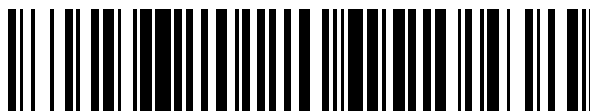


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 590**

51 Int. Cl.:

A61K 31/513 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
A61K 31/4412 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2009 E 09706367 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2246056**

54 Título: **Agente para aumentar el efecto antitumoral que comprende una preparación de liposoma de oxaliplatino y agente antitumoral que comprende la preparación de liposoma**

30 Prioridad:

30.01.2008 JP 2008019141
01.12.2008 JP 2008306072

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2014

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF TOKUSHIMA (50.0%)
24, Shinkura-cho 2-chome, Tokushima-shi
Tokushima 770-8501, JP y
TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

ISHIDA, TATSUHIRO y
KIWADA, HIROSHI

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 500 590 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

Agente para aumentar el efecto antitumoral que comprende una preparación de liposoma de oxaliplatino y agente antitumoral que comprende la preparación de liposoma.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un agente para aumentar el efecto antitumoral que comprende una preparación de liposoma de oxaliplatino. La presente invención se refiere además a un agente antitumoral que comprende la preparación de liposoma.

Antecedentes de la técnica

Hasta el momento se han desarrollado y utilizado en el campo médico muchos agentes anticancerosos. Por ejemplo, el tegafur es un agente anticanceroso que resulta activado *in vivo* y que libera gradualmente la forma activa, es decir, 5-fluorouracilo (en adelante denominado "5-FU"), reduciendo de esta manera la toxicidad o los efectos secundarios presentados por el 5-FU. Un fármaco de combinación que contenga los tres agentes farmacéuticos tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico (nombre comercial: TS-1, proporción molar de tegafur/gimeracilo/oteracilo potasio=1:0,4:1, fabricado por Taiho Pharmaceutical Co., Ltd., este fármaco de combinación se denomina en adelante TS-1) presenta un efecto antitumoral más fuerte debido a que el gimeracilo inhibe la degradación del 5-FU. En esta preparación, debido a que el oteracilo potásico inhibe específicamente la aparición de la toxicidad gastrointestinal probablemente acompañada por la potenciación del efecto antitumoral conseguido por los dos agentes farmacéuticos, es decir, el tegafur y el gimeracilo, se incrementa de esta manera el efecto terapéutico. Por lo tanto, TS-1 contribuye al tratamiento de diversos tumores malignos (documento de patente nº 1).

Sin embargo, todavía se considera necesario descubrir agentes y métodos terapéuticos que presenten efectos terapéuticos más fuertes y resulten suficientes para prolongar la supervivencia de los pacientes de cáncer. Se ha intentado la administración de quimioterapia de combinación de diversos agentes (terapia de combinación) cuyo mecanismo de acción de efecto antitumoral y/o efectos secundarios sean diferentes, con el fin de mejorar el efecto terapéutico y algunas terapias de combinación contribuyen realmente a la mejora del tratamiento del cáncer (ver, por ejemplo, los documentos de patente nº 2, 3 y 4). Por ejemplo, el oxaliplatino muestra un efecto antitumoral reducido al utilizarlo solo y por lo tanto se utiliza en combinación con otros agentes farmacéuticos. La terapia de combinación con 5-fluorouracilo y folinato (en adelante el folinato se denomina LV) (FOLFOX) se utiliza comúnmente en todo el mundo (ver, por ejemplo, los documentos no de patente nº 1, 2 y 3). Sin embargo, la aplicación de FOLFOX es complicada y los periodos prolongados de 5-FU mediante infusión reduce la CdV del paciente debido a las restricciones físicas que acompañan a la infusión intravenosa continua, además de los elevados costes médicos. Por lo tanto, se están realizando desarrollos de mejores terapias de combinación con oxaliplatino en todo el mundo. A título de ejemplo, se informa de que una terapia de combinación de oxaliplatino y capecitabina (nombre comercial: Xeloda), que es una pirimidina fluorada oral (XELOX), proporciona un efecto antitumoral prácticamente idéntico a FOLFOX (ver, por ejemplo, el documento no de patente nº 4). Como nuevo enfoque se ha indicado que TS-1 y oxaliplatino proporcionan un efecto antitumoral notable, tal como en este caso, que presenta una eficacia terapéutica superior al caso de oxaliplatino en combinación con capecitabina (documento de patente nº 5). Sin embargo, todavía se requiere un efecto terapéutico más potente.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el oxaliplatino muestra un efecto antitumoral reducido en el caso de que se utilice individualmente y uno de los motivos es una baja acumulación del agente en el tejido tumoral. Al administrar un agente antitumoral, puede desaparecer rápidamente de la circulación sanguínea o distribuirse a órganos sanos; por lo tanto, el agente antitumoral no se acumula en el tejido tumoral eficazmente. Por lo tanto, muchos agentes antitumorales no siempre pueden mostrar una actividad antitumoral suficiente y con frecuencia afectan indeseablemente a tejidos normales (efectos secundarios), causando toxicidad crítica. El incremento de la eficacia de los agentes antitumorales es un importante objetivo en las quimioterapias actuales del cáncer y se desea fuertemente el desarrollo de un sistema de administración de fármaco (SAF) mediante el cual los fármacos puedan acumularse eficazmente en el tumor.

El liposoma es una vesícula cerrada que comprende fosfolípidos, que proceden de material biológico como componente principal. Por lo tanto, los liposomas muestran bajas toxicidad y antigenicidad al administrarlos en un cuerpo vivo. Además, algunos informes indican que el encapsulado de fármacos en liposomas permite el control de su estabilidad en la sangre y la distribución biológica, resultando en una eficiencia de administración mejorada de su carga en los tejidos diana (documentos de patente nº 6, 7 y 8 y documento no de patente nº 5). También es conocido que algunas vesículas, tales como el liposoma, que presenta un tamaño de partícula de entre 100 y 200 nm, se acumulan eficazmente en el tumor debido a que los vasos angiogénicos presentes en el tumor muestran una permeabilidad relativamente elevada en comparación con los vasos sanguíneos en el tejido sano (documento no de patente nº 6). El documento nº WO 2007/099377 da a conocer oxaliplatino encapsulado en un liposoma y métodos para la preparación del mismo.

Documento de patente nº 1: patente japonesa nº 2614164.

Documento de patente nº 2: patente japonesa nº 2557303.
Documento de patente nº 3: publicación de patente japonesa no examinada nº 1996-169825.
Documento de patente nº 4: publicación de patente japonesa no examinada nº 2002-205945.
Documento de patente nº 5: WO2005/120480.
5 Documento de patente nº 6: WO95/24201.
Documento de patente nº 7: patente japonesa nº 3415131.
Documento de patente nº 8: publicación de patente japonesa no examinada nº 2006-248978.
Documento no de patente nº 1: Journal of Clinical Oncology 22:23-30, 2004.
Documento no de patente nº 2: Journal of Clinical Oncology 21:2059-2069, 2003.
10 Documento no de patente nº 3: Journal of Clinical Oncology 18:2938-2947, 2000.
Documento no de patente nº 4: Journal of Clinical Oncology 22:2084-2091, 2004.
Documento no de patente nº 5: Journal of Liposome Research 4:667-687, 1994.
Documento no de patente nº 6: Drug Delivery System 14:433-447, 1999.

15 **Exposición de la invención**

Problema que debe resolver la invención

20 Un objetivo principal de la invención es aumentar el efecto antitumoral de un fármaco de combinación que comprende tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico sin incrementar la toxicidad. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un agente y un kit antitumorales que muestran un efecto antitumoral más elevado que un agente antitumoral que comprende tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico en combinación con oxaliplatino.

Medios para resolver el problema

25 A partir del estado actual de la técnica descrito anteriormente, se realizó una investigación exhaustiva para desarrollar un método para tratar el cáncer, que contribuye fuertemente a prolongar la supervivencia de los pacientes. Como resultado, se ha desarrollado un liposoma que contiene 1-OHP, que es una preparación de liposoma que encapsula establemente un complejo de platino, el cis-oxalato (1R,2R-diaminociclohexano) de platino
30 (II) (nombre genérico: oxaliplatino; nombre comercial: Eloxatin o Elplat, en adelante denominado 1-OHP) y que presenta un tamaño de partícula convenientemente ajustado. Los efectos antitumorales de un fármaco de combinación que comprende tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico pueden mejorarse notablemente mediante la combinación con liposomas que contienen 1-OHP, sin incrementar los efectos secundarios. La presente invención se ha llevado a cabo basándose en estos nuevos resultados.

35 En particular, la presente invención proporciona un potenciador del efecto antitumoral, un agente antitumoral, un kit de agente antitumoral, etc., tal como se indica a continuación.

40 Ítem 1. Un agente antitumoral que comprende en combinación una preparación de liposoma que encapsula oxaliplatino en un liposoma y un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.

Ítem 2. El agente antitumoral según el Ítem 1, en el que por lo menos un componente lipídico que constituye el liposoma es fosfolípido.

45 Ítem 3. El agente antitumoral según el Ítem 2, en el que la superficie de membrana del liposoma se ha modificado con polietilenglicol, poliglicerina o lípido catiónico.

50 Ítem 4. El agente antitumoral según cualquiera de los Ítems 1 a 3, en el que el oxaliplatino se utiliza en una proporción de entre 0,1 y 5 moles por cada mol de tegafur.

Ítem 5. El agente antitumoral según el Ítem 1, en el que el gimeracilo se utiliza en una proporción de entre 0,1 y 5 moles por cada mol de tegafur, y el oteracilo potásico se utiliza en una proporción de entre 0,1 y 5 moles por cada mol de tegafur en el fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.

55 Ítem 6. El agente antitumoral según el Ítem 1, en el que el agente antitumoral se forma como kit que comprende una preparación de liposoma que contiene oxaliplatino y un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.

60 Ítem 7. El agente antitumoral según el Ítem 1, en el que la preparación de liposoma se administra por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea, y el fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico se administra por vía oral.

65 Ítem 8. Una preparación de liposoma obtenible mediante encapsulado de oxaliplatino en un liposoma para la utilización como agente antitumoral con un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.

Ítem 9. La preparación de liposoma según el Ítem 8, en la que por lo menos un componente lipídico que constituye el liposoma es fosfolípido.

5 Ítem 10. La preparación de liposoma según el Ítem 9, en la que la superficie de membrana del liposoma se ha modificado con polietilenglicol, poliglicerina o lípido catiónico.

Ítem 11. La preparación de liposoma según cualquiera de los Ítems 8 a 10, en la que el oxaliplatino se utiliza en una proporción de entre 0,1 y 5 moles por cada mol de tegafur.

10 Ítem 12. La preparación de liposoma según el Ítem 8, en la que el gimeracilo se utiliza en una proporción de entre 0,1 y 5 moles por cada mol de tegafur, y el oteracilo potásico se utiliza en una proporción de entre 0,1 y 5 moles por cada mol de tegafur, en el fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.

15 Ítem 13. Utilización de una preparación de liposoma obtenible mediante encapsulado de oxaliplatino en un liposoma, y un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico para la producción de un agente antitumoral.

20 Ítem 14. Utilización de una preparación de liposoma que contiene oxaliplatino encapsulado en un liposoma para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer con un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico, en el que debe administrarse en un paciente de cáncer una dosis eficaz de la preparación de liposoma y una dosis eficaz del fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.

25 Ítem 15. Un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico y una preparación de liposoma que contiene oxaliplatino encapsulado en un liposoma para la utilización en el tratamiento del cáncer, en el que debe administrarse en un paciente de cáncer una dosis eficaz de la preparación de liposoma y del fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.

30 Ítem 16. El agente antitumoral según cualquiera de los ítems 1 a 7, la preparación de liposoma según cualquiera de los ítems 8 a 12, la utilización de una preparación de liposoma según el ítem 13 ó 14, o el fármaco de combinación del ítem 15, en el que la preparación de liposoma debe administrarse separada o conjuntamente con el fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo u oteracilo potásico.

35 **Efecto de la invención**

El potenciador del efecto antitumoral de la presente invención puede aumentar el efecto antitumoral de un fármaco de combinación que contiene los tres agentes farmacéuticos tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico, es que es un agente antitumoral conocido, sin incrementar la toxicidad, en comparación con el caso en que se utilice 1-OHP en combinación. De acuerdo con lo anterior, el agente antitumoral y el kit de agente antitumoral de la presente invención consiguen un efecto notable, es decir, muestran un efecto antitumoral que es superior a una terapia de combinación en la que un fármaco de combinación que contiene los tres agentes farmacéuticos tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico se utiliza en combinación con 1-OHP, sin incrementar simultáneamente el nivel de toxicidad. Se espera que la presente invención se aplique en un método terapéutico para prolongar adicionalmente la supervivencia de los pacientes de cáncer.

45 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un gráfico que muestra los incrementos de volúmenes tumorales relativos en el Ejemplo de ensayo 1.

50 La figura 2 es un gráfico que muestra los cambios de peso corporal de los ratones en el Ejemplo de ensayo 1.

La figura 3 es un gráfico que muestra los incrementos de volúmenes tumorales relativos en el Ejemplo de ensayo 2.

55 La figura 4 es un gráfico que muestra los cambios de peso corporal de los ratones en el Ejemplo de ensayo 2.

La figura 5 es un gráfico que muestra la supervivencia de ratones en los días después de la inoculación celular en el Ejemplo de ensayo 3.

60 La figura 6 es un gráfico que muestra la supervivencia de ratones en los días después de la inoculación celular en el Ejemplo de ensayo 4.

La figura 7 es un gráfico que muestra los incrementos en los volúmenes tumorales relativos en el Ejemplo de ensayo 5.

65 La figura 8 es un gráfico que muestra los incrementos en los volúmenes tumorales relativos en el Ejemplo de ensayo 6.

La figura 9 es un gráfico que muestra los incrementos en el peso corporal de los ratones en el Ejemplo de ensayo 6.

La figura 10 es un gráfico que muestra la supervivencia de los ratones en los días después de la inoculación celular en el Ejemplo de ensayo 7.

Mejor modo de poner en práctica la invención

(1) Potenciador del efecto antitumoral

La presente invención proporciona un potenciador del efecto antitumoral para aumentar la actividad antitumoral de una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco de combinación que contiene cantidades terapéuticamente eficaces de tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico. El potenciador del efecto antitumoral se prepara en forma de preparación de liposoma obtenible mediante encapsulado de una cantidad terapéuticamente eficaz de oxaliplatino (1-OHP) para mejorar el efecto antitumoral en un liposoma que está compuesto de por lo menos un componente lipídico.

(1-1) Preparación de liposomas

1-OHP

El 1-OHP es un compuesto conocido de complejo de platino. El 1-OHP se une al ADN en las células cancerosas y después induce la interrupción de la función del ADN y la rotura de las cadenas de ADN, resultando en que este agente ejerce un efecto citotóxico sobre las células de cáncer. El 1-OHP puede ser producido según métodos conocidos, por ejemplo el método dado a conocer en la publicación de patente japonesa no examinada nº 1985-41077.

Liposoma

El liposoma utilizado en la preparación de liposoma de la presente invención es una vesícula que se forma mediante dispersión de fosfolípidos, que es un componente principal de la membrana celular, en agua y que presenta una fase acuosa interna circundada por membranas lipídicas. Los liposomas pueden clasificarse en tres categorías según el tamaño de partícula y el número de capas de lípido: una vesícula multilamelar: MLV; una vesícula unilamelar grande: LUV; y una vesícula unilamelar pequeña: SUV. En la presente invención puede utilizarse cualquier tipo de liposoma. Se requiere que el liposoma utilizado en la presente invención presente una forma estable antes y después de la administración en el cuerpo. Entre los ejemplos de los fosfolípidos que forman los liposomas se incluyen la fosfatidilcolina de yema de huevo purificada hidrogenada (temperatura de transición de fases: 50°C, en adelante denominada HEPC), fosfatidilcolina de soja refinada hidrogenada (temperatura de transición de fases: aproximadamente 55°C, en adelante denominada HSPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (temperatura de transición de fases: aproximadamente 41°C, en adelante denominada DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (temperatura de transición de fases: aproximadamente 58°C, en adelante denominada DSPC) y 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (temperatura de transición de fases: -3°C). Entre ellas, resultan preferidas HEPC, HSPC, DPPC y DSPC.

En la presente memoria, la fosfatidilcolina de yema de huevo purificada hidrogenada se obtiene mediante hidrogenación de la fosfatidilcolina obtenida de yema de huevo. Un ejemplo de fosfatidilcolina de yema de huevo purificada hidrogenada utilizada en una forma de realización preferida comprende, como componente principal, fosfatidilcolina de la que la fracción acilo es un grupo acilo C₁₆₋₁₈ derivada de ácido graso de cadena lineal saturada. En la presente invención, la fosfatidilcolina de yema de huevo purificada hidrogenada se obtiene mediante purificación de fosfatidilcolina yema de huevo hidrogenada y, por ejemplo, son utilizables las que presentan una pureza no inferior a 80%, y preferentemente las que presentan una pureza no inferior a 90%.

En la presente memoria, la fosfatidilcolina de soja hidrogenada se obtiene mediante la hidrogenación de la fosfatidilcolina derivada de la soja. Un ejemplo de fosfatidilcolina de soja hidrogenada utilizada en una forma de realización preferida comprende, como componente principal, fosfatidilcolina de la cual la fracción acilo es un grupo acilo C₁₆₋₁₈ derivado de un ácido graso de cadena lineal saturado. En la presente invención, la fosfatidilcolina de soja refinada hidrogenada se obtiene mediante refinado de fosfatidilcolina de soja hidrogenada y, por ejemplo, son utilizables las que presentan una pureza no inferior a 80%, y preferentemente las que presentan una pureza no inferior a 90%.

Dichos fosfolípidos pueden utilizarse individualmente o en una combinación de dos o más. Mediante la utilización de fosfolípidos con diferentes temperaturas de transición de fases, puede modificarse la fluidez de la membrana lipídica bimolecular del liposoma. Lo anterior permite la selección del fosfolípido más adecuado en vista de la tasa de encapsulado, la estabilidad en una preparación farmacéutica y la dinámica *in vivo* tras la administración y similares.

Además de dichos fosfolípidos, el liposoma utilizado en la presente invención preferentemente se mezcla con un estabilizador, tal como un colesterol del que se informa que mejora la estabilidad del liposoma o su derivado.

Además, la estabilidad en sangre, la distribución en los tejidos, la traducibilidad en tejido tumoral y similares del liposoma pueden mejorarse adicionalmente mediante la modificación de la superficie de membrana del liposoma, en caso necesario con un ligando seleccionado de entre polietilenglicol, poliglicerina o un material de elevada polimerización hidrófilo similar; un lípido que contiene un grupo amino, grupo amidino, grupo guanidino o grupo funcional básico similar (en adelante denominado lípido cationizado), o un péptido, lectina, anticuerpo, sacárido, glucoproteína, glucolípido o similar.

En la presente invención, "polietilenglicol" incluye no sólo polietilenglicoles no sustituidos sino también derivados en los que la cadena lateral oleofílica (hidrófoba) ha establecido un enlace covalente. Entre los ejemplos específicos de cadenas laterales oleofílicas se incluyen las cadenas alquilo, los fosfolípidos y el colesterol. En la presente invención pueden utilizarse diversos derivados de polietilenglicol que se utilizan ordinariamente para mejorar la estabilidad del liposoma. De manera similar, la "poliglicerina" de la presente invención incluye no sólo poliglicerina no sustituida sino también derivados en los que la cadena lateral oleofílica (hidrófoba) ha establecido un enlace covalente. Entre los ejemplos específicos de la cadena lateral oleofílica se incluyen las cadenas alquilo, los fosfolípidos y el colesterol. En la presente invención pueden utilizarse diversos derivados de poliglicerina que se utilizan ordinariamente para mejorar la estabilidad del liposoma. Además, puede añadirse glicerol, glucosa, cloruro sódico o similares a modo de agente isotónico. Además, también pueden añadirse parabenos, clorobutanol, alcohol bencílico, propilenglicol y conservantes similares.

Preparación de liposomas

La preparación de liposoma de la presente invención puede producirse mediante un método conocido. Entre los ejemplos de métodos conocidos para producir una preparación de liposoma se incluyen un método de evaporación de fase inversa (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4194, 1978, documento WO97/48398), el método de congelación-descongelación (Arch. Biochem. Biophys. 212:186, 1981), el método del gradiente de pH (Biochem. Biophys. Acta 816:294, 1985, publicación de patente japonesa no examinada 1995-165560) y similares.

Entre dichos métodos, en el caso de que se utilice el método de evaporación de fase inversa, la preparación de liposoma de la presente invención se produce mediante el procedimiento siguiente. Por ejemplo, se disuelve un componente lipídico en cloroformo, éter, etanol o un solvente similar, y la disolución resultante se introduce en un matraz en forma de pera. Se elimina el solvente mediante evaporación bajo presión reducida, formando una película delgada de lípido. A continuación, se añade un líquido mixto que contiene cloroformo y éter dietílico en una proporción de cloroformo/éter dietílico=1/2 para disolver la película delgada. Se añade a lo anterior una solución acuosa que contiene el agente activo y la mezcla se sonica a 25°C durante 15 minutos para obtener una emulsión. Se elimina la fase orgánica de la emulsión resultante para transferir una emulsión w/o a una emulsión o/w mediante evaporación en un evaporador giratorio durante una hora, bajo agitación simultánea con vórtex. De esta manera se forman liposomas y se encapsula el agente farmacéutico en los mismos. El procedimiento descrito anteriormente permite encapsular el agente farmacéutico en los liposomas.

Se ha informado de que el tamaño de partícula del liposoma afecta fuertemente a la distribución biológica y acumulación en el tumor de su carga (Biol. Pharm. Bull. 17:935, 1994). En la presente invención, preferentemente se realiza una separación de las partículas según tamaño con el fin de obtener liposomas deseables y de tamaño uniforme que contengan un agente farmacéutico en el interior de los mismos. Por ejemplo, llevando a cabo un tratamiento supersónico utilizando un biodisruptor (fabricado por Nippon Seiki Co., Ltd., etc.) o una emulsificación a alta presión utilizando un nanomizador (fabricado por Yoshida Kikai Co., Ltd.), etc., el tamaño de partícula del liposoma puede ajustarse para que presente un diámetro de partícula medio de entre aproximadamente 100 nm y 200 nm. Alternativamente, sometiendo la solución que contiene liposomas a separación según tamaño bajo presión de nitrógeno utilizando diversos filtros de membrana de policarbonato (0,4 µm, 0,2 µm, 0,1 µm y 0,08 µm), puede ajustarse el tamaño de partícula del liposoma para que presente un diámetro de partícula medio de entre aproximadamente 100 nm y 300 nm.

En la presente invención, la expresión "diámetro de partícula medio" se refiere a un diámetro de partícula medio medido mediante un método de dispersión lumínica utilizando un analizador de partículas submicrométricas NICOMP 370 HPL (fabricado por Particle Sizing System, Inc.).

La estabilidad en sangre, la distribución en los tejidos y la localización en el tumor del liposoma pueden mejorarse adicionalmente mediante la modificación de la superficie de membrana del liposoma, en caso necesario, con polietilenglicol, poliglicerina, lípido cationizado o un ligando, tal como péptido, lectina, anticuerpo, sacárido, glucoproteína o glucolípido.

La preparación de liposoma de la presente invención también puede producirse mediante un método del documento de patente nº 7 (patente japonesa 3415131) o el documento de patente nº 8 (publicación de patente japonesa no examinada 2006-248978), que da a conocer preparaciones de liposomas de oxaliplatino (1-OHP).

En una forma de realización preferida, la preparación de liposoma de la presente invención se produce utilizando una solución que se obtiene disolviendo 1-OHP en una solución de 1% a 10% de glucosa de manera que la concentración de 1-OHP es de entre 1 y 20 mg/ml, como la solución de 1-OHP.

5 La preparación de liposoma que contiene 1-OHP obtenida de esta manera se somete, en caso necesario, a ultracentrifugación, filtración en gel, ultrafiltración y diálisis. Estos tratamientos pueden llevarse a cabo convenientemente de manera individual o en combinación, eliminando de esta manera los agentes farmacéuticos que no han sido encapsulados en el liposoma.

10 La preparación de liposoma que contiene 1-OHP obtenida mediante el método anteriormente indicado puede utilizarse directamente. Sin embargo, debido al tiempo de almacenamiento, condiciones, etc., la preparación de liposoma que contiene 1-OHP puede liofilizarse tras la adición de excipientes tales como manitol, trehalosa, lactosa y glicina. Alternativamente, la preparación de liposoma que contiene 1-OHP puede crioconservarse tras añadir agentes crioconservantes tales como el glicerol.

15 En una forma de realización preferida, la preparación de liposoma de 1-OHP contiene oxaliplatino en una cantidad de entre 1 y 50 µg/mg de lípido, y preferentemente de entre 5 y 40 µg/mg de lípido.

20 La preparación de liposoma que contiene 1-OHP de la presente invención presenta un diámetro de partícula medio de entre preferentemente 50 y 300 nm, y más preferentemente de entre 80 y 200 nm.

La preparación de liposoma que contiene 1-OHP generalmente se suspende o se diluye con una solución acuosa fisiológicamente aceptable y después se utiliza como preparación inyectable (preparación administrada por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea); sin embargo, la preparación de liposoma que contiene 1-OHP también puede utilizarse a modo de preparación oral, gotas nasales, inhalante, supositorio, preparación absorbida percutáneamente, preparación absorbida por vía permucosal, etc. En este caso, la preparación de liposoma que contiene 1-OHP se forma en una composición de preparación utilizando vehículos apropiados siguiendo un método ordinario. Los vehículos utilizables en la presente memoria son los utilizados comúnmente en las preparaciones farmacéuticas convencionales. Entre los ejemplos específicos de los mismos se incluyen excipientes, ligantes, desintegrantes, lubricantes, agentes colorantes, potenciadores del sabor, saborizantes, surfactantes, etc.

Los ejemplos del fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico, del que puede potenciarse el efecto antitumoral con el potenciador del efecto antitumoral de la presente invención, se describen posteriormente.

(1-2) Fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico

Tegafur

40 El tegafur (nombre genérico, nombre químico: 5-fluoro-1-(2-tetrahydrofuril)-2,4-(1H,3H)-pirimidín-diona) es un compuesto conocido que se activa *in vivo* para liberar 5-FU, es decir, una forma activa para ejercer una actividad antitumoral. El tegafur puede producirse según métodos conocidos, por ejemplo el método dado a conocer en la publicación de patente japonesa examinada nº 1974-10510.

Gimeracilo

45 El gimeracilo (nombre genérico, nombre químico: 2,4-dihidroxi-5-cloropiridina) también es un compuesto conocido y no muestra ninguna actividad antitumoral por sí mismo. Sin embargo, puede inhibir la inactivación metabólica del 5-FU *in vivo*, resultando en un efecto antitumoral incrementado del 5-FU.

Oteracilo potasio

50 El oteracilo potásico (nombre genérico, nombre químico: 1,2,3,4-tetrahydro-2,4-dioxo-1,3,5-triazín-6-carboxilto monopotasio) también es un compuesto conocido. Aunque no muestra ninguna actividad antitumoral por sí mismo, permanece mayoritariamente en el tracto gastrointestinal e inhibe la activación del 5-FU en el mismo, evitando de esta manera los trastornos del tracto gastrointestinal causados por el 5-FU.

60 Con respecto al fármaco de combinación que contiene tres ingredientes, es decir, tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico, a modo de principios activos, la proporción de cada principio activo puede encontrarse dentro de los intervalos indicados en relación a un agente farmacéutico conocido tal como, por ejemplo, el dado a conocer en la publicación de patente nº 2614164. La proporción habitualmente es tal que por cada mol de tegafur, se utiliza gimeracilo en una proporción de entre aproximadamente 0,1 y 5 moles y preferentemente de entre aproximadamente 0,2 y 1,5 moles, y se utiliza oteracilo potásico en una proporción de entre aproximadamente 0,1 y 5 moles y preferentemente de entre aproximadamente 0,2 y 2 moles. Una proporción particularmente preferida de los tres ingredientes es tegafur:gimeracilo:oteracilo potasio=1:0,4:1 en proporción molar.

El fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico como principios activos puede prepararse en una forma farmacéutica que comprende dos o más agentes farmacéuticos, cada uno de los cuales contiene uno de los principios activos, o cada uno de los cuales contiene los principios activos en cualquier combinación, o en una forma farmacéutica que comprende un único agente farmacéutico que contiene todos los principios activos. En cualquier caso, dichos fármacos de combinación se preparan como composiciones farmacéuticas siguiendo métodos ordinarios utilizando los vehículos farmacéuticos adecuados. Los vehículos utilizables en la presente memoria son los utilizados comúnmente en las preparaciones farmacéuticas convencionales, por ejemplo excipientes, ligantes, desintegrantes, lubricantes, colorantes, potenciadores del sabor, saborizantes, surfactantes, etc.

En el caso de que se utilice un fármaco de combinación en una forma farmacéutica que comprende dos o más agentes farmacéuticos, cada agente farmacéutico debe administrarse concurrentemente, o puede administrarse un agente farmacéutico en cualquier tiempo antes o después de la administración del otro u otros agentes farmacéuticos. Preferentemente la totalidad de los agentes farmacéuticos se administra concurrentemente, o se administra un agente farmacéutico en las 4 horas, y más preferentemente en las 2 horas, anteriores o posteriores a la administración del otro u otros agentes farmacéuticos.

(1-3) Método de administración

El potenciador del efecto antitumoral anteriormente indicado (es decir, la preparación de liposoma que contiene 1-OHP) puede administrarse separadamente o conjuntamente con un fármaco de combinación que contiene tres ingredientes: tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico, como principios activos, que se ha preparado en una forma de dosificación unitaria. Más concretamente, el potenciador del efecto antitumoral de la presente invención puede administrarse conjuntamente o en cualquier tiempo antes o después de la administración de los agentes antitumorales que contienen los tres ingredientes, es decir, tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico, como principios activos. Preferentemente, el potenciador del efecto antitumoral se administra conjuntamente o en las 4 horas anteriores o posteriores a la administración de la preparación antitumoral, y preferentemente en las 2 horas anteriores o posteriores a la administración de la preparación antitumoral. En el caso de que se administre continuamente, la frecuencia e intervalos de administración del agente antitumoral y del potenciador del efecto antitumoral deben seleccionarse convenientemente.

En el caso de que la preparación de liposoma que contienen 1-OHP se administre conjunta o separadamente de la preparación antitumoral que contiene los tres principios activos de tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico, el potenciador del efecto antitumoral preferentemente se administra en una cantidad de manera que la cantidad de 1-OHP por cada mol de tegafur se encuentre comprendida dentro del intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 5 moles, preferentemente de entre aproximadamente 0,1 y 3 moles, y más preferentemente de entre aproximadamente 0,2 y 2 moles.

(2) Agente antitumoral

La presente invención proporciona un agente antitumoral que comprende un fármaco de combinación que contiene los tres principios activos tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico, en combinación con un potenciador del efecto antitumoral (la preparación de liposoma que contienen 1-OHP). El agente antitumoral puede encontrarse en una preparación farmacéutica que comprende una pluralidad de agentes farmacéuticos cada uno de los cuales contiene uno de los cuatro ingredientes anteriormente indicados, es decir, los tres ingredientes indicados anteriormente y los liposomas que contienen 1-OHP, o cada uno de los cuales contiene dichos ingredientes en cualquier combinación o en una forma farmacéutica que comprende un único agente farmacéutico que contiene la totalidad de los ingredientes. Más concretamente, el agente antitumoral de la presente invención puede formarse en una forma de dosificación individual que contiene la totalidad de los cuatro ingredientes anteriormente indicados, o una forma de dosificación múltiple que comprende un agente farmacéutico que contiene 1 a 3 ingredientes y uno o más agentes farmacéuticos que contienen el resto de los ingredientes. Un ejemplo particularmente preferido es una preparación en 2 partes en la que un agente farmacéutico que contiene los tres ingredientes tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico, como principios activos, y se encuentra presente un agente farmacéutico que contiene 1-OHP encapsulado en una preparación de liposoma en forma de formulación separada.

Con respecto a la preparación antitumoral, la proporción de los ingredientes no se encuentra limitada, con independencia de si está compuesta de un único agente farmacéutico o múltiples agentes farmacéuticos. Habitualmente, por cada mol de tegafur, se utiliza gimeracilo en una proporción de entre aproximadamente 0,1 y 5 moles y preferentemente de entre aproximadamente 0,2 y 1,5 moles; se utiliza oteracilo potásico en una proporción de entre aproximadamente 0,1 y 5 moles y preferentemente de entre aproximadamente 0,2 y 2 moles, y se utiliza 1-OHP en una proporción de entre aproximadamente 0,1 y 5 moles, preferentemente de entre aproximadamente 0,1 y 3 moles, y más preferentemente de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 2 moles. En particular, una proporción molar preferida de los ingredientes es tegafur:gimeracilo:oteracilo potasio:1-OHP=aproximadamente 1:0,4:1:0,1 a 5, más preferentemente de aproximadamente 1:0,4:1:0,1 a 3, y particularmente preferentemente de aproximadamente 1:0,4:1:0,2 a 2. En el caso de que la preparación antitumoral sea una forma de dosificación en 2

partes en la que se encuentra presente un agente farmacéutico que contiene los tres ingredientes tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico como principios activos, y liposomas que contienen 1-OHP, en forma de formulaciones separadas tal como se ha indicado anteriormente, los agentes antitumorales contienen preferentemente un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico en una proporción molar de 1:0,4:1, y una preparación farmacéutica que contiene, por cada mol de tegafur, 1-OHP en una proporción de entre aproximadamente 0,1 y 5 moles, preferentemente de entre aproximadamente 0,1 y 3 moles, y más preferentemente de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 2 moles.

Los principios activos pueden prepararse en forma de composiciones farmacéuticas siguiendo métodos estándares utilizando portadores farmacéuticos adecuados. Los portadores utilizables en la presente memoria son los utilizados comúnmente en preparaciones farmacéuticas convencionales, por ejemplo excipientes, ligantes, desintegrantes, lubricantes, colorantes, potenciadores del sabor, saborizantes, surfactantes, etc.

En el caso de que se utilice una preparación antitumoral que presenta una forma de múltiple dosis y comprende dos o más agentes farmacéuticos tal como se ha indicado anteriormente, cada agente farmacéutico puede administrarse concurrentemente, o cada agente farmacéutico puede administrarse en cualquier tiempo antes o después de la administración del otro u otros agentes farmacéuticos. Preferentemente, la totalidad de los agentes farmacéuticos se administra concurrentemente, o se administra un agente farmacéutico en las 4 horas, y más preferentemente en las 2 horas, anteriores o posteriores a la administración de los otros agentes farmacéuticos.

(3) Kit

La presente invención proporciona un kit que comprende la preparación de liposoma que contiene 1-OHP con un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico. Más particularmente, la presente invención proporciona un kit para el tratamiento del cáncer en mamíferos, que comprende:

(a) una composición antitumoral que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de tegafur, una cantidad eficaz de gimeracilo para potenciar un efecto antitumoral y una cantidad eficaz de oteracilo potásico para inhibir los efectos secundarios, y

(b) una preparación de liposoma que encapsula una cantidad eficaz de 1-OHP para potenciar un efecto antitumoral.

Las composiciones contenidas en dicho kit pueden encontrarse en cualquier forma farmacéutica conocida. Las composiciones habitualmente se introducen en cualesquier recipientes comúnmente utilizados según su forma farmacéutica.

El kit se utiliza para el tratamiento del cáncer de mamífero y comprende:

(i) tegafur en una cantidad terapéuticamente eficaz,

(ii) gimeracilo en una cantidad eficaz para potenciar un efecto antitumoral,

(iii) oteracilo potásico en una cantidad eficaz para inhibir los efectos secundarios, siendo todos ellos parte de una composición antitumoral, y

(iv) liposomas que contienen 1-OHP en una cantidad eficaz para potenciar un efecto antitumoral.

El kit comprende por lo menos 2 recipientes para dichos ingredientes, y tegafur y 1-OHP se empaquetan en recipientes separados. Los ingredientes (i) a (iv) anteriormente indicados preferentemente se encuentran en una forma farmacéutica preparada en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables. Con respecto al kit anteriormente indicado, en la medida que los ingredientes (i) e (iv) se almacenan en recipientes separados, los ingredientes (ii) e (iii) pueden almacenarse independientemente en recipientes que son independientes de los utilizados para almacenar los dos ingredientes anteriormente indicados, o los ingredientes (ii) e (iii) pueden mezclarse independientemente con el ingrediente (i) o (iv) para el almacenamiento en el mismo recipiente. Resulta preferido un kit en el que se almacene un agente farmacéutico que contiene los ingredientes (i) a (iii) en un recipiente y un agente farmacéutico que contiene el ingrediente (iv) se almacena en otro recipiente.

Las formas de dosificación unitaria utilizables del agente antitumoral de la presente invención para tratar mamíferos, incluyendo seres humanos, que sufren de tumores malignos no se encuentran limitadas y pueden seleccionarse convenientemente según el propósito del tratamiento. Entre los ejemplos específicos se encuentran inyecciones, supositorios, soluciones oftálmicas, pomadas, aerosoles y formas parenterales similares; comprimidos, comprimidos recubiertos, polvos, gránulos, cápsulas, líquidos, píldoras, suspensiones, emulsiones y formas orales similares. El agente antitumoral puede producirse en dichas formas de dosificación según métodos comúnmente conocidos en este campo técnico.

Las cantidades de tegafur, gimeracilo, oteracilo potásico y 1-OHP, que son principios activos de la preparación antitumoral de la presente invención, varían según la forma de dosificación, vía de administración, programa de dosificación, etc., y no se encuentran limitadas, y por lo tanto pueden seleccionarse convenientemente. Habitualmente resulta preferido que la proporción de los principios activos constituya entre aproximadamente 1% y aproximadamente 70% en peso de la preparación farmacéutica.

Los métodos para la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención no se encuentran limitados y pueden determinarse según la forma de la misma, la edad, sexo y estado del paciente, y otros factores, y por lo tanto puede administrarse por vía entérica, oral, rectal, intraoral, intraarterial, intravenosa, transdérmica o modo similar. Por ejemplo, se administran por vía oral comprimidos, píldoras, soluciones, suspensiones, emulsiones, gránulos, cápsulas y similares; las inyecciones se administran por vía intraarterial o intravenosa; los supositorios se administran por vía intraarterial o intravenosa; los supositorios se administran por vía intrarrectal, y las pomadas se aplican en la piel, la membrana mucosa en la boca, etc. Con respecto a la preparación farmacéutica de la presente invención, resulta posible que el agente farmacéutico que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico se administre por vía oral, administrando simultáneamente por vía intravenosa el agente farmacéutico 1-OHP encapsulado en liposomas.

La dosis de cada principio activo en la presente invención puede seleccionarse convenientemente según la aplicación, la edad y el sexo del paciente, el grado de la enfermedad y otros factores. El potenciador del efecto antitumoral de la preparación antitumoral de la presente invención puede administrarse en 1 a 4 dosis al día.

En la administración oral, la preparación farmacéutica de la presente invención preferentemente se proporciona en una cantidad utilizando los intervalos siguientes como estándar: la cantidad de tegafur es de entre aproximadamente 0,1 y 100 mg/kg/día, preferentemente de entre aproximadamente 0,2 y 40 mg/kg/día, y más preferentemente de entre aproximadamente 0,5 y 20 mg/kg/día; la cantidad de gimeracilo es de entre aproximadamente 0,02 y 30 mg/kg/día, preferentemente de entre aproximadamente 0,05 y 12 mg/kg/día, y más preferentemente de entre aproximadamente 0,1 y 6 mg/kg/día; la cantidad de oteracilo potásico es de entre aproximadamente 0,1 y 100 mg/kg/día, preferentemente de entre aproximadamente 0,2 y 40 mg/kg/día, y más preferentemente de entre aproximadamente 0,5 y 20 mg/kg/día, y la cantidad de 1-OHP es de entre aproximadamente 0,08 y 200 mg/kg/día, preferentemente de entre aproximadamente 0,15 y 80 mg/kg/día, y más preferentemente de entre aproximadamente 0,4 y 40 mg/kg/día.

En el caso de que se presente en forma de un supositorio, la preparación farmacéutica de la invención se administra una o dos veces al día en un adulto, en un intervalo de entre 6 y 12 horas, habitualmente en una cantidad correspondiente a aproximadamente 0,1 y 100 mg/kg/día de tegafur y de entre aproximadamente 0,08 y 200 mg/kg/día de 1-OHP mediante la inserción de la misma en el recto.

Los tipos de tumores malignos tratables mediante la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención no se encuentran limitados, en la medida en que la forma activa, es decir, 5-FU, reaccionan con la misma; por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer esofágico, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepático, cáncer biliar/de vesícula biliar, cáncer pancreático, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer renal, cáncer vesical, cáncer prostático, cáncer faríngeo, tumor cerebral, leucemia, melanoma, y linfoma maligno, etc. En particular, puede esperarse un efecto notable de la preparación farmacéutica de la presente invención sobre el cáncer de colon, el cáncer rectal, el cáncer gástrico, el cáncer esofágico, el cáncer de mama y el cáncer de cabeza y cuello. Además, también puede esperarse un efecto notable sobre los tumores resistentes a fármaco típicos y los tumores que desarrollan resistencia a fármaco.

Ejemplos

Los ejemplos y ejemplos de ensayo se proporcionan a continuación con el fin de ilustrar la invención con mayor detalle, aunque el alcance de la invención no se encuentra limitado por estos ejemplos y ejemplos de ensayo.

Ejemplo 1

Se disolvió en cloroformo DPPC (L- α -dipalmitoil-fosfatidilcolina, Coatsome MC-6060, fabricado por NOF Corporation), colesterol (grado especial, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y mPEG2000-DSPE (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-n-[metoxi(polietilenglicol)-2000], Sunbright DSPE-020CN, fabricado por NOF Corporation), a fin de obtener las concentraciones respectivas de 20 mM, 50 mM y 5 mM. Después se introdujeron 5 ml de solución 20 mM de DPPC, 0,5 ml de solución 50 mM de colesterol y 1 ml de solución 5 mM de mPEG2000-DSPE en un matraz en forma de pera. Mientras se reducía la presión utilizando un evaporador, se eliminó el cloroformo, formando una película delgada de lípido sobre el fondo del matraz en forma de pera. Se disolvió la película delgada de lípido en 6 ml de cloroformo/éter dietílico (1:2 v/v). Se disolvió 1-OHP en una solución de glucosa al 5% de manera que la concentración de 1-OHP alcanzase 8 mg/ml. La solución de 1-OHP preparada de esta manera (2 ml) se añadió a la solución de lípido y a continuación se mezcló. La mezcla resultante se sonicó a 25°C durante 15 minutos, formando una emulsión w/o, y se eliminó la fase orgánica bajo presión reducida utilizando un evaporador bajo agitación simultánea con vórtex; de esta manera se encapsuló el 1-OHP en los liposomas. Se

llevó a cabo un tratamiento supersónico para la separación de las partículas según tamaño utilizando un biodisruptor (Nippon Seiki Co., Ltd.) de manera que el diámetro de partícula medio de los liposomas que contenían el agente farmacéutico en los mismos se redujese a un valor aproximadamente inferior a 200 nm. Con el fin de eliminar los agentes farmacéuticos no encapsulados en el liposoma, se llevó a cabo una diálisis a 4°C durante 2 horas utilizando un casete de diálisis (casetes de diálisis Slide-A-Lyzer, 10000 MWCO, fabricado por Thermo Scientific Inc.) y una solución de glucosa al 5% como solución externa, agitando simultáneamente con un agitador magnético. Tras intercambiar la solución externa, se llevó a cabo otra diálisis durante dos horas bajo agitación, obteniendo de esta manera una preparación de liposoma que contenía 1-OHP. La preparación de liposoma que contenía 1-OHP preparada de esta manera presentaba un diámetro de partícula medio de $185,2 \pm 14,9$ nm (n=5).

En los ejemplos de la presente invención se midió el diámetro de partícula medio de la preparación de liposoma mediante un método de dispersión lumínica utilizando un analizador de partículas submicrométricas NICOMP 370 HPL (fabricado por Particle Sizing System, Inc.).

15 Ejemplo 2

Se disolvió HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada, Coatsome NC-21, fabricada por NOF Corporation), colesterol (grado especial, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y mPEG2000-DSPE (1,2-diasteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-n-[metoxi(polietilenglicol)-2000], Sunbright DSPE-020CN, fabricado por NOF Corporation) en cloroformo con el fin de obtener las concentraciones respectivas de 20 mM, 50 mM y 5 mM. A continuación, se introdujeron 5 ml de solución 20 mM de HSPC, 1 ml de solución 50 mM de colesterol y 2 ml de solución 5 mM de mPEG2000-DSPE en un matraz en forma de pera. Mientras se reducía la presión utilizando un evaporador, se eliminó el cloroformo para formar una capa delgada de lípido sobre el fondo del matraz en forma de pera. Se disolvió la película delgada de lípido en 6 ml de cloroformo/éter dietílico (1:2 v/v). Se disolvió 1-OHP en una solución de glucosa al 5% de manera que la concentración de 1-OHP alcanzase 8 mg/ml. La solución de 1-OHP preparada de esta manera (2 ml) se añadió a la solución de lípido y después se mezcló. La mezcla resultante se sonicó a 35°C durante 15 minutos para formar una emulsión w/o, y se eliminó la fase orgánica bajo presión reducida utilizando un evaporador durante aproximadamente una hora bajo agitación simultánea con vórtex; de esta manera se encapsuló el 1-OHP en los liposomas. Posteriormente se controló el tamaño de las partículas y se eliminó el agente farmacéutico no encapsulado de la misma manera que en el Ejemplo 1, obteniendo una preparación de liposoma de 1-OHP. La preparación de liposoma que contenían 1-OHP preparada de esta manera presentaba un diámetro de partícula medio de $197,9 \pm 22,0$ nm (n=5).

35 Ejemplo 3

Se produjo una preparación de liposoma que contenía 1-OHP de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto en que se utilizó PG-DSPE (Sunbright DSPE-PG10G, fabricado por NOF Corporation) en lugar de mPEG2000-DSPE. La preparación de liposoma que contenían 1-OHP preparada de esta manera presentaba un diámetro de partícula medio de $130,4 \pm 48,3$ nm (n=3).

40 Ejemplo 4

Se disolvió HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada, Coatsome NC-21, fabricada por NOF Corporation), colesterol (grado especial, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), DC-6-14 (lípido catiónico, cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(alfa-trimetilamonio-acetil)dietanolamina, fabricado por Sogo Pharmaceutical Co., Ltd.) y mPEG2000-DSPE (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-n-[metoxi(polietilenglicol)-2000], Sunbright DSPE-020CN, fabricado por NOF Corporation) en cloroformo con el fin de obtener las concentraciones respectivas de 20 mM, 50 mM y 5 mM. A continuación se introdujeron 5 ml de solución 20 mM de HSPC cloroformo, 1 ml de solución 50 mM de colesterol y 2 ml de solución 5 mM de DC-6-14 y 5 mM de mPEG2000-DSPE, en un matraz en forma de pera. Mientras se reducía la presión utilizando un evaporador se eliminó el cloroformo, formando una película delgada de lípido sobre el fondo del matraz en forma de pera. La película delgada de lípido se disolvió en 6 ml de cloroformo/éter dietílico (1:2 v/v). Se disolvió 1-OHP en una solución de glucosa al 5% de manera que la concentración de 1-OHP alcanzase 8 mg/ml. La solución de 1-OHP preparada de esta manera (2 ml) se añadió a la solución de lípido y después se mezcló. La mezcla resultante se sonicó a 35°C durante 15 minutos, y se eliminó el solvente orgánico bajo presión reducida utilizando un evaporador durante aproximadamente una hora bajo agitación simultánea con vórtex; de esta manera se encapsuló el 1-OHP en los liposomas. Después se controló el tamaño de las partículas y se eliminó el material farmacéutico no encapsulado de la misma manera que en el Ejemplo 1, obteniendo una preparación de liposoma de 1-OHP. La preparación de liposoma que contenía 1-OHP preparada de esta manera presentaba un diámetro de partícula medio de $202,4 \pm 14,7$ nm (n=5).

60 Ejemplo de ensayo 1

Formulación de una preparación farmacéutica

Se utilizó la preparación de liposoma que contenía 1-OHP obtenida en el Ejemplo 1 (en adelante denominada liposomas DPPC 1-OHP).

Se preparó una preparación de 1-OHP (en adelante denominada 1-OHP libre) mediante la disolución de 1-OHP en una solución de glucosa al 5%.

- 5 Se preparó una preparación de TS-1 (en adelante denominada TS-1) mediante la disolución en agua del contenido encapsulado en una cápsula de TS-1.

Efecto antitumoral y efectos secundarios de la preparación farmacéutica

- 10 Se cultivaron células de cáncer de pulmón altamente metastásicas, es decir, carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) en presencia de 5% de CO₂ a 37°C en un medio FBS-DMEM al 10%. Se inyectaron por vía subcutánea 0,1 ml de células LLC que contenían 5x10⁶ células/ml en el lomo de un ratón C57BL/6 macho (de 5 semanas de edad, peso corporal: 20 g) con el fin de obtener un ratón portador de tumor sólido. Se confirmó que el volumen tumoral calculado mediante la fórmula siguiente excedía 50 mm³ 6 días después de la infusión de células LLC.

- 15 Se administraron por vía intravenosa liposomas DPPC 1-OHP o 1-OPH libre a una dosis de 4,2 mg/kg a modo de 1-OHP. Se administró por vía oral TS-1 a la dosis de 6,9 mg/kg a modo de tegafur. La preparación de liposoma DPPC 1-OHP y el 1-OHP libre se administraron los días 13 y 20 después de la inoculación celular y se administró TS-1 cada día desde el día 6 posterior a la inoculación celular y hasta el final del experimento.

- 20 Se calculó el volumen tumoral mediante la fórmula siguiente transcurridos 6 días de la inoculación celular. Se evaluó el efecto antitumoral utilizando la proporción relativa de volúmenes tumorales como índice.

Volumen tumoral=1/2 x a x b²

- 25 (a: eje mayor del sitio tumoral; b: eje menor del sitio tumoral)

Se realizó un seguimiento del cambio del peso corporal de los ratones a modo de índice de los efectos secundarios.

- 30 Tal como se pone de manifiesto a partir de los resultados mostrados en la figura 1, la terapia de combinación de liposomas DPPC 1-OHP y TS-1 mostró un efecto antitumoral más elevado que la combinación de 1-OHP libre y TS-1. Sin embargo, los resultados mostrados en la figura 2 indican que no se produjeron diferencias significativas de cambio de peso corporal entre la combinación de TS-1 y liposomas DPPC 1-OHP, y 1-OHP libre. No se observó un incremento notable de toxicidad.

35 **Ejemplo de ensayo 2**

- Se evaluó el efecto antitumoral y los efectos secundarios de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 1, excepto en que se utilizó la preparación de liposoma que contenían 1-OHP obtenida en el ejemplo 2 (en adelante denominada liposomas HSPC 1-OHP).

- 40 Tal como se pone de manifiesto a partir de los resultados mostrados en la figura 3, la terapia de combinación de liposomas HSPC 1-OHP con TS-1 mostró un efecto antitumoral más elevado que la combinación de 1-OHP libre con TS-1. Sin embargo, los resultados mostrados en la figura 4 indican claramente que no se produjo ninguna diferencia significativa de cambio de peso corporal entre la combinación de TS-1 con liposomas HSPC 1-OHP y con 1-OHP libre. No se observó un incremento notable de toxicidad.

Ejemplo de ensayo 3

- 50 Se formuló una preparación farmacéutica de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 1. La preparación farmacéutica resultante se administró en un ratón portador de tumor y se realizó un seguimiento del número de días de supervivencia del ratón.

- 55 Tal como se pone de manifiesto a partir de los resultados mostrados en la figura 5, al administrar TS-1 en combinación con liposomas DPPC 1-OHP, la tasa de supervivencia era superior al caso de la combinación con 1-OHP libre.

Ejemplo de ensayo 4

- 60 Se preparó una preparación farmacéutica de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 2. La preparación farmacéutica resultante se administró en un ratón portador tumoral y se realizó un seguimiento de los días de supervivencia del ratón.

- 65 Tal como se pone de manifiesto a partir de los resultados mostrados en la figura 6, al administrar TS-1 en combinación con liposomas HSPC 1-OHP, la tasa de supervivencia era superior al caso de la combinación con 1-OHP libre.

Ejemplo de ensayo 5

5 Se evaluó el efecto antitumoral de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 1 excepto en que se utilizó la preparación de liposoma que contenía 1-OHP obtenida en el Ejemplo 3 (en adelante denominada liposomas PG10 1-OHP).

10 Tal como se pone de manifiesto a partir de los resultados mostrados en la figura 7, la terapia de combinación de liposomas PG10 1-OHP con TS-1 mostró un efecto antitumoral más elevado que la combinación de 1-OHP libre con TS-1.

Ejemplo de ensayo 6Formulación de preparación farmacéutica

15 Se formuló una preparación farmacéutica de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 2.

Efecto antitumoral y efectos secundarios de la preparación farmacéutica

20 Se cultivaron células de carcinoma de colon de ratón, es decir Colon 26, en presencia de 5% de CO₂ a 37°C en un medio FBS-DMEM al 10%. Se inyectaron por vía subcutánea 0,1 ml de células Colon 26 que contenían 2x10⁷ células/ml en el lomo de un ratón BALB/c macho (de 5 semanas de edad, peso corporal: 20 g) con el fin de obtener un ratón portador de tumor sólido. Se confirmó que el volumen tumoral calculado mediante la fórmula siguiente excedía 50 mm³ 7 días después de la inoculación de células Colo 26.

25 Se administraron por vía intravenosa liposomas HSPC 1-OHP ó 1-OHP libre a la dosis de 4,2 mg/kg como el 1-OHP. Se administró por vía oral TS-1 a la dosis de 6,9 mg/kg como tegafur. Los liposomas HSPC 1-OHP y el 1-OHP libre se administraron en los días 14 y 21 posteriores a la inoculación de células y el TS-1 se administró cada día entre el día 7 después de la inoculación celular y el final del experimento.

30 Se evaluaron otros efecto antitumorales y efectos secundarios de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 2.

35 Tal como se pone de manifiesto a partir de los resultados mostrados en la figura 8, el efecto antitumoral de la terapia de combinación de liposomas HSPC 1-OHP más TS-1 fue superior a la combinación de 1-OHP libre más TS-1. Sin embargo, los resultados mostrados en la figura 9 indican claramente que no se produjo ninguna diferencia significativa de cambio de peso corporal entre el tratamiento de TS-1 en combinación con liposomas HSPC 1-OHP y con 1-OHP libre. En otras palabras, no se observó ningún incremento notable de toxicidad.

Ejemplo de ensayo 7

40 Se formuló una preparación farmacéutica de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 6. La preparación farmacéutica resultante se administró en un ratón portador de tumor y se realizó un seguimiento del número de días de supervivencia del ratón.

45 Tal como se pone de manifiesto a partir de los resultados mostrados en la figura 10, la terapia de combinación de liposomas HSPC 1-OHP más TS-1 mostró una tasa de supervivencia prolongada en comparación con la combinación de 1-OHP libre más TS-1.

50 Los resultados presentados anteriormente sugieren que encapsulando 1-OHP en un liposoma, es decir, una preparación de liposoma que contiene 1-OHP, puede aumentarse notablemente el efecto antitumoral y la tasa de supervivencia de los liposomas que contienen 1-OHP en la combinación con TS-1, mientras que el nivel de toxicidad es prácticamente el mismo que en el caso de la administración de 1-OHP en combinación con TS-1. El aumento de la actividad antitumoral probablemente se atribuye a una mejor distribución biológica y una localización mejorada en el tumor del 1-OHP como resultado de su óptima liposomización.

55 La presente invención revela que, encapsulando 1-OHP en una preparación de liposomas, puede mejorarse la actividad antitumoral de la terapia de combinación de 1-OHP más un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico, y no se observa toxicidad atribuida a la liposomización de 1-OHP. Esto indica que la terapia de combinación utilizando una preparación de liposoma de 1-OHP con un fármaco de combinación que
60 contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico podría ser un tratamiento prometedor para el cáncer.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Agente antitumoral que comprende en combinación una preparación de liposoma obtenible encapsulando oxaliplatino en un liposoma, y un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.
2. Agente antitumoral según la reivindicación 1, en el que por lo menos un componente lipídico que constituye el liposoma es un fosfolípido.
- 10 3. Agente antitumoral según la reivindicación 2, en el que la superficie de membrana del liposoma es modificada con polietilenglicol, poliglicerina o lípido catiónico.
4. Agente antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oxaliplatino se utiliza en una proporción de 0,1 a 5 moles por 1 mol de tegafur.
- 15 5. Agente antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el gimeracilo se utiliza en una proporción de 0,1 a 5 moles por 1 mol de tegafur, y el oteracilo potásico se utiliza en una proporción de 0,1 a 5 moles por 1 mol de tegafur en el fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.
- 20 6. Agente antitumoral según la reivindicación 1, en el que el agente antitumoral se forma como un kit que comprende una preparación de liposoma que contiene oxaliplatino y un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.
- 25 7. Agente antitumoral según la reivindicación 1, en el que la preparación de liposoma se administra por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea, y el fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico se administra por vía oral.
8. Preparación de liposoma obtenible encapsulando oxaliplatino en un liposoma para la utilización como un agente antitumoral con un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.
- 30 9. Preparación de liposoma según la reivindicación 8, en la que por lo menos un componente lipídico que constituye el liposoma es un fosfolípido.
- 35 10. Preparación de liposoma según la reivindicación 9, en la que la superficie de membrana del liposoma es modificada con polietilenglicol, poliglicerina o lípido catiónico.
11. Preparación de liposoma según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que se utiliza oxaliplatino en una proporción de 0,1 a 5 moles por 1 mol de tegafur.
- 40 12. Preparación de liposoma según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que se utiliza gimeracilo en una proporción de 0,1 a 5 moles por 1 mol de tegafur, y se utiliza oteracilo potásico en una proporción de 0,1 a 5 moles por 1 mol de tegafur, en el fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.
- 45 13. Utilización de una preparación de liposoma obtenible encapsulando oxaliplatino en un liposoma, y un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico para producir un agente antitumoral.
- 50 14. Utilización de una preparación de liposoma que contiene oxaliplatino encapsulado en un liposoma para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer con un fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico, en la que una dosis eficaz de la preparación de liposoma y una dosis eficaz del fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico deben administrarse a un paciente con cáncer.
- 55 15. Fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico y una preparación de liposoma que contiene oxaliplatino encapsulado en un liposoma para la utilización en el tratamiento del cáncer, en el que una dosis eficaz de la preparación de liposoma y del fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico debe administrarse a un paciente con cáncer.
- 60 16. Agente antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, preparación de liposoma según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, utilización de una preparación de liposoma según la reivindicación 13 o 14, o fármaco de combinación según la reivindicación 15,
- en los que la preparación de liposoma debe administrarse separada o conjuntamente con el fármaco de combinación que contiene tegafur, gimeracilo y oteracilo potásico.

figura 1

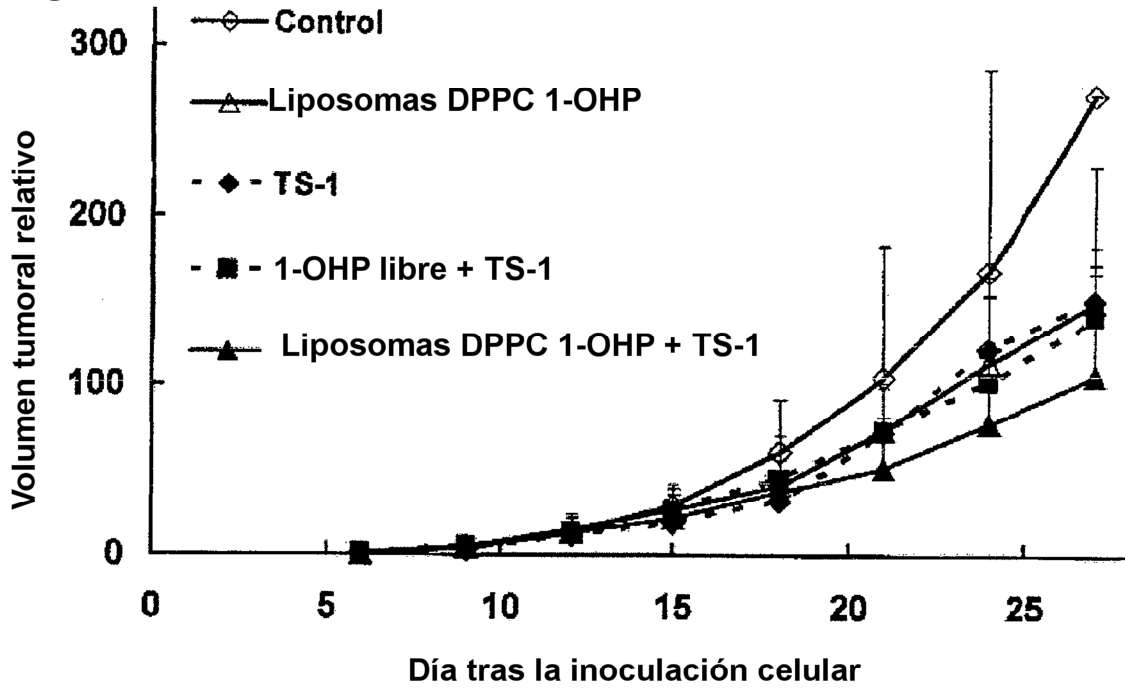


figura 2

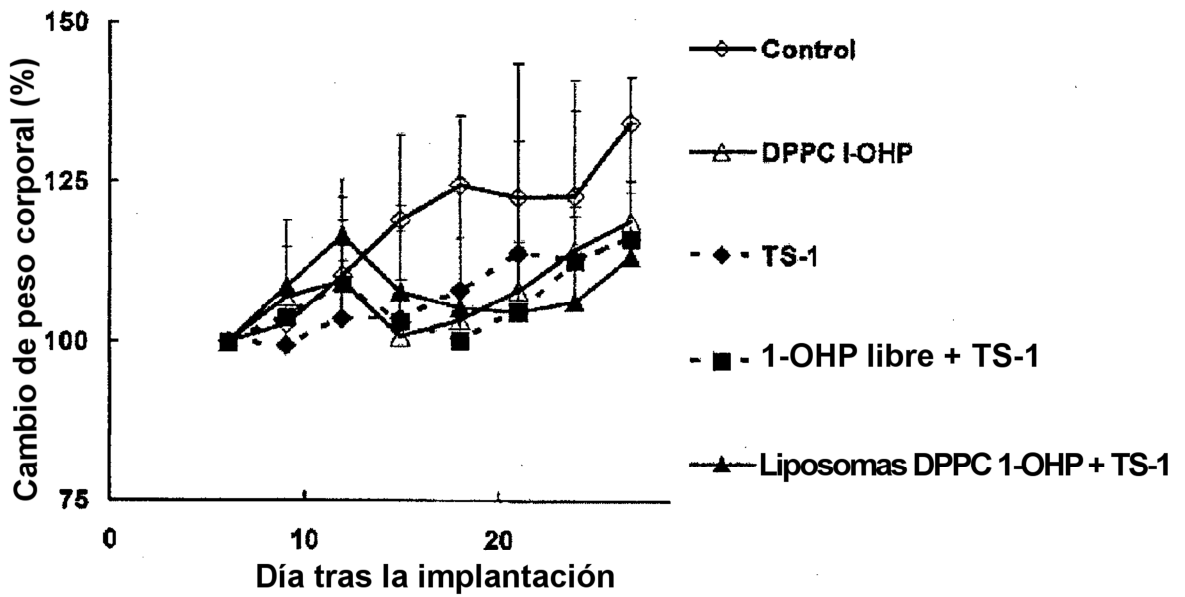


figura 3

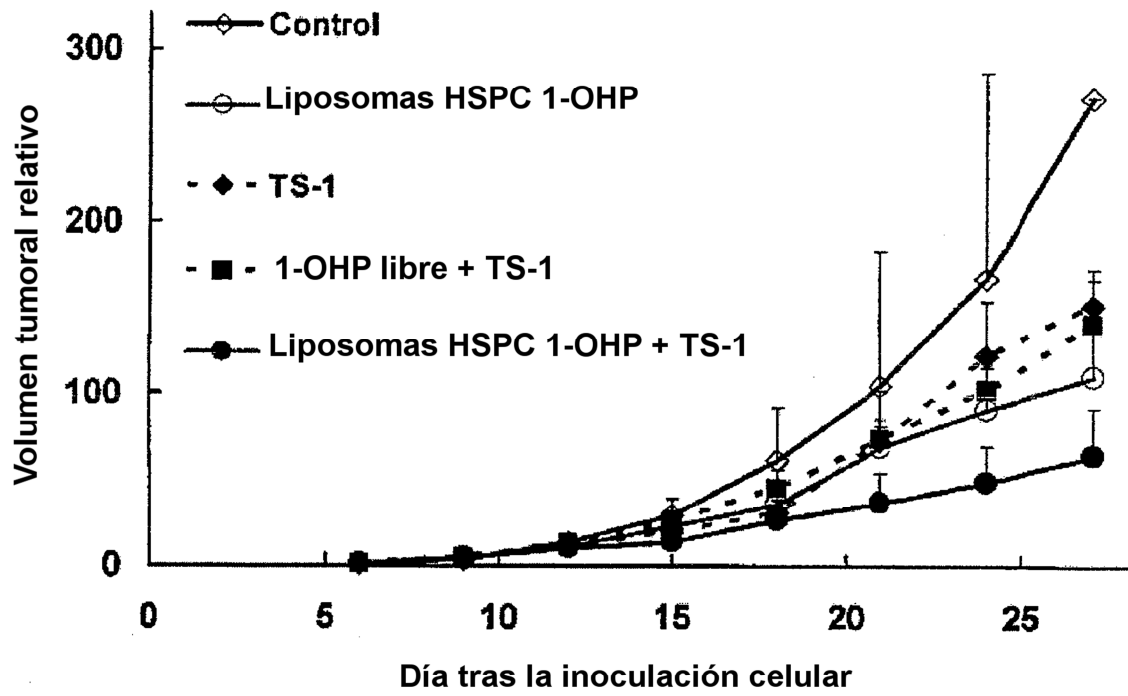


figura 4

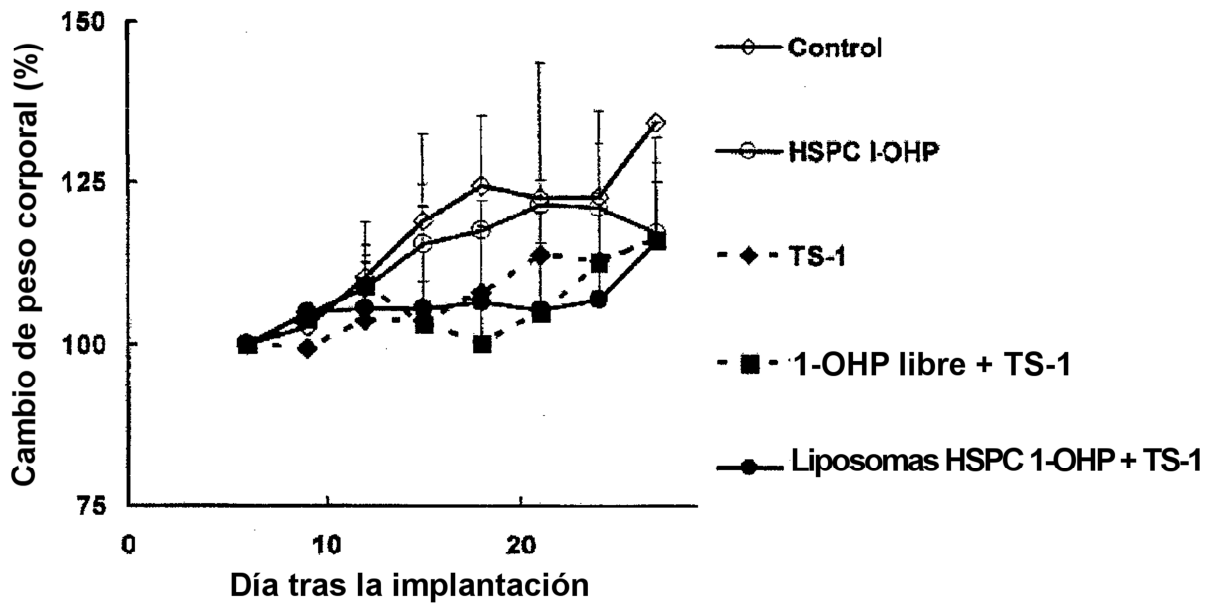


figura 5

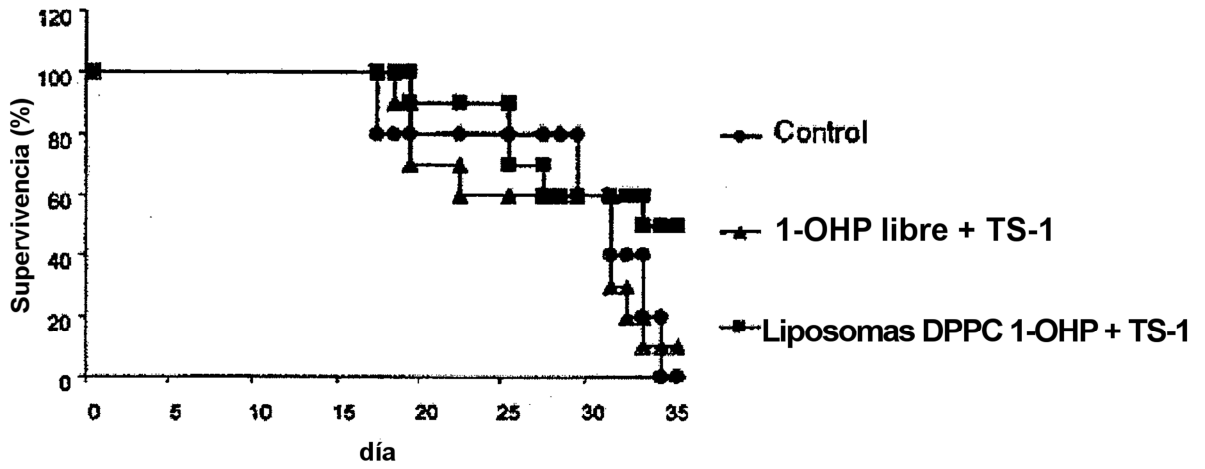


figura6

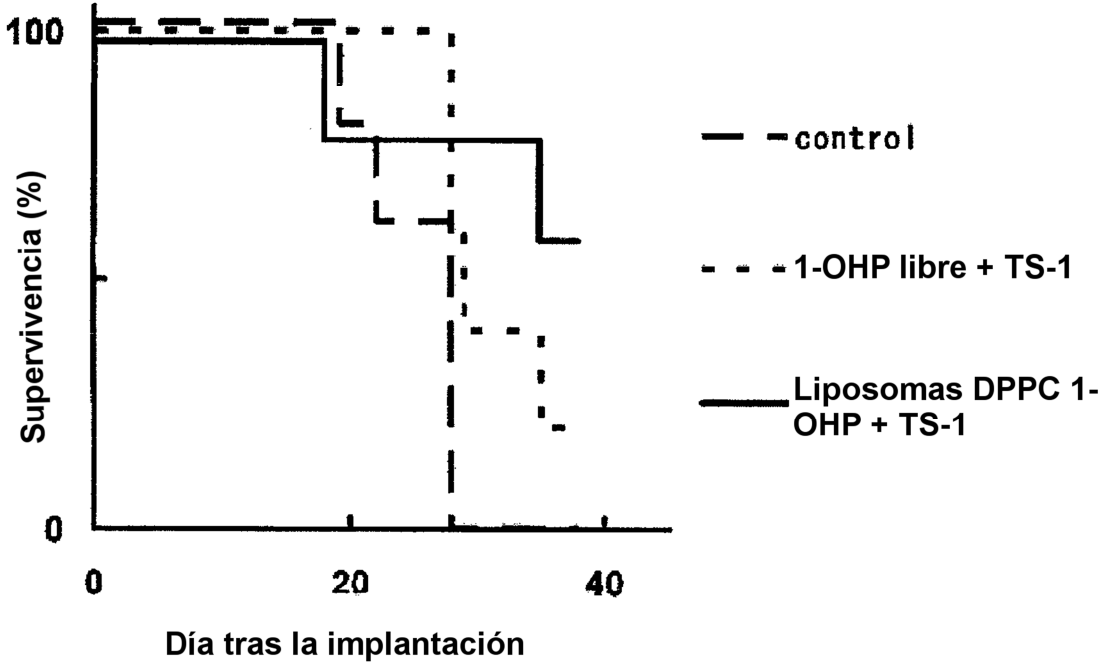


figura 7

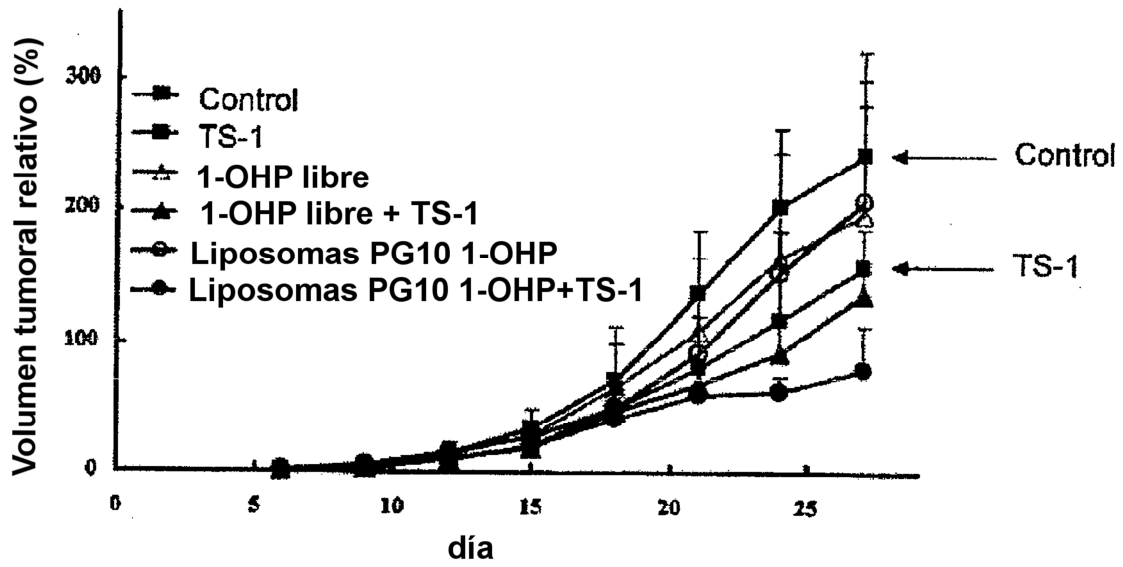


figura 8

