionar a 20 °C con una fuerza centrífuga relativa de 1400. Se disolvió ionóforo de calcio (Ca-ionóforo, Calcimycin, Sigma, St. Louis, Michigan, EE.UU.) en cloroformo, en una concentración de 1 mg por ml. Se añadieron aproximadamente 15 ml a un vial de 2 ml de capacidad y se evaporó el cloroformo en una corriente de argón para generar una película delgada de Ca-ionóforo sobre la superficie interna del vial. La disolución de  $^{223}\text{Ra}$  fue diluida en una disolución de sacarosa (300 mM) y HEPES (20 mM).

20 Se precalentó el vial a 60 °C y se añadieron 200 ml de Caelyx concentrado. La mezcla de carga fue sacudida durante 45 minutos en una termomezcladora (Eppendorf, Alemania), lo que fue seguido de la adición de 200 ml de una disolución 10 mM de EDTA. Después de 5-10 minutos de sacudimiento adicional, se transfirió la mezcla a una columna de Sephadex G-25 PD-10 y se realizó la elución con una disolución de NaCl al 0,9%. La fracción que contenía liposoma tenía un color rojo visible y fue recogida y añadida a 10% de un Medio Eagle Modificado de Dulbecco 10' (Sigma, Michigan, EE.UU.). Posteriormente, dentro de una campana estéril, los liposomas fueron esterilizados por filtración a través de un filtro estéril de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex GV 0,22  $\mu\text{m}$ , Millipore Carrigtwohill Co., Irlanda) en un vial de 10 ml de capacidad que fue posteriormente tapado con una tapa de metal/goma.

25 El vial fue almacenado durante al menos tres horas para que se alcanzara el equilibrio entre el  $^{223}\text{Ra}$  y los nucleidos hijos antes de que se llevara a cabo la cuantificación de la radiactividad usando un calibrador de dosis Capintec, que fue calibrado para la serie del  $^{223}\text{Ra}$  en equilibrio con nucleidos hijos.

#### 30 1.2. Rendimiento de la carga

La cantidad de  $^{223}\text{Ra}$  cargado en los liposomas Caelyx<sup>®</sup> fue del orden de 51 a 67% para tres experimentos individuales. Un experimento testigo en que se usó  $^{223}\text{Ra}$  y liposomas bajo condiciones idénticas salvo por la ausencia de ionóforo mostró menos del 1% del  $^{223}\text{Ra}$  en la fracción de liposomas eluida de la columna de Sephadex G-25.

#### 35 Ejemplo 2 – Estudio con animales

Se prepararon 10 ratones desnudos con xenoinjertos de osteosarcoma OHS. Cada ratón fue tratado subcutáneamente con una dosis de 375 kBq/kg de  $^{223}\text{Ra}$  encapsulado en liposomas Caelyx<sup>®</sup> preparados como en el Ejemplo 1.

40 Después de 1 hora, un día y cuatro días, se sacrificaron tres, tres y cuatro animales, respectivamente, y se midió la distribución tisular de material radiactivo.

La distribución de radionucleido fue también comparada con un testigo al cual se administró el radio como una sal en una disolución de liposomas, pero no encapsulado por ellas.

#### Resultados

45 Los datos indican que el aclaramiento sanguíneo de radiactividad es consistente con lo que era el aclaramiento esperado para este tipo de liposomas. La incorporación hepática parecía ser relativamente pequeña para el periodo completo estudiado, aunque había una incorporación significativa al bazo. La incorporación al esqueleto, como viene reflejada por la actividad en el fémur y el cráneo, fue aumentando con el tiempo, probablemente a causa de un lento catabolismo de liposomas que causa la liberación de  $^{223}\text{Ra}$ .

50 Hubo una clara diferencia entre las distribuciones a lo largo del tiempo para las dos formas de  $^{223}\text{Ra}$ . Esta diferencia fue particularmente elevada en la sangre, en parte a causa del lento aclaramiento de los liposomas de la sangre y en

parte a causa del rápido aclaramiento del  $^{223}\text{Ra}$  libre. Para la mayor parte de los tejidos blandos, la retención de la forma liposómica fue significativamente elevada.

5 La incorporación de la forma liposómica al tumor fue inicialmente moderada a causa de la baja vascularización en este modelo de tumor, pero aumentó con el tiempo. La retención en el tumor fue mayor que en la mayor parte de los otros tejidos blandos (Tabla 3 y Figura 1).

Conclusión: el  $^{223}\text{Ra}$  administrado como una terapia de combinación liposómica con doxorubicina presentaba una relevante biodistribución en ratones desnudos.

Tabla 3

Muestra	Punto temporal 1		Punto temporal 2		Punto temporal 3	
	1 hora	Desv. estánd.	24 horas	Desv. estánd.	96 horas	Desv. estánd.
Orina	14,79	12,53	4,30	1,60	1,25	1,17
Sangre	29,65	1,98	8,36	3,00	0,72	0,27
Pulmones*	9,86	2,35	2,62	0,95	0,51	0,09
Corazón*	3,95	0,09	1,28	0,47	0,15	0,07
Hígado*	3,18	0,70	1,18	0,33	0,24	0,07
Bazo*	12,11	0,93	17,31	1,37	15,13	5,37
Riñón*	12,12	0,38	5,29	1,06	1,64	0,52
Estómago*	1,72	0,32	2,14	0,90	0,49	0,18
Intestino delgado*	2,66	0,33	2,01	0,65	0,23	0,13
Intestino grueso*	1,02	0,09	2,19	0,40	0,47	0,24
Fémur*	4,96	0,96	10,74	3,01	13,93	1,68
Músculo	0,64	0,10	0,45	0,10	0,30	0,17
Cerebro	0,69	0,11	0,11	0,08	0,05	0,07
Cráneo*	3,86	0,49	8,32	1,43	9,51	2,46
Piel	1,98	0,26	3,65	0,87	1,13	0,40
Tumor 1	1,54	0,04	2,31	0,69	0,91	0,14
Tumor 2	1,51	0,17	5,49	2,73	2,36	2,20

#### 10 Ejemplo 3 – Biodistribución y aclaramiento con pretratamiento

Para los Ejemplos 3 y 4, se utilizaron ratones Balb/C normales de ambos sexos (de aproximadamente 12 semanas de edad y que pesaban 18-25 g) y también los liposomas cargados producidos de acuerdo con el Ejemplo 1. El protocolo de investigación fue de acuerdo con el Convenio Europeo para la Protección de Animales Vertebrados usados con Fines Experimentales y Científicos (ETS 123), publicado por el Consejo de Europa y aprobado por la  
 15 Autoridad Noruega para Investigación con Animales. Los ratones fueron alojados bajo condiciones estándares y tenían acceso a alimento y agua *ad libitum*.

#### Optimización del pretratamiento

20 Antes de la inyección de  $^{223}\text{Ra}$  liposómico, los ratones fueron pretratados con liposomas de doxorubicina (Caelyx<sup>®</sup>) para reducir la incorporación del producto por el sistema reticuloendotelial (SRE). Antes del experimento principal de aclaramiento sanguíneo y biodistribución, se llevó a cabo un estudio de optimización para determinar un intervalo de tiempo favorable entre el pretratamiento y el tratamiento principal. En el estudio de optimización, los ratones fueron divididos en 4 grupos diferentes, con una hembra y un macho de ratón en cada grupo.

25 Los grupos 1 y 2 recibieron un pretratamiento con liposomas de doxorubicina (8,1 mg/kg) por inyección intravenosa, cuatro días y un día antes, respectivamente, del tratamiento principal con  $^{223}\text{Ra}$  liposómico (500 kBq de  $^{223}\text{Ra}$ /kg y 0,9 mg de liposomas de doxorubicina/kg). El grupo 3 recibió simultáneamente el pretratamiento y el tratamiento, y el grupo 4 no tuvo pretratamiento.

Cuatro horas después del tratamiento, se extrajo sangre por punción cardíaca bajo anestesia (halotano), antes de la eutanasia. Se midió la radiactividad en sangre, orina, heces y diferentes tejidos en un sistema multidetector Crystal II



(Packard Inst. Co. Inc., Downers Grove, Illinois, EE.UU.) y se comparó con mediciones de patrones de inyección del producto de ensayo.

En la Figura 2 se presentan los datos del estudio de optimización. Se alcanzó una relación mejorada de <sup>223</sup>Ra liposómico en "sangre a hígado" en los animales pretratados cuatro días por adelantado con 8,1 mg de Caelyx® por kg, frente a los animales que recibieron el pretratamiento un día por adelantado, recibieron simultáneamente las inyecciones o no recibieron pretratamiento con Caelyx®. Basándose en estos resultados, se adoptó un programa de pretratamiento de cuatro días para el estudio principal.

Ejemplo 4 – Ulterior estudio de biodistribución con pretratamiento

Después del Ejemplo 3, se llevó a cabo un estudio de biodistribución más amplio usando el intervalo de pretratamiento/tratamiento de cuatro días, lo que facilitaba la mayor relación del <sup>223</sup>Ra liposómico en sangre/hígado.

En el estudio principal, los ratones fueron divididos en cuatro grupos diferentes. Cada grupo consistía en 6-7 animales de ambos sexos. En cada grupo, seis ratones recibieron un pretratamiento intravenoso con liposomas de doxorubicina (8,1 mg/kg) cuatro días antes del tratamiento principal con 375 kBq de <sup>223</sup>Ra/kg y 0,9 mg de liposomas de doxorubicina intravenosos/kg. En cada uno de los grupos dos, tres y cuatro, se dejó un ratón sin tratar y se utilizó para medir la posible reabsorción del producto de las heces o el lecho.

Se extrajo sangre, se sacrificaron los ratones y se llevaron a cabo las mediciones de radiactividad de la misma manera que en el Ejemplo 3, 1 hora, 24 horas, 6 días y 14 días después de la inyección para los respectivos grupos de ratones.

Para estudiar la diferencia entre el <sup>223</sup>Ra liposómicamente encapsulado y el libre, se inyectó intravenosamente <sup>223</sup>RaCl disuelto a un grupo de ratones. Se sacrificaron cinco animales en cada uno de los puntos temporales 1 hora, 24 horas y 14 días después de la inyección, se extrajeron muestras tisulares y se determinó la radiactividad por unidad de peso del modo descrito para el estudio sobre el <sup>223</sup>Ra liposómico. Se calcularon los índices de localización (LI; del inglés, localization indices) para el <sup>223</sup>Ra liposómico frente al libre en un tejido mediante la ecuación siguiente: LI = [% de la dosis inyectada/g para el <sup>223</sup>Ra liposómico]/[% de la dosis inyectada/g para el <sup>223</sup>Ra libre].

En la Tabla 4 y las Figuras 3 y 4 se presentan los datos del estudio principal de biodistribución. El aclaramiento sanguíneo de radiactividad (Figura 3) es consistente con el aclaramiento esperado para este tipo de liposomas, que indica que los liposomas no son destruidos por el bombardeo de la irradiación alfa.

Tabla 4 – Porcentaje de la dosis inyectada para el <sup>223</sup>Ra liposómico por gramo de tejido<sup>a</sup> en ratones Balb/C (estudio principal) en cuatro puntos temporales diferentes

Tejido	1 hora	24 horas	6 días	14 días
Sangre (Sa)	30,51 ± 3,19	17,21 ± 1,88	1,08 ± 0,77	0,05 ± 0,02
Pulmón (Pu)	11,89 ± 2,17	8,37 ± 1,63	1,29 ± 0,58	0,19 ± 0,10
Corazón (Co)	3,85 ± 2,54	2,85 ± 0,59	0,38 ± 0,25	ND <sup>b</sup>
Hígado (Hi)	4,59 ± 0,8	3,19 ± 0,37	0,53 ± 0,07	0,17 ± 0,04
Bazo (Ba)	13,78 ± 2,32	32,36 ± 7,04	42,46 ± 16,92	29,47 ± 12,16
Riñón (Ri)	17,41 ± 2,34	9,07 ± 0,87	3,11 ± 0,82	0,53 ± 0,39
Estómago (Es)	1,90 ± 0,29	2,50 ± 0,52	0,88 ± 0,24	0,32 ± 0,12
Intestino delgado (ID)	2,22 ± 0,25	2,12 ± 0,24	0,39 ± 0,12	0,06 ± 0,02
Intestino grueso (Co)	1,27 ± 0,20	2,97 ± 1,04	0,63 ± 0,11	0,09 ± 0,04
Músculo (Mu)	0,61 ± 0,13	0,46 ± 0,15	0,26 ± 0,14	0,18 ± 0,15
Cerebro (Ce)	0,71 ± 0,21	0,42 ± 0,15	ND	ND
Cráneo (Cr)	4,31 ± 1,55	6,38 ± 1,25	15,05 ± 4,56	12,38 ± 3,57
Fémur (Fe)	5,82 ± 1,73	7,63 ± 0,74	15,63 ± 3,90	16,99 ± 3,85
Piel	0,69 ± 0,55	1,96 ± 1,14	ND	ND

<sup>a</sup>Media ± desviación estándar, n = 5-6 animales

<sup>b</sup>ND = no determinado (a causa de unas bajas cuentas de actividad frente a cuentas de fondo)

Entre los tejidos blandos, la mayor incorporación por órgano se observó en el hígado (Figura 4). Por otra parte, parecía que la incorporación hepática ajustada al peso era relativamente pequeña para el periodo completo

5 estudiado, mientras que había una incorporación significativa al bazo cuando los datos se presentan como % de la dosis inyectada por gramo (Tabla 4). La incorporación al esqueleto, como viene reflejada por la actividad en el fémur y el cráneo, fue creciendo con el tiempo, probablemente a causa de un lento catabolismo de liposomas que causa la liberación de  $^{223}\text{Ra}$ . Aunque podría esperarse que los liposomas tuvieran cierta incorporación a la médula ósea, que está presente en el fémur, la incorporación al cráneo, que no contiene una cantidad significativa de médula ósea, indica que la mayor parte de la incorporación ósea proviene de radio libre. Se debe advertir que la diferencia de incorporación al fémur frente al cráneo también se observó con el radio catiónico y no refleja necesariamente una acumulación en la médula ósea.

10 En la Figura 5 se presentan los índices de localización (LI) en varios tejidos para radio liposómico frente a radio catiónico 1 hora, 24 horas y 14 días después de la inyección. Se observaron claras diferencias entre las dos formas de  $^{223}\text{Ra}$ . El LI es particularmente elevado para la sangre, en parte a causa del lento aclaramiento del radio liposómico de la sangre y en parte a causa del rápido aclaramiento del  $^{223}\text{Ra}$  libre. Además, para la mayoría de los tejidos blandos, los Lis son significativamente elevados. Los Lis de las muestras óseas fueron inferiores a 1, lo que indica un control significativo de la biodistribución por la formulación liposómica, suprimiéndose el natural comportamiento del radio como un compuesto análogo de calcio y un buscador de huesos.

15 La semivida ( $T_{1/2}$ ) de la formulación liposómica que circulaba por la sangre fue superior a 24 horas, mientras que la semivida del  $^{223}\text{Ra}$  catiónico simple en sangre fue muy inferior a 1 hora.

#### Ejemplo 5 – Estudio ulterior de direccionamiento tumoral

20 Estudio ulterior de liposomas pegilados doblemente cargados para dirigirse a tumores sólidos explotando las propiedades de pérdida capilar de la neovasculatura tumoral. La finalidad del estudio fue investigar las propiedades de distribución y de direccionamiento tumoral del emisor de partículas alfa  $^{223}\text{Ra}$ , encapsulado en liposomas que contienen doxorubicina (Caelyx<sup>®</sup>/Doxil<sup>®</sup>).

25 Se administró Caelyx<sup>®</sup> antes de la inyección de  $^{223}\text{Ra}$  liposómico para reducir la incorporación al sistema reticuloendotelial, como se optimizó en el Ejemplo 3. Se evaluaron la distribución y la incorporación tumoral en un modelo de ratón con xenoinjerto de osteosarcoma humano y en un perro con osteosarcoma espontáneo.

El aclaramiento sanguíneo de la terapia de combinación fue relativamente lento;  $t_{1/2}$  fue ~ 28 horas en los ratones (ratones BalbC) y  $t_{1/2}$  fue ~ 39 horas en el perro. En los ratones, parecía que la incorporación al hígado era relativamente baja en contraste con la incorporación al bazo, donde había una incorporación significativa. En el perro, las incorporaciones tanto al hígado como al bazo fueron moderadas.

30 En general, en el modelo de xenoinjerto había una mayor retención de actividad en el tumor que en el tejido blando. En el perro, la incorporación a las 24 horas era considerablemente mayor en las metástasis tumorales tanto calcificadas como no calcificadas de diferentes órganos que en tejido normal.

35 La terapia de combinación con  $^{223}\text{Ra}$  liposómico presentaba una biodistribución y un aclaramiento sanguíneo relevantes en cuanto al direccionamiento tumoral y, en particular, mostraba una relación favorable de tumor/tejido normal en un perro con osteosarcoma espontáneo.

## REIVINDICACIONES

- 1) Un agente citotóxico que comprende liposomas, en donde dichos liposomas encierran una disolución que comprende al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o al menos un emisor indirecto de radiación alfa que se desintegra por emisión beta para formar un emisor alfa, y al menos otro agente terapéutico, en donde dicho agente terapéutico es doxorubicina, en donde tanto el al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o el al menos un emisor indirecto de radiación alfa como el al menos otro agente terapéutico son citotóxicos, y en donde dicho radionucleido emisor de radiación alfa o dicho emisor indirecto de radiación alfa es al menos uno de  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  y  $^{227}\text{Th}$ .
- 2) Un agente citotóxico según la Reivindicación 1, en donde los liposomas también encierran al menos un ionóforo.
- 3) Un agente citotóxico según la Reivindicación 1 o 2, en donde los liposomas también encierran al menos un agente quelante o complejante.
- 4) Un agente citotóxico según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho radionucleido emisor de radiación alfa o dicho emisor indirecto de radiación alfa y/o la doxorubicina están presentes por debajo de la dosis mínima normalmente requerida para una eficacia terapéutica, profiláctica y/o paliativa cuando se utilizan como una única terapia.
- 5) Un agente citotóxico según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho radionucleido emisor de radiación alfa o dicho emisor indirecto de radiación alfa y la doxorubicina presentes son sinérgicos en cuanto a sus dosificaciones y/o efectos secundarios.
- 6) Un agente citotóxico según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en donde dichos liposomas comprenden al menos un lípido que tiene una temperatura de transición termotrópica de 10-50 °C.
- 7) Un método para la síntesis de un agente citotóxico según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, método que comprende poner liposomas que encierran una disolución que comprende al menos un agente terapéutico distinto de un radionucleido emisor de radiación alfa o un emisor indirecto de radiación alfa, en contacto con una disolución de carga que comprende al menos un ionóforo y al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o al menos un emisor indirecto de radiación alfa, en donde dicho agente terapéutico es doxorubicina, en donde tanto el al menos un radionucleido emisor de radiación alfa o el al menos un emisor indirecto de radiación alfa como el al menos otro agente terapéutico son citotóxicos, y en donde dicho radionucleido emisor de radiación alfa o dicho emisor indirecto de radiación alfa es al menos uno de  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  y  $^{227}\text{Th}$ .
- 8) Un método según la Reivindicación 7, en donde dicha puesta en contacto se lleva a cabo a una temperatura por encima de la fisiológica.
- 9) Una composición farmacéutica que comprende al menos un agente citotóxico según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 y al menos un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente tolerables.
- 10) Un agente citotóxico según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 para uso en terapia.
- 11) Uso de un agente citotóxico según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 en la fabricación de un medicamento para uso en un método de tratamiento de una enfermedad hiperplásica o neoplásica.
- 12) El uso según la Reivindicación 11, en donde dicho tratamiento comprende la administración de dicho medicamento por inyección o infusión sistémica o intratumoral.
- 13) El uso según la Reivindicación 11, en donde dicho tratamiento comprende la administración de dicho medicamento por aplicación directa a al menos una parte de una cavidad corporal después de la resección de al menos una parte de un tumor sólido.
- 14) El uso según la Reivindicación 11 o la Reivindicación 12, en donde dicho tratamiento comprende la administración previa de al menos una dosis de liposomas no radiactivos, preferiblemente de 12 horas a 10 días antes de la administración de dicho agente citotóxico.

Distribución de radio-223 en terapia liposómica de combinación

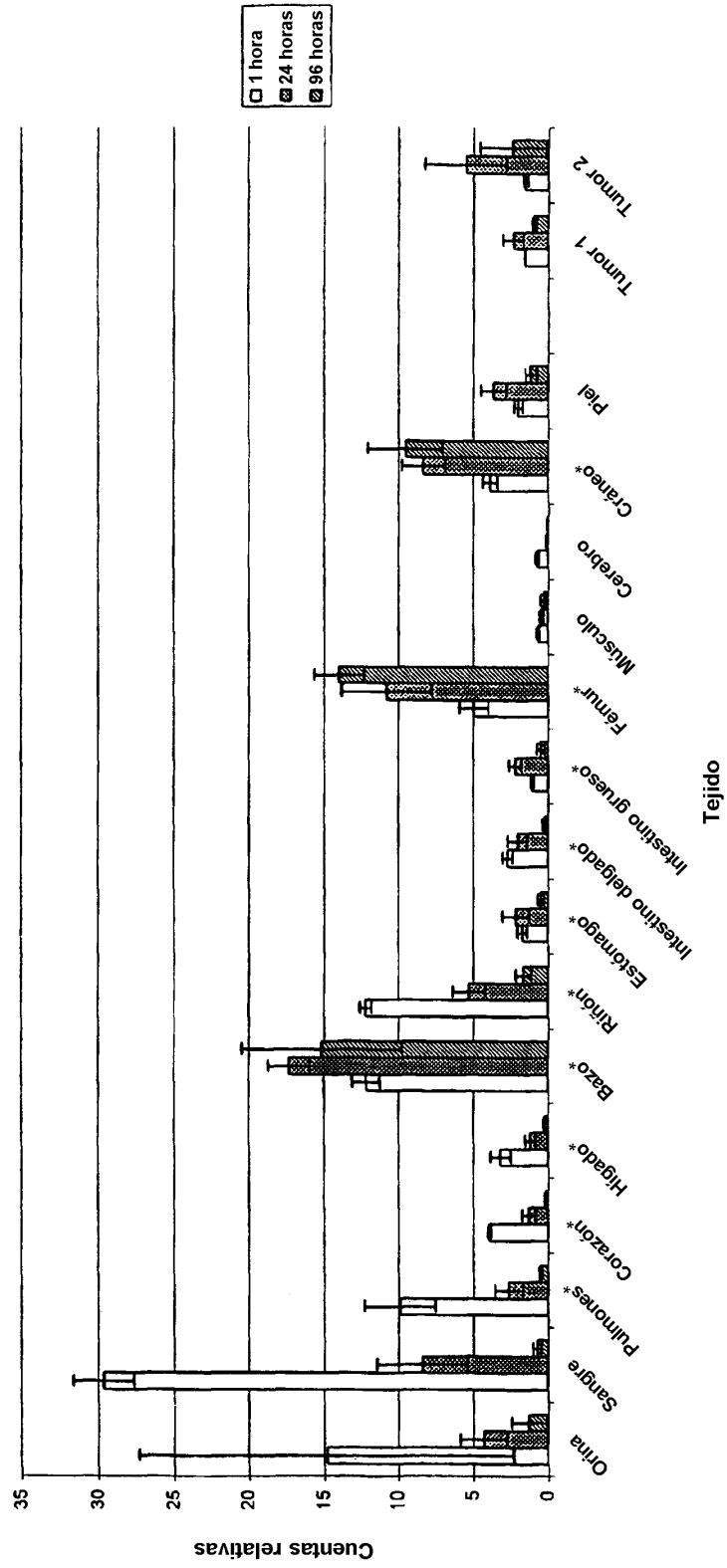


FIG. 1

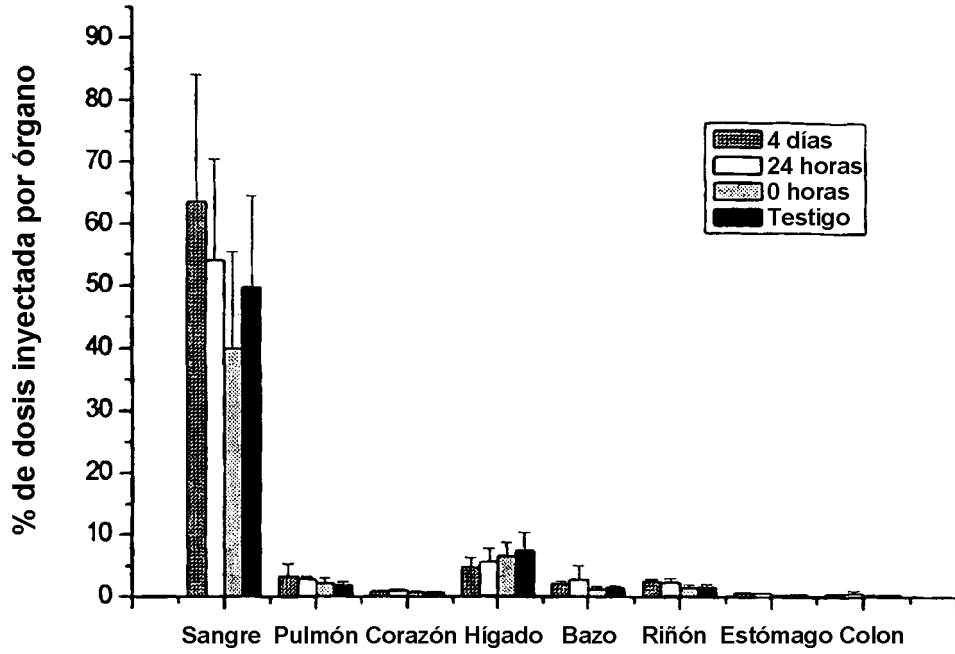


FIG. 2

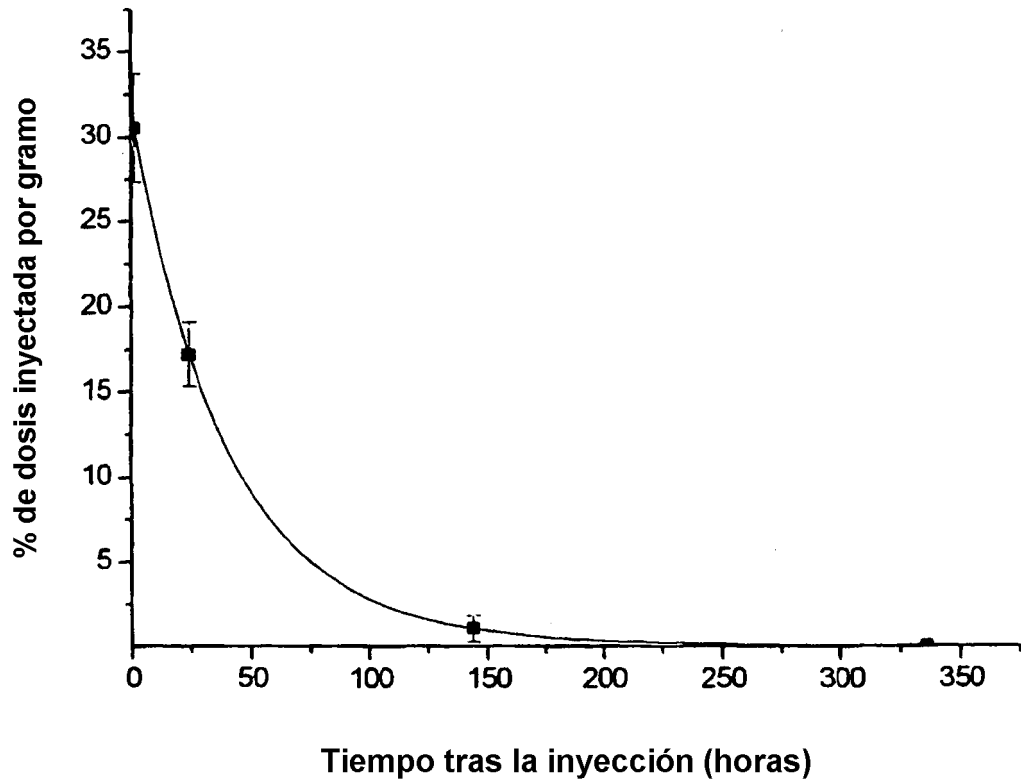


FIG. 3

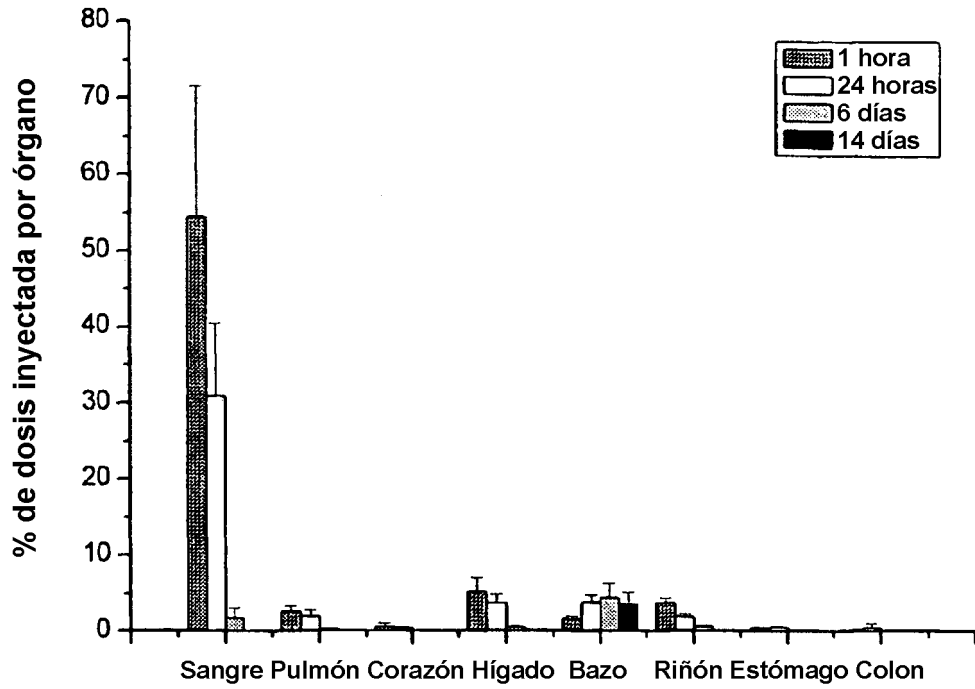


FIG. 4

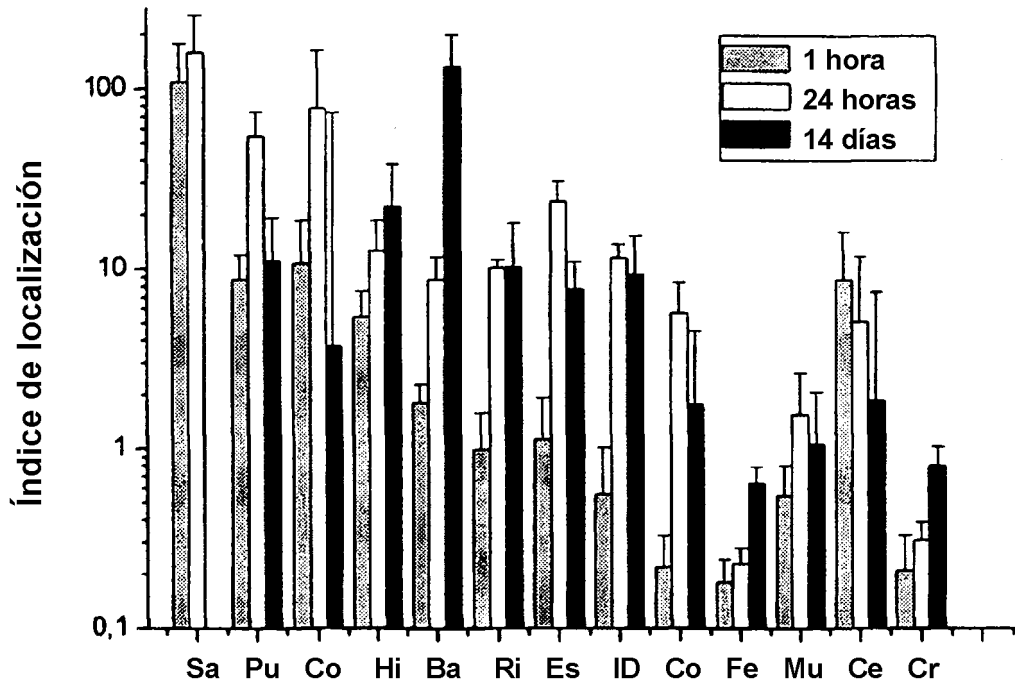


FIG. 5