

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 141**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/475** (2006.01)

**A61K 31/704** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2000 E 10011105 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2266537**

54 Título: **Composiciones para tratar el cáncer**

30 Prioridad:

**01.04.1999 US 127444 P**

**02.06.1999 US 137194 P**

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

**04.12.2014**

73 Titular/es:

**TALON THERAPEUTICS, INC. (50.0%)**

**157 Technology Dr.**

**Irvine, CA 92618, US y**

**THE BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BURGE, CLIVE, T., R.;**

**GOLDIE, JAMES, H.;**

**WEBB, MURRAY, S.;**

**LOGAN, PATRICIA, M.;**

**SARRIS, ANDREAS, H.;**

**CABANILLAS, FERNANDO y**

**MAYER, LAWRENCE, D.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 524 141 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones para tratar el cáncer

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a composiciones para el tratamiento de una neoplasia en un mamífero y, en particular, formas de neoplasias en recaída.

**Antecedentes de la invención**

10 A pesar de años de investigación en el desarrollo de nuevos métodos de tratamiento, los cánceres del sistema linfático, o linfomas, siguen siendo bastante comunes. Por ejemplo, más de 60.000 personas en EEUU son diagnosticadas con linfoma cada año, que incluyen más de 55.000 de linfoma no hodgkiniano (NHL), y esta cifra está aumentando constantemente. Además, la prognosis de los que padecen estas enfermedades a menudo es mala, puesto que las tasas de supervivencia de los pacientes con linfoma siguen siendo bajas. Evidentemente, son necesarios nuevos métodos para tratar estas enfermedades.

15 Aunque los tratamientos tradicionales para el linfoma generalmente dependen del tipo de linfoma, así como de la historia médica del paciente, el tratamiento de primera línea de muchos linfomas generalmente incluye quimioterapia. Esta quimioterapia a menudo supone la administración de un "cóctel" de compuestos, por ejemplo, la formulación CHOP, que incluye ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona. Además, ciertos tratamientos de primera línea del cáncer también incluyen otras formas de terapia del cáncer, tales como terapia de radiación.

20 En muchos casos, los pacientes responden inicialmente a estos tratamientos de primera línea, pero después sufren una recaída, es decir, un tumor vuelve a aparecer o a crecer. Después de una de estas recaídas, los pacientes a menudo son tratados con más quimioterapia, por ejemplo, con CHOP o con otras formulaciones o, en algunos casos, los pacientes son tratados con otros procedimientos, tales como trasplante de médula ósea. De nuevo, en muchos casos, los pacientes responden inicialmente a estos otros tratamientos, pero después sufren otra recaída. En general, cuantas más recaídas sufre el paciente, menos acuerdo existe en la técnica con respecto a un tratamiento óptimo posterior. En otros casos, un paciente no responde en absoluto a un tratamiento, incluso inicialmente, y por tanto se indica que tiene un cáncer refractario. También en estos casos existe poco acuerdo en la técnica con respecto a un tratamiento óptimo posterior.

25 Los alcaloides aislados a partir de la planta de vincapervinca de Madagascar (*Vinca rosea*), denominados "vinca alcaloides," han demostrado ser eficaces para los tratamientos de primera línea de muchos tipos de linfomas, leucemia y otros cánceres. Uno de esos vinca alcaloides, la vincristina, se incluyen en la formulación quimioterapéutica común CHOP. La vincristina, que despolimeriza los microtúbulos y, por tanto, inhibe la proliferación celular, se administra en su forma libre en CHOP. Se ha descrito la vincristina encapsulada en liposomas (véase, por ejemplo, la patente de EEUU 5.741.516, o la patente de EEUU n.º 5.714.163). En concreto, estas patentes analizan el uso de la vincristina encapsulada en fosfatidilcolina, diesteiroilfosfatidilcolina, o esfingomielina, además de colesterol. Sin embargo, esta tecnología nunca ha tenido éxito en aplicaciones clínicas. En efecto, siguen existiendo importantes incertidumbres teóricas y prácticas, que incluyen incertidumbres con respecto a la biodistribución, toxicidad y eficacia.

30 Las formulaciones de fármacos encapsulados en lípidos pueden proporcionar ventajas frente a los métodos de administración de fármacos tradicionales. Por ejemplo, algunas formulaciones basadas en lípidos proporcionan una semivida más largas *in vivo*, un mejor transporte dirigido a tejidos, y una menor toxicidad. Se han descrito numerosos métodos para la formulación de vehículos de administración de fármacos basados en lípidos (véase, por ejemplo, la patente de EEUU 5.741.516). Sin embargo, ningún estudio ha demostrado que estas formulaciones de vinca alcaloides encapsulados en liposomas ofrecen alguna ventaja frente a los tratamientos previos, o que tengan eficacia en el tratamiento *in vivo* del cáncer en un paciente. Así, en la técnica siguen siendo necesarios nuevos métodos para tratar estas enfermedades. De modo bastante sorprendente, la presente invención proporciona vincristina encapsulada en liposomas para su uso en estos métodos.

35 Webb *et al.*, 1995, British Journal of Cancer, 72, 896-904, describen el desarrollo de una formulación liposómica de vincristina con mejor estabilidad y propiedades biológicas.

40 El documento US 5.595.756 describe composiciones liposómicas que encapsulan agentes bioactivos y tienen mejor longevidad en la circulación.

**Sumario de la invención**

45 Ahora se ha descubierto que los vinca alcaloides encapsulados en liposomas, tales como vincristina, son especialmente eficaces en el tratamiento de primera línea de la neoplasia, así como para el tratamiento de formas de neoplasias en recaída, en particular para linfomas, tales como linfomas no hodgkinianos. Por tanto, en la presente se proporciona vincristina encapsulada en liposomas para su uso en métodos para el tratamiento de estos y otros cánceres.

En un aspecto, esta invención proporciona:

- 5 (1) Vincristina encapsulada en liposomas para su uso en un método para tratar un cáncer, en la que los liposomas comprenden esfingomieline y colesterol en una proporción de entre 75/25% molar de esfingomieline/% molar de colesterol y and 50/50% molar de esfingomieline/% molar de colesterol, y vincristina a una concentración de 0,1 a 0,5 mg/ml, y en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra por vía intravenosa a una dosificación mayor que 1,4 mg/m<sup>2</sup>.
- (2) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de (1), en la que la proporción de esfingomieline a colesterol está entre 70/30 y 55/45% molar de esfingomieline/% molar de colesterol, o aproximadamente 55/45% molar de esfingomieline/% molar de colesterol.
- 10 (3) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de (1) o (2), en la que la concentración de vincristina es de 0,15 a 0,2 mg/ml.
- (4) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de (1), (2), o (3), en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra a una dosificación de 1,5 mg/m<sup>2</sup>, 2,0 mg/m<sup>2</sup>, o 2,4 mg/m<sup>2</sup>.
- 15 (5) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de las anteriores reivindicaciones (1) - (4), en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra a una dosis de 3 a 6 mg.
- (6) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de (1) - (5), en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra durante hasta 12 sesiones de tratamiento.
- (7) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de (1) - (6), en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra una vez cada 7 a 21 días, o cada 14 días.
- 20 (8) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de (6), en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra mediante infusión intravenosa a lo largo de 30 minutos, a lo largo de 60 minutos, o a lo largo de 90 minutos o más.
- (9) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de (6), en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra mediante infusión intravenosa cada 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 o 28 días, o cada 7 a 21 días.
- 25 (10) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de (1) - (9), en la que el cáncer es un linfoma, leucemia o mieloma, o es un linfoma no hodgkiniano (NHL) o leucemia linfocítica aguda (ALL).
- (11) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de (1) - (10), en la que dicha vincristina encapsulada en liposomas se coadministra con al menos otro compuesto o terapia.
- 30 (12) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de (11), en la que dicho otro compuesto o terapia se selecciona de terapia de radiación, trasplante de médula ósea, terapia hormonal, cirugía, ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, un taxano, una camptotecina, una podofilina, un anticuerpo antitumoral, un fármaco antisentido, y una vacuna antitumoral.
- (13) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de (12), en la que dicho otro compuesto o terapia se selecciona del grupo que consiste en ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones.
- 35 (14) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de (1) - (13), en la que dicha vincristina encapsulada en liposomas se coadministra con un tratamiento para la neurotoxicidad.
- (15) La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de (1) - (14), en la que dicha vincristina es sulfato de vincristina.
- 40 (16) El uso de vincristina encapsulada en liposomas para la preparación de un medicamento para tratar un cáncer, en el que los liposomas comprenden esfingomieline y colesterol en una proporción de entre 75/25% molar de esfingomieline/% molar de colesterol y and 50/50% molar de esfingomieline/% molar de colesterol, y vincristina a una concentración de 0,1 a 0,5 mg/ml, y en el que la vincristina encapsulada en liposomas se formula para la administración intravenosa a una dosificación mayor que 1,4 mg/m<sup>2</sup>.

#### Definiciones

- 45 Una "neoplasia," tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier crecimiento aberrante de células, tumores, efusiones malignas, verrugas, pólipos, tumores no sólidos, quistes y otros crecimientos. Un sitio de neoplasia puede contener una diversidad de tipos de células que incluyen, pero no se limitan a células neoplásicas, endotelio vascular, o células de sistema inmunológico, tales como macrófagos y leucocitos, etc.

- 50 Un "cáncer" en un mamífero se refiere a cualquiera de una serie de trastornos provocados por un crecimiento anómalo e incontrolado de células. Las células capaces de provocar cáncer, denominadas "células cancerosas",

poseen una serie de propiedades características, tales como una proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, velocidad de proliferación y crecimiento rápido, y ciertos tipos de características morfológicas. A menudo, las células cancerosas se presentan en forma de un tumor, pero estas células también pueden existir de modo individual dentro de un mamífero, o pueden ser una célula cancerosa no tumorigénica, tal como una célula de leucemia. Un cáncer puede detectarse de varias maneras que incluyen, pero no se limitan a detectar la presencia de un tumor o tumores (por ejemplo, por medios clínicos o radiológicos), estudiando las células dentro de un tumor o procedentes de otra muestra biológica (por ejemplo, de una biopsia de un tejido), midiendo los marcadores sanguíneos indicativos de cáncer (por ejemplo, CA125, PAP, PSA, CEA, AFP, HCG, CA 19-9, CA 15-3, CA 27-29, LDH, NSE, y otros), y detectando un genotipo indicativo de un cáncer (por ejemplo, TP53, ATM, etc.). Sin embargo, un resultado negativo en uno o más de los anteriores métodos de detección no indica necesariamente la ausencia de cáncer, por ejemplo, un paciente que muestra una respuesta completa a un tratamiento del cáncer aún puede tener cáncer, tal como se pone de manifiesto por una posterior recaída.

La "administración sistémica," tal como se emplea en la presente, se refiere a la administración que conduce a una amplia biodistribución de un compuesto dentro de un organismo. La administración sistémica significa que una cantidad útil, preferiblemente terapéutica, de un compuesto, se expone a la mayoría de las partes del cuerpo. Para obtener una amplia biodistribución, en general se requiere que la vía de introducción sea tal que el compuesto no se degrade ni se elimine con rapidez (por ejemplo, por los órganos de primer paso (hígado, pulmón, etc.) o por una unión a células rápida y no específica) antes de alcanzar un sitio de enfermedad. La administración sistémica de vinca alcaloides encapsulados en liposomas se obtiene preferiblemente mediante una administración intravenosa.

Un "linfoma" se refiere aun crecimiento maligno de células B o T en el sistema linfático. Un "linfoma" incluye numerosos tipos de crecimientos malignos, que incluyen linfoma de Hodgkin y linfoma no hodgkiniano (NHL). Un "linfoma no hodgkiniano" se refiere a un crecimiento maligno de células B o T en el sistema linfático que no es un linfoma de Hodgkin (que se caracteriza, por ejemplo, por la presencia de células de Reed-Sternberg en el área cancerosa). Los linfomas no hodgkinianos incluyen más de 29 tipos de linfoma, cuya distinción se basa en el tipo de células cancerosas. La clasificación concreta depende del sistema de clasificación concreto utilizado, tal como la Working Formulation, la clasificación Rappaport, y la clasificación REAL. En una realización preferida, se emplea la clasificación REAL.

Un "cáncer en recaída" o un linfoma en recaída se refiere a un cáncer o un linfoma que ha recurrido después de una remisión previa completa o parcial en respuesta a un tratamiento previo. La recurrencia puede definirse de cualquier forma, que incluye la reaparición o el recrecimiento de un tumor, según se detecta por ensayos clínicos, radiológicos o bioquímicos, o por un mayor nivel de un marcador del cáncer. Los tratamientos previos pueden incluir, pero no se limitan a quimioterapia, terapia de radiación, y trasplante de médula ósea.

Un linfoma no hodgkiniano "indolente" es una clasificación que incluye las formas de crecimiento lento de linfomas. Incluye lo que se denomina NHL de bajo grado y algunas categorías de NHL de grado intermedio en la Working Formulation. Los NHL indolentes a veces no responden a terapias del cáncer convencionales, tales como quimioterapia y terapia de radiación.

Un linfoma no hodgkiniano "transformado" es una clasificación que a veces se emplea para describir un NHL indolente que adquiere un aspecto agresivo y responde mejor a las quimioterapias convencionales.

Los pacientes con "cáncer refractario" o "linfoma refractario" son aquellos pacientes que no han logrado la remisión completa en la primera sesión de quimioterapia de combinación, o se refiere a pacientes que no han logrado la remisión completa o parcial en una quimioterapia posterior. Los pacientes "refractarios primarios" son aquellos pacientes que nunca han logrado la remisión completa incluso en el primer tratamiento.

Una "enfermedad estable" es un estado en el que una terapia provoca la detención del crecimiento o prevalencia de un tumor o tumores, según se mide mediante los medios clínicos, radiológicos y bioquímicos habituales, aunque no exista regresión ni disminución en el tamaño o la prevalencia del tumor o tumores, es decir, el cáncer no disminuye ni aumenta en extensión o gravedad.

Una "respuesta parcial" o "remisión parcial" se refiere a la mejora de un estado canceroso, según se mide mediante el tamaño del tumor y/o los niveles de marcadores del cáncer, en respuesta a un tratamiento. Generalmente, una "respuesta parcial" significa que un tumor o un marcador sanguíneo que indica un tumor ha disminuido en tamaño o nivel en aproximadamente 50% en respuesta a un tratamiento. El tratamiento puede ser cualquier tratamiento dirigido contra el cáncer, pero generalmente incluye quimioterapia, terapia de radiación, terapia hormonal, cirugía, trasplante de células o médula ósea, inmunoterapia y otros. El tamaño de un tumor puede ser detectado por medios clínicos o radiológicos. Los marcadores indicativos de un tumor pueden ser detectados por medios conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, ELISA u otros ensayos basados en anticuerpos.

Una "respuesta completa" o "remisión completa" significa que un estado canceroso, según se mide, por ejemplo, mediante el tamaño del tumor y/o los niveles de marcadores del cáncer, ha desaparecido después de un tratamiento, tal como quimioterapia, terapia de radiación, terapia hormonal, cirugía, trasplante de células o médula ósea, o inmunoterapia. La presencia de un tumor puede ser detectada por medios clínicos o radiológicos. Los

marcadores indicativos de un tumor pueden ser detectados por medios conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, ELISA u otros ensayos basados en anticuerpos. Sin embargo, una "respuesta completa" no indica necesariamente que el cáncer se haya curado, puesto que a una respuesta completa le puede seguir una recaída.

5 Una "quimioterapia" se refiere a la administración de agentes químicos que inhiben el crecimiento, la proliferación y/o la supervivencia de células cancerosas. Estos agentes químicos a menudo se dirigen a los procesos intracelulares necesarios para el crecimiento o la división celular y, por tanto, son particularmente eficaces contra células cancerosas, que en general crecen y se dividen con rapidez. Por ejemplo, la vincristina despolimeriza los microtúbulos y, por tanto, impide que las células entren en mitosis. En general, una quimioterapia puede incluir cualquier agente químico que inhiba, o que esté diseñado para inhibir, una célula cancerosa o una célula que es probable que se convierta en cancerosa. Estos agentes a menudo se administran, y a menudo son más eficaces de esta forma, en combinación, por ejemplo, en la formulación CHOP.

Una "terapia de radiación" se refiere a la administración de radiactividad a un animal con cáncer. La radiación mata o inhibe el crecimiento de las células en división, tales como las células cancerosas.

15 La "cirugía" es la eliminación directa o ablación de células, por ejemplo, células cancerosas, de un animal. De forma más habitual, las células cancerosas estarán en forma de un tumor (por ejemplo, que resulta de un linfoma), que se elimina del animal.

Una "terapia hormonal" se refiere a la administración de compuestos que contrarrestan o inhiben hormonas, tales como estrógeno o andrógeno, que tiene un efecto mitogénico sobre las células. A menudo, estas hormonas actúan para aumentar las propiedades cancerosas de células cancerosas *in vivo*.

20 Una "inmunoterapia" se refiere a métodos para potenciar la capacidad del sistema inmunológico de un animal para destruir las células cancerosas dentro del animal.

25 Un agente terapéutico "en forma libre", o un agente terapéutico "libre", se refiere a un agente terapéutico que no está encapsulado en liposomas. Habitualmente, se supone que un fármaco está "libre", o en una "forma libre," a menos que se indique lo contrario. Sin embargo, un vinca alcaloide en forma libre aún puede estar presente en combinación con otros reactivos, tales como otros compuestos quimioterapéuticos, un vehículo farmacéutico, o agentes complejantes, es decir, que, tal como se emplea en la presente, la expresión solo excluye específicamente las formulaciones de lípidos de los vinca alcaloides.

### Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 proporciona los resultados de un ensayo clínico que emplea los métodos descritos en la presente, en particular con respecto a la eficacia de los métodos para el tratamiento de las formas indolentes, transformadas, en recaída, y agresivas después de un trasplante de médula ósea (BMT) del linfoma no hodgkiniano.

La figura 2 proporciona los resultados con respecto a la respuesta a la vincristina liposómica en NHL agresivo en recaída, en particular con respecto al efecto del número de regímenes previos.

### Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

35 Esta invención proporciona vincristina encapsulada en liposomas para su uso en métodos para tratar neoplasias en un paciente. Esta invención se basa en el descubrimiento de que los vinca alcaloides encapsulados en liposomas son extraordinariamente eficaces en el tratamiento de una diversidad de formas de linfoma. En particular, se ha realizado el sorprendente descubrimiento de que la administración de vinca alcaloides encapsulados en liposomas aumenta la mediana de la supervivencia de pacientes con linfoma. En una realización particularmente preferida, la vincristina, encapsulada en un liposoma con una base de esfingomielina y colesterol, se emplea en el tratamiento de un linfoma no hodgkiniano, en especial las formas en recaída del linfoma no hodgkiniano (NHL). La invención también proporciona, entre otros, vincristina encapsulada en liposomas para su uso en métodos para tratar las formas indolentes, transformadas, y agresivas de NHL.

45 A menudo, estos tratamientos de las formas en recaída, indolentes, transformadas, y agresivas de linfoma no hodgkiniano se administran después de al menos una sesión de un tratamiento anticáncer primario, tal como quimioterapia y/o terapia de radiación, seguido de al menos una respuesta parcial o completa a dicho al menos un tratamiento. La vincristina liposómica puede administrarse como un tratamiento de primera línea. La vincristina encapsulada en liposomas puede proporcionarse como un agente único o en una terapia de combinación.

50 La presente invención proporciona también dosificaciones y programas de dosis de la vincristina liposómica para el tratamiento de tumores sólidos y no sólidos con menor toxicidad.

#### I. Cánceres tratables con vinca alcaloides encapsulados en lípidos

Los métodos descritos en la presente pueden emplearse para tratar cualquier tipo de cáncer. En particular, estos métodos pueden aplicarse a cánceres de los sistemas sanguíneo y linfático, que incluyen linfomas, leucemia, y mielomas.

En realizaciones preferidas, la presente vincristina encapsulada en liposomas se emplea para tratar cualquiera de un gran número de linfomas. Por ejemplo, pueden tratarse linfomas de Hodgkin y no hodgkinianos empleando los métodos descritos en la presente. En realizaciones particularmente preferidas, la vincristina encapsulada en liposomas se emplea para tratar el linfoma no hodgkiniano (NHL), que incluye cualquier tipo de NHL tal como se define según cualquiera de los diversos sistemas de clasificación, tales como la Working Formulation, la clasificación de Rappaport y, preferiblemente, la clasificación REAL. Estos linfomas incluyen, pero no se limitan a linfomas de bajo grado, de grado intermedio y de alto grado, así como linfomas de células B y de células T. En estas categorías se incluyen los diversos tipos de linfomas microcítico, macrocítico, de células hendidas, linfocítico, folicular, difuso, de Burkitt, de células de Mantle, de células NK, del SNC, relacionado con SIDA, linfoblástico, linfoblástico en adultos, indolente, agresivo, transformado y otros tipos de linfomas. La vincristina encapsulada en liposomas de la presente invención puede utilizarse para las formas de linfomas en adultos e infantiles, así como linfomas de cualquier estadio, por ejemplo, estadio I, II, III, o IV. Los diversos tipos de linfomas son muy conocidos por los expertos en la técnica y son descritos, por ejemplo, por the American Cancer Society (véase, por ejemplo, [www3.cancer.org](http://www3.cancer.org)).

Los métodos descritos en la presente también se aplican preferiblemente a cualquier forma de leucemia, que incluye las formas en adultos e infantiles de la enfermedad. Por ejemplo, la vincristina encapsulada en liposomas de la presente invención se emplea para su uso en el tratamiento de cualquier forma aguda, crónica, mielogenous, y linfocítica de la enfermedad. En realizaciones preferidas, la vincristina encapsulada en liposomas se emplea para tratar la leucemia linfocítica aguda (ALL). Puede encontrarse más información acerca de los diversos tipos de leucemia, entre otras fuentes, en the Leukemia Society of America (véase, por ejemplo, [www.leukemia.org](http://www.leukemia.org)).

También pueden tratarse otros tipos de tumores empleando los métodos descritos en la presente, tales como neuroblastomas, mielomas, cánceres de próstata, cáncer de pulmón microcítico, y otros.

## II. Tratamientos de primera línea

En numerosas realizaciones de la presente invención, la vincristina encapsulada en liposomas se empleará como tratamiento de primera línea para el cáncer. En realizaciones preferidas, la vincristina encapsulada en liposomas se emplea para tratar un linfoma, en particular un linfoma no hodgkiniano. Tal como se emplea en la presente, un "tratamiento de primera línea" se refiere a un tratamiento primario para un paciente que presenta un cáncer, en contraste con un cáncer en recaída o refractario.

En estas realizaciones, la vincristina encapsulada en liposomas puede utilizarse de modo individual o, preferiblemente, en combinación con otros agentes quimioterapéuticos, tales como ciclofosfamida, doxorubicina, y prednisona. Se prefiere particularmente el uso de la vincristina encapsulada en liposomas junto con ciclofosfamida, doxorubicina, y prednisona, formando con ello una formulación CHOP liposómica mejorada ("lipo-CHOP.")

Cuando se emplea como agente único en un tratamiento de primera línea, las dosificaciones y el programa de dosis son preferiblemente idénticos a los del tratamiento como agente único para el cáncer en recaída. Cuando se emplea en regímenes de combinación, las dosificaciones y el régimen de dosis pueden revisarse para que se correspondan con el régimen preferido para la combinación.

## III. Formas en recaída o refractarias de las enfermedades

La vincristina encapsulada en liposomas puede utilizarse para tratar formas de cáncer primarias, en recaída, transformadas, o refractarias. A menudo, los pacientes con cánceres en recaída se han sometido a uno o más tratamientos, que incluyen quimioterapia, terapia de radiación, trasplantes de médula ósea, terapia hormonal, cirugía, y similares. De los pacientes que responde a estos tratamientos, algunos pueden mostrar enfermedad estable, otros una respuesta parcial (es decir, el tumor o el nivel de un marcador del cáncer disminuye en al menos 50%), u otros una respuesta completa (es decir, el tumor, así como los marcadores, se hacen indetectables). En cualquiera de estos escenarios, el cáncer posteriormente puede reaparecer, lo cual significa una recaída en el cáncer.

En ciertas realizaciones, la vincristina encapsulada en liposomas se emplea en métodos para tratar un paciente que se ha sometido a una única sesión de tratamiento para un cáncer, que ha respondido parcial o completamente a dicho tratamiento, y posteriormente ha sufrido una recaída. En otras realizaciones, se tratan pacientes que se han sometido a más de una sesión de tratamiento, han respondido más de una vez, y posteriormente han sufrido más de una recaída. Las sesiones previas de tratamiento pueden incluir cualquier tratamiento anticáncer, que incluye quimioterapia, terapia de radiación, trasplante de médula ósea, etc.

En ciertas realizaciones de la presente invención, la vincristina se emplea contra ciertos cánceres "resistentes", es decir, cánceres que previamente han mostrado una respuesta completa a un tratamiento, pero que posteriormente manifiestan una resistencia a una segunda o posterior sesión de tratamiento.

## IV. Vinca alcaloides y otros alcaloides

Los vinca alcaloides incluyen, pero no se limitan a vinblastina, vincristina, vindolina, vindesina, vinleurosina, vinrosidina, vinorelbina, o sus derivados (véase, por ejemplo, the Merck Index, 11ª edición (1989), entradas 9887,

9891, y 9893, para la vinblastina, vincristina, y vindolina). Los ejemplos de otros alcaloides adecuados incluyen, pero no se limitan a las podofilinas, podofilotoxinas y sus derivados (por ejemplo etopósido, etopósido fosfato, tenipósido, etc.), las camptotecinas (por ejemplo, irinotecano, topotecano, etc.), los taxanos (taxol, etc.), y sus derivados. Todos los compuestos anteriores son muy conocidos por los expertos en la técnica y pueden adquirirse con facilidad en el mercado, obtenerse mediante síntesis o mediante purificación a partir de fuentes naturales.

El vinca alcaloide utilizado en la presente invención es vincristina. La vincristina, también conocida como sulfato de leurocristina, 22-oxovincalécoblastina, kiocristina, vincósido, vincrex, oncovina, Vincasar PFS®, o VCR, puede adquirirse en el mercado a partir de una serie de fuentes, por ejemplo Pharmacia & Upjohn, Lilly, IGT, etc. A menudo se suministra como sulfato de vincristina, por ejemplo como una disolución 1 mg/ml.

La presente invención puede comprender vincristina para su uso individual o coadministrada con otros vinca alcaloides. Además, la vincristina y cualquier otro vinca alcaloide puede combinarse con otros compuestos o moléculas, tales como otros agentes antineoplásicos. En ciertas realizaciones, estas combinaciones de vinca alcaloides y/u otros compuestos pueden prepararse antes de la formulación liposómica, creando con ello una combinación dentro de un único liposoma. En otras realizaciones, los vinca alcaloides encapsulados en liposomas se formulan y después se combinan con las otras moléculas que, a su vez, pueden estar en forma libre o encapsuladas en liposomas.

Cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en la presente, incluyendo los alcaloides encapsulados en liposomas, pueden someterse a ensayos preclínicos en modelos muy conocidos de enfermedades humanas. Los modelos *in vivo* de linfoma humano incluyen ratones que portan la línea de células B no hodgkinianas DoHH2 (Kluin-Nelemans H.C., *et al.* (1991), *Leukemia*, 5(3) 221-224), o ratones que portan xenoinjertos de células Daudi o Raji (véase, por ejemplo, Hudson, W.A. *et al.* (1998), *Leukemia* 12(12):2029-2033). También pueden emplearse muchos otros modelos oncológicos que son conocidos por los expertos en la técnica.

#### V. Lípidos

Puede utilizarse cualquiera de una serie de lípidos para preparar los liposomas de la presente invención, incluyendo lípidos anfipáticos, neutros, catiónicos y aniónicos. Estos lípidos pueden utilizarse por sí solos o en combinación, y también pueden incluir componentes estabilizantes de la bicapa, tales como oligómeros de poliamida (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EEUU "Oligómeros de poliamida", de Ansell, la solicitud de EEUU n.º de serie 09/218.988, presentada el 22 de diciembre, 1998), péptidos, proteínas, detergentes, derivados de lípidos, tales como PEG acoplado a fosfatidiletanolamina y PEG conjugado con ceramidas (véase, la solicitud de EEUU n.º de serie 08/485.608). En una realización preferida, también pueden incluirse agentes enmascarantes, que reducen la eliminación de los liposomas por el sistema inmunológico del hospedante, tales como conjugados de poliamida-oligómero, por ejemplo, ATTA-lípidos (véase, la solicitud de patente de EEUU n.º de serie 08/996.783, presentada el 2 de febrero, 1998) y conjugados de PEG-lípidos (véanse, las solicitudes de patente de EEUU n.º de serie 08/486.214, 08/316.407, y 08/485.608).

Puede incluirse cualquiera de una serie de lípidos neutros, lo cual quiere decir cualquiera de una serie de especies de lípidos que existen en una forma no cargada o neutra bipolar a pH fisiológico, que incluyen diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, colesterol, cerebrósidos, y diacilglicerol.

El lípido comprende esfingomielina y colesterol. La proporción de esfingomielina a colesterol está entre 75/25 (% molar de esfingomielina/% molar de colesterol) y 50/50 (% molar de esfingomielina/% molar de colesterol), preferiblemente entre aproximadamente 70/30 y 55/45 (% molar de esfingomielina/% molar de colesterol), y lo más preferiblemente de aproximadamente 55/45 (% molar de esfingomielina/% molar de colesterol). Sin embargo, estas proporciones pueden alterarse mediante la adición de otros lípidos en las presentes formulaciones.

Los lípidos catiónicos, que portan una carga neta positiva a pH fisiológico, pueden incorporarse con facilidad a los liposomas para su uso en la presente invención. Estos lípidos incluyen, pero no se limitan a cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio ("DODAC"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N-trietilamonio ("DOTMA"); bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio ("DDAB"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio ("DOTAP"); 3β-(N-(N',N'-dimetilaminoetan)carbamoil)colesterol ("DC-Chol"); trifluoroacetato de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N-2-(espermincarboxamido)etil-N,N-dimetilamonio ("DOSPA"); dioctadecilamidoglicilcarboxiespermina ("DOGS"); 1,2-dioleil-sn-3-fosfoetanolamina ("DOPE"); y bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxi-etilamonio ("DMRIE"). Además, puede utilizarse una serie de preparaciones comerciales de lípidos catiónicos, tales como LIPOFECTINA (que incluye DOTMA y DOPE, disponible en GIBCO/BRL), LIPOFECTAMINA (que comprende DOSPA y DOPE, disponible en GIBCO/BRL), y TRANSFECTAMO (que comprende DOGS, en etanol, de Promega Corp.).

Los lípidos aniónicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-dodecanoilfosfatidiletanolamina, N-succinilfosfatidiletanolamina, N-glutarilfosfatidiletanolamina, lisilfosfatidilglicerol, y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

En numerosas realizaciones se emplearán lípidos anfipáticos. Los "lípidos anfipáticos" se refieren a cualquier material adecuado, en el que la porción hidrófoba del material lipídico se orienta hacia una fase hidrófoba, mientras que la porción hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Estos compuestos incluyen, pero no se limitan a fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos. Los fosfolípidos representativos incluyen esfingomiélna, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoilfosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina, o dilinoleoilfosfatidilcolina. También pueden utilizarse otros compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glicosfingolípidos, diacilgliceroles, y  $\beta$ -aciloxiácidos. Además, estos lípidos anfipáticos pueden mezclarse con facilidad con otros lípidos, tales como triglicéricos y esteroides.

Los liposomas utilizados en la presente invención pueden ser multilaminares o unilaminares, y pueden formarse utilizando los métodos descritos en la presente y otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

También resultan adecuadas para su inclusión en la presente invención las formulaciones de lípidos de fusión programables. Estas formulaciones tienen poca tendencia a fusionarse con las membranas celulares y entregar su carga hasta que se produzca un acontecimiento de señalización concreto. Esto permite a la formulación de lípidos distribuirse con más uniformidad después de su inyección en un organismo o sitio de enfermedad antes de que comience a fusionarse con las células. El acontecimiento de señalización puede ser, por ejemplo, un cambio en el pH, la temperatura, el entorno iónico, o el tiempo. En este último caso, un componente de retraso en la fusión o "enmascarante", tal como un conjugado de ATTA-lípidos o un conjugado de PEG-lípidos, simplemente puede salir a través de la membrana del liposoma a lo largo del tiempo. En el momento en que la formulación se ha distribuido de forma adecuada en el cuerpo, ya ha perdido la cantidad suficiente de agente enmascarante como para ser fusogénica. Con otros acontecimientos de señalización, resulta deseable elegir una señal que esté asociada con el sitio de enfermedad o la célula diana, tal como una mayor temperatura en un sitio de inflamación.

#### VI. Fabricación de liposomas

Están disponibles una diversidad de métodos para preparar liposomas, según se describe, por ejemplo en Szoka, *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9:467 (1980), patentes de EEUU n.º 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028, 4.946.787, publicación PCT n.º WO 91/17424, Deamer y Bangham, Biochim. Biophys. Acta, 443:629-634 (1976); Fraley, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352 (1979); Hope, *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 812:55-65 (1985); Mayer, *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 858:161-168 (1986); Williams, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:242-246 (1988), el texto Liposomes, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1983, capítulo 1, y Hope, *et al.*, Chem. Phys. Lip., 40:89 (1986). Los métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a sonicación, extrusión, alta presión/homogenización, microfluidificación, diálisis con detergentes, fusión inducida por calcio de pequeñas vesículas de liposomas, y métodos de infusión con éter, siendo todos estos muy conocidos en la técnica.

Un método produce vesículas multilaminares de tamaños heterogéneos. En este método, los lípidos formadores de vesículas se disuelven en un disolvente orgánico adecuado o un sistema disolvente y se secan al vacío o en un gas inerte para formar una película fina de lípidos. Si se desea, la película puede redisolverse en un disolvente adecuado, tal como terc-butanol, y después liofilizarse para formar una mezcla de lípidos más homogénea que está en una forma similar a un polvo que se hidrata con más facilidad. Esta película se cubre con una disolución tamponada acuosa y se deja que se hidrate, generalmente a lo largo de un periodo de 15-60 minutos con agitación. La distribución de tamaño de las vesículas multilaminares resultantes puede desplazarse hacia tamaños más pequeños hidratando los lípidos bajo condiciones de agitación más vigorosas o añadiendo detergentes solubilizantes, tales como desoxicolato.

Pueden prepararse vesículas unilaminares mediante sonicación o extrusión. La sonicación se realiza en general con un sonificador de punta, tal como un sonificador de punta Branson, en un baño de hielo. Generalmente, la suspensión se somete a varios ciclos de sonicación. La extrusión puede realizarse mediante extrusores de biomembranas, tales como el extrusor de biomembranas Lipex. Un tamaño de poro definido en los filtros de extrusión puede generar vesículas unilaminares liposómicas de tamaños especificados. Los liposomas también pueden formarse mediante extrusión a través de un filtro cerámico asimétrico, tal como un microfiltro Ceraflow, disponible en el mercado en Norton Company, Worcester MA. También puede prepararse vesículas unilaminares disolviendo fosfolípidos en etanol y después inyectando los lípidos en un tampón, lo cual provoca que los lípidos formen espontáneamente vesículas unilaminares. Además, los fosfolípidos pueden solubilizarse en un detergente, por ejemplo colatos, Triton X, o n-alkilglucósidos. Después de la adición del fármaco a las micelas de detergentes-lípidos solubilizadas, el detergente se retira mediante cualquiera de una serie de posibles métodos, que incluyen diálisis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, centrifugación, y ultrafiltración.

Después de la preparación de los liposomas, los liposomas que no han sido calibrados durante la formación pueden calibrarse para lograr un intervalo de tamaño deseado y una distribución relativamente estrecha del tamaño de los liposomas. Un intervalo de tamaño de aproximadamente 0,2-0,4 micrómetros permite esterilizar la suspensión de liposomas mediante filtración a través de un filtro convencional. El método de esterilización con filtro puede realizarse con alta capacidad de procesamiento si los liposomas se han calibrado hasta aproximadamente 0,2-0,4 micrómetros.

Están disponibles varias técnicas para calibrar los liposomas hasta un tamaño deseado. Un método de calibración se describe en la patente de EEUU n.º 4.737.323. La sonicación de una suspensión de liposomas mediante una sonicación de baño o sonda produce una reducción de tamaño progresiva hasta conseguir pequeñas vesículas unilaminares con un tamaño menor que aproximadamente 0,05 micrómetros. La homogeneización es otro método que se basa en la energía de cizallamiento para fragmentar grandes liposomas en liposomas más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, las vesículas multilaminares se recirculan a través de un homogeneizador de emulsión convencional hasta que se observan los tamaños de liposomas seleccionados, generalmente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micrómetros. El tamaño de las vesículas liposómicas puede determinarse mediante dispersión de luz cuasieléctrica (QELS), tal como se describe en Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-450 (1981). El diámetro medio de los liposomas puede reducirse mediante sonicación de los liposomas formados. Pueden alternarse ciclos de sonicación intermitente con evaluación con QELS para orientar una síntesis eficaz de liposomas.

La extrusión de liposomas a través de una membrana de policarbonato de poros pequeños o una membrana cerámica asimétrica también es un método eficaz para reducir el tamaño de los liposomas para lograr una distribución de tamaño relativamente bien definida. Generalmente, la suspensión se hace pasar a través de la membrana una o más veces hasta que se logra la distribución de tamaño deseada de los liposomas. Los liposomas pueden extrusionarse a través de membranas de tamaño de poro cada vez más pequeño para lograr una reducción gradual en el tamaño de los liposomas. Para su uso en la presente invención, se prefieren liposomas con un tamaño que varía de aproximadamente 0,05 micrómetros a aproximadamente 0,40 micrómetros. En realizaciones particularmente preferidas, los liposomas están entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,2 micrómetros.

En realizaciones preferidas, se preparan liposomas vacíos utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Generalmente, tal como se analiza a continuación, los liposomas utilizados en la presente invención comprenden un potencial transmembrana, mediante el cual los agentes antineoplásicos, tales como los vinca alcaloides, pueden cargarse con eficacia en el liposoma y ser mantenidos en su interior. En realizaciones preferidas, el potencial se logra creando un gradiente de pH a través de la membrana. En realizaciones particularmente preferidas, el pH es menor en el interior del liposoma que en el exterior. Estos gradientes pueden lograrse, por ejemplo, formulando los liposomas en presencia de un tampón con un pH bajo, por ejemplo, que tenga un pH entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6, y después trasladando los liposomas a una disolución con pH mayor. En realizaciones preferidas, el pH está entre aproximadamente 3 y 5, y en las realizaciones más preferidas, el pH es de aproximadamente 4. Puede utilizarse cualquiera de una serie de tampones, tales como citrato.

Después, antes o después del calibrado, el pH externo puede aumentar, por ejemplo, de aproximadamente 7 o 7,5, mediante la adición de un tampón adecuado, tal como tampón fosfato de sodio. El aumento de pH externo crea un gradiente de pH a través de la membrana liposómica, estimulando con ello una carga y retención eficaz del fármaco.

Los liposomas preparados según estos métodos pueden conservarse durante periodos de tiempo sustanciales antes de la carga del fármaco y la administración a un paciente. Por ejemplo, los liposomas pueden deshidratarse, conservarse y después rehidratarse, cargarse con uno o más vinca alcaloides, y administrarse. La deshidratación puede lograrse, por ejemplo, empleando un aparato de liofilización convencional, es decir, se deshidratan bajo condiciones de presión baja. Además, los liposomas pueden congelarse, por ejemplo, en nitrógeno líquido, antes de la deshidratación. Pueden añadirse azúcares al entorno liposómico, por ejemplo, al tampón que contiene los liposomas, antes de la deshidratación, estimulando con ello la integridad del liposoma durante la deshidratación. Véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU n.º 5.077.056, o 5.736.155.

En numerosas realizaciones, los liposomas vacíos primero se formulan en un tampón de pH bajo, y después se manipulan mediante una de una diversidad de formas para obtener liposomas del tamaño deseado. Los métodos para calibrar liposomas incluyen sonicación, mediante baño o mediante sonda, u homogeneización. Preferiblemente, después de estos tratamientos, los liposomas tienen un tamaño de entre aproximadamente 0,05 a 0,45 micrómetros. Lo más preferiblemente, los liposomas tienen un tamaño de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,2 micrómetros. Estos liposomas calibrados entonces pueden esterilizarse mediante filtración. Además, la distribución del tamaño de partícula puede controlarse mediante discriminación del tamaño de partícula con haz de láser convencional o similares. Además, se conocen métodos para reducir el tamaño de los liposomas hasta una distribución de tamaño relativamente bien definida, por ejemplo, uno o más ciclos de extrusión de los liposomas a través de una membrana de policarbonato de poros pequeños o una membrana cerámica asimétrica.

#### VII. Preparación de los vinca alcaloides encapsulados en liposomas

Puede utilizarse cualquiera de una serie de métodos para cargar la vincristina y/u otros fármacos en los liposomas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, una técnica de encapsulación y un método de carga por el potencial transmembrana. La vincristina está presente de 0,1 mg/ml a 0,5 mg/ml. Preferiblemente, la vincristina está presente de aproximadamente 0,15 mg/ml a 0,2 mg/ml.

En una técnica de encapsulación, el fármaco y los componentes del liposoma se disuelven en un disolvente orgánico en el que todas las especies son miscibles y se concentran para formar una película seca. Entonces se añade un tampón a la película secada y se forman los liposomas, que tienen el fármaco incorporado en las paredes de la vesícula. Como alternativa, el fármaco puede colocarse en un tampón y añadirse a una película secada formada solo por componentes lipídicos. De esta manera, el fármaco se encapsulará en el interior acuoso del liposoma. El tampón que se emplea en la formación de los liposomas puede ser cualquier disolución tampón biológicamente compatible, por ejemplo, de disolución salina isotónica, disolución salina tamponada con fosfato, u otros tampones de baja fuerza iónica. Los liposomas resultantes que incluyen vincristina después pueden calibrarse como se describió anteriormente.

La carga por el potencial transmembrana se ha descrito en detalle en las patentes de EEUU n.º 4.885.172; 5.059.421; 5.171.578; y 5.837.282 (que indica la carga de ionóforos). Brevemente, el método de carga por el potencial transmembrana puede emplearse con casi cualquier fármaco convencional que pueda existir en un estado cargado cuando se disuelve en un medio acuoso apropiado. Preferiblemente, el fármaco será relativamente lipófilo de modo que se repartirá en las membranas liposómicas. Se crea un potencial transmembrana a través de las bicapas de los liposomas o de los complejos de proteína-liposoma, y el fármaco se carga en el liposoma por medio del potencial transmembrana. El potencial transmembrana se genera creando un gradiente de concentración para una o más especies cargadas (por ejemplo,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y/o  $\text{H}^+$ ) a través de las membranas. Este gradiente de concentración se genera produciendo liposomas que tengan diferentes medios interno y externo, y tiene un gradiente de protones asociado. Entonces puede producirse la acumulación del fármaco de una manera predicha por la ecuación de Henderson-Hasselbach.

Los métodos preferidos para preparar vincristina encapsulada en liposomas para su uso en la presente invención se analizan, por ejemplo, en las patentes de EEUU n.º 5.741.516, 5.814.335 y 5.543.152, cada una de las cuales está cedida a Inex Pharmaceuticals Corp. En una realización preferida, la vincristina liposómica se prepara antes del uso a partir de un kit que incluye 3 o más viales. Al menos uno de los viales contiene una disolución de vincristina que contiene, por ejemplo, 1 mg/ml, 2 mg/ml, o 5 mg/ml de sulfato de vincristina en tampón que contiene, por ejemplo, manitol 100 o 200 mg/ml (que puede obtenerse, por ejemplo en SP Pharmaceuticals LLC, Albuquerque, NM; también pueden emplearse otros excipientes que son farmacéuticamente aceptables y en los que la vincristina permanece estable durante largos periodos) y acetato de sodio ajustado a pH 3,5 a 5,5, o preferiblemente pH 4,5 a pH 4,7. Uno de los viales contiene una disolución que contiene liposomas que comprenden esfingomiolina y colesterol (cada uno de los cuales está disponible en el mercado, por ejemplo en NEN Life Sciences, Avanti Polar Lipids, etc.) y suspendidos en tampón citrato 300 mM, por ejemplo a pH 4,0. Otro vial o viales contienen un tampón fosfato alcalino (por ejemplo a pH 9,0), tal como fosfato de sodio dibásico 14,2 mg/ml (20 ml/vial).

En otras realizaciones preferidas, se emplea un kit que contiene 2 viales que contienen componentes que pueden emplearse para formular la vincristina encapsulada en liposomas reivindicada, o un kit que contiene 1 vial que contiene una preparación estable de liposomas que comprenden vincristina precargada. Estas preparaciones estables pueden obtenerse mediante cualquiera de una serie de formas, que incluyen, pero no se limitan a (1) una preparación hidratada conservada a temperatura ambiente o refrigerada, y que contiene una o más modificaciones o componentes para potenciar la estabilidad química, por ejemplo, antioxidantes; (2) una preparación hidratada que se congela e incluye un excipiente adecuado para proteger frente a los daños por la congelación y la descongelación; o (3) una preparación liofilizada. Generalmente, cualquiera de los kits descritos anteriormente contiene instrucciones para su uso, así como materiales desechables de limpieza.

Para preparar los liposomas, las disoluciones de sulfato de vincristina y liposomas se añaden cada una a un vial estéril y se mezclan en una proporción de concentración apropiada, por ejemplo, de 0,01/1,0 a 0,2/1,0 (peso de vinca alcaloide/peso de lípido). La mezcla se mezcla, por ejemplo, invirtiendo el vial múltiples veces. Después de la formación de los liposomas en un tampón de pH bajo, y antes o después de calibrar los liposomas, los liposomas se introducen en un tampón con un pH mayor, por ejemplo, un tampón fosfato de sodio, creando con ello un gradiente de pH a través de la superficie del liposoma. En realizaciones preferidas, el entorno externo de los liposomas tiene un pH entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5. Los liposomas y la vincristina pueden mezclarse durante un tiempo suficiente para lograr la proporción de alcaloide/lípido deseada. La mezcla puede mezclarse, por ejemplo, mediante múltiples inversiones, y calentarse a unas temperaturas entre aproximadamente 55 °C y aproximadamente 80 °C, preferiblemente entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 65 °C, durante aproximadamente 5, 10 o más minutos. Este tratamiento posibilita que más de aproximadamente 90% de la vincristina quede atrapada dentro del liposoma.

En otras realizaciones, estas etapas se siguen a mayor escala, y la vincristina liposómica cargada se suministra, por ejemplo, a la farmacia de un hospital en un formato listo para administrar. Estas formulaciones a mayor escala pueden prepararse a partir de diferentes materiales de partida que los descritos para el kit; en particular, los tampones pueden ser diferentes.

#### VIII. Transporte dirigido de los liposomas

En ciertas realizaciones, resulta deseable dirigir los liposomas de esta invención empleando restos de transporte dirigido que son específicos de un tipo de célula o tejido. El transporte dirigido de liposomas empleando una

diversidad de restos de transporte dirigido, tales como ligandos, receptores de la superficie celular, glicoproteínas, vitaminas (por ejemplo, riboflavina) y anticuerpos monoclonales se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, las patentes de EEUU n.º 4.957.773 y 4.603.044). Los restos de transporte dirigido pueden comprender la proteína completa o sus fragmentos.

- 5 Los mecanismos de transporte dirigido generalmente requieren que los agentes de transporte dirigido se coloquen sobre la superficie del liposoma de tal manera que el resto de transporte dirigido esté disponible para la interacción con la diana, por ejemplo, un receptor de la superficie celular. El liposoma se diseña para que incorpore una porción conectora en la membrana en el momento de la formación del liposoma. La porción conectora debe tener una porción lipófila que esté firmemente incrustada y anclada en la membrana. También debe tener una porción hidrófila que esté químicamente disponible sobre la superficie acuosa del liposoma. La porción hidrófila se selecciona de modo que sea químicamente adecuada para el agente de transporte dirigido, de forma que la porción y el agente formen un enlace químico estable. Por tanto, la porción conectora normalmente se extiende hacia fuera de la superficie liposómica y está configurada para colocar correctamente al agente de transporte dirigido. En algunos casos, es posible unir el agente de transporte dirigido directamente a la porción conectora, pero en muchos casos es más adecuado emplear una tercera molécula que actúa como "puente molecular." El puente une la porción conectora y el agente de transporte dirigido fuera de la superficie del liposoma, con lo cual el agente de transporte dirigido está disponible para la interacción con la diana celular.

20 Pueden emplearse métodos convencionales para acoplar los agentes de transporte dirigido. Por ejemplo, puede emplearse fosfatidiletanolamina, que puede activarse para la unión de agentes de transporte dirigido, o compuestos lipófilos derivatizados, tales como bleomicina derivatizada con lípidos. Pueden construirse liposomas dirigidos por anticuerpos empleando, por ejemplo liposomas que incorporan la proteína A (véase Renneisen, *et al.*, J. Bio. Chem., 265:16337-16342 (1990), y Leonetti, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 87:2448-2451 (1990). Otros ejemplos de conjugación de anticuerpos se describen en la solicitud de patente de EEUU n.º 08/316.394, presentada el 30 de septiembre, 1994. Los ejemplos de restos de transporte dirigido también incluyen otras proteínas, específicas de componentes celulares, que incluyen antígenos asociados con neoplasmas o tumores. Las proteínas empleadas como restos de transporte dirigido pueden unirse a los liposomas a través de enlaces covalentes (véase Heath, Covalent Attachment of Proteins to Liposomes, 149, Methods in Enzymology, 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Otros métodos de transporte dirigido incluyen el sistema de biotina-avidina.

#### IX. Administración de vinca alcaloides encapsulados en lípidos

- 30 Los vinca alcaloides encapsulados en lípidos pueden administrarse a través de una serie de vías, que incluyen la vía parenteral, intravenosa, sistémica, local, intratumoral, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, por inhalación, o cualquier otro método de administración de este tipo. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía intravenosa mediante inyección. En una realización, un paciente recibe una infusión intravenosa de la vincristina encapsulada en liposomas (agente único) a través de una línea intravenosa a lo largo, por ejemplo, de 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, o más. En realizaciones preferidas, se emplea una infusión de 60 minutos. Estas infusiones pueden administrarse periódicamente, por ejemplo, una vez cada 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, o 28 días o más, preferiblemente una vez cada 7-21 días, y lo más preferiblemente una vez cada 14 días. Tal como se emplea en la presente, cada administración de un vinca alcaloide liposómico se considera una "sesión" de tratamiento.

40 La formulación adecuada para su uso en la presente invención puede encontrarse, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª ed. (1985). A menudo, las composiciones intravenosas comprenden una disolución de los liposomas suspendida en un vehículo aceptable, tal como un vehículo acuoso. Puede utilizarse cualquiera de una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, disolución salina al 0,4%, disolución salina isotónica al 0,9%, glicina al 0,3%, dextrosa al 5%, y similares, y pueden incluir glicoproteínas para potenciar la estabilidad, tales como albúmina, lipoproteínas, globulina, etc.. A menudo se empleará disolución salina tamponada normal (NaCl 135-150 mM). Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, tales como filtración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes para el ajuste del pH y tamponantes, agentes para ajustar la tonicidad, agentes humectantes, y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, etc. Estas composiciones pueden esterilizarse empleando las técnicas indicadas anteriormente, o pueden producirse bajo condiciones estériles. La concentración de los liposomas en el vehículo puede variar. En general, la concentración será de aproximadamente 20-200 mg/ml, aunque los expertos en la técnica pueden variar la concentración para optimizar el tratamiento con diferentes componentes de los liposomas o para pacientes concretos. Por ejemplo, la concentración puede aumentar para disminuir la carga de fluido asociado con el tratamiento.

60 La cantidad de vincristina administrada por dosis se selecciona para que sea mayor que la dosis terapéutica mínima, pero menor que una dosis tóxica. La elección de la cantidad por dosis dependerá de una serie de factores, tales como la historia médica del paciente, el uso de otras terapias, y la naturaleza de la enfermedad. En ciertas realizaciones, inicialmente se administrará una dosis baja, que puede aumentar en base a la respuesta y/o tolerancia del paciente a la dosis inicial. Por ejemplo, pueden administrarse 1,5, 2,0, 2,4 mg/m<sup>2</sup> (es decir, mg de vinca alcaloide, por ejemplo vincristina, por m<sup>2</sup> de superficie específica corporal) o concentraciones mayores. En realizaciones

preferidas, se administra a los pacientes una dosis de 2,0 mg/m<sup>2</sup>, que se corresponde con una dosis de lípido de aproximadamente 40 mg/m<sup>2</sup> o aproximadamente 1,1 mg/kg de lípido y 0,05 mg/kg de vincristina para un paciente medio de 70 kg, o de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 6 mg de vincristina por dosis.

5 Los pacientes generalmente reciben al menos 2 sesiones de dicho tratamiento, y potencialmente más, dependiendo de la respuesta del paciente al tratamiento. En regímenes de un solo agente, las sesiones totales de tratamiento dependerá del paciente y del médico, basándose en las respuestas y toxicidad observadas. Hasta 12 sesiones de tratamiento, una vez cada 14 días, han demostrado conseguir unas respuestas satisfactorias en el paciente. Un número mayor puede estar justificado en ciertos casos. De modo similar, el número de sesiones de tratamiento empleando lipo-CHOP dependerá del paciente y del médico.

10 Debido a que las dosificaciones de vincristina están limitadas por la neurotoxicidad en seres humanos, a menudo resulta útil coadministrar la vincristina liposómica con un tratamiento para la neurotoxicidad. Este tratamiento puede ser profiláctico o terapéutico. Un ejemplo es la administración de gabapentina Neurontin™ (Parke-Davis)™ o neurotonina, para el tratamiento del dolor neuropático, por ejemplo, se administran 100-200 mg de Neurontin™ 3 veces diarias a un paciente adulto. Si el dolor neuropático mejora, entonces pueden continuar los tratamientos con vincristina liposómica. Debido a que este tipo de tratamiento profiláctico o terapéutico está previsto solo para tratar los efectos secundarios de la vincristina liposómica, se considera separadamente de las terapias de combinación indicadas a continuación.

20 Esta invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que, por contraste con los vinca alcaloides en forma libre, los vinca alcaloides encapsulados en liposomas pueden administrarse sin un límite en la dosificación total. Por ejemplo, mientras que la vincristina en forma libre generalmente se administra con un límite de 2,0 mg, la vincristina encapsulada en liposomas puede administrarse a una dosificación constante, preferiblemente de 2,0 mg/m<sup>2</sup>. Por tanto, para un paciente típico de superficie específica de 1,5 a 3,0 m<sup>2</sup>, puede administrarse una dosis de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 6,0 mg de vincristina.

#### X. Terapias de combinación

25 En numerosas realizaciones, la vincristina encapsulada en liposomas se empleará en un método en el que se administra en combinación con uno o más compuestos o terapias adicionales. Por ejemplo pueden coadministrarse múltiples vinca alcaloides, o pueden administrarse uno o más vinca alcaloides junto con otro compuesto terapéutico, tal como ciclofosfamida, doxorrubicina, prednisona, otros alcaloides, tales como los taxanos, camptotecinas y/o podofilinas, otros agentes quimioterapéuticos, tales como fármacos antisentido o vacunas antitumorales. En una realización preferida, la vincristina encapsulada en liposomas se coadministra con ciclofosfamida, doxorrubicina, y prednisona. En ciertas realizaciones, se cargan múltiples compuestos en los mismos liposomas. En otras realizaciones, la vincristina encapsulada en liposomas se forma de modo individual y después se combina con otros compuestos para una única coadministración. Como alternativa, ciertas terapias se administran secuencialmente en un orden predeterminado, tal como en CHOP o lipo-CHOP. La vincristina encapsulada en liposomas también puede formularse en una combinación CVP, o ciclofosfamida-vincristina-prednisona.

La vincristina encapsulada en liposomas también puede combinarse con agentes antitumorales, tales como anticuerpos monoclonales que incluyen, pero no se limitan a Oncolym™ (Techniclone Corp. Tustin, CA) o Rituxan™ (IDEC Pharmaceuticals), Bexxar™ (Coulter Pharmaceuticals, Palo Alto, CA), o IDEC-Y2B8 (IDEC Pharmaceuticals Corporation).

40 Además, la vincristina encapsulada en liposomas puede administrarse junto con uno o más tratamientos no moleculares, tales como terapia de radiación, trasplante de médula ósea, terapia hormonal, cirugía, etc.

45 En una realización preferida, la vincristina encapsulada en liposomas se administra en combinación con un compuesto o terapia anticáncer que proporciona una mayor mejoría o una mejoría sinérgica en la reducción del tumor basándose en el mecanismo de acción y los perfiles de toxicidad no solapantes. En particular, la vincristina liposómica puede administrarse con un taxano, que opcionalmente también puede ser un taxano liposómico. Aunque se cree que los vinca alcaloides despolimerizan los microtúbulos y los taxanos estabilizan los microtúbulos, se ha descubierto que los dos compuestos actúan de modo sinérgico para alterar el crecimiento tumoral, probablemente debido a que ambos están implicados en la inhibición de la dinámica de los microtúbulos. Véase, Dumontet, C. y Sikic, B.I. (1999), J. Clin Onc., 17(3), 1061-1070. Por tanto, las formulaciones liposómicas de vincristina según la presente invención disminuyen la toxicidad mieloide y neurológica asociada con la administración secuencial de vinca alcaloides y taxano en forma libre.

Pueden emplearse otras terapias de combinación conocidas por los expertos en la técnica junto con los métodos proporcionados en la presente.

#### Ejemplos

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

**Ejemplo 1: Fabricación de vincristina encapsulada en liposomas**

Se preparó vincristina encapsulada en liposomas (inyección de liposomas de sulfato de vincristina) empleando un kit de seis viales. Los viales 1 y 2 contenían una disolución de sulfato de vincristina (1 mg/ml de Vincasar PFS<sup>®</sup>, SP Pharmaceuticals LLC, Albuquerque, NM) en un tampón que comprendía manitol y acetato de sodio, pH 4,5-4,7, el vial 3 contenía liposomas vacíos (100 mg/ml de liposomas de esfingomielina/colesterol, a una proporción de entre aproximadamente 60/40 a 50/50, o más preferiblemente 55/45 % molar/% molar) en un tampón que comprendía citrato 300 mM a pH 4,0, los viales 4 y 5 contenían un tampón fosfato alcalino (14,2 mg/ml de fosfato de sodio dibásico heptahidrato), y el vial 6 era un vial estéril vacío. Los anteriores liposomas vacíos se prepararon utilizando las técnicas de hidratación de película fina y de extrusión convencional, según se describe en la patente de EEUU n.º 5.741.516.

Se retiraron 4 ml de sulfato de vincristina de los viales 1 y 2, y se añadieron al vial estéril 6. Después se retiraron 0,8 ml de los liposomas de esfingomielina/colesterol del vial 3 y se añadieron al vial 6. El vial 6 se invirtió cinco veces para mezclar los materiales. Se añadieron 20 ml de la disolución de fosfato de sodio de los viales 4 y 5 al vial 6. El vial 6 de nuevo se invirtió cinco veces, sin agitación, para mezclar los materiales. El vial 6 después se calentó en un baño de agua a 60-65 °C durante cinco minutos, tras lo cual el vial de nuevo se invirtió cinco veces. El vial de nuevo se calentó durante cinco minutos y se invirtió cinco veces más.

El producto final contenía 0,16 mg/ml de sulfato de vincristina y 3,2 mg/ml de lípidos totales.

**Ejemplo 2: Vincristina encapsulada en liposomas en métodos de NHL en recaída**

Se incluyeron 50 pacientes con linfoma no hodgkiniano (NHL) en recaída, y 1 con linfoma linfoblástico de adultos (ALL) en este estudio. Cada paciente tenía al menos 16 años de edad, no tenía VIH ni ninguna otra infección grave, no presentaba ninguna enfermedad del sistema nervioso central, y presentaba una función renal normal y neutrófilos al menos 0,5K, y plaquetas al menos 50K. Cada paciente recibió hasta 12 dosis de 2,0 mg/m<sup>2</sup> de vincristina liposómica intravenosa administrada una vez cada 14 días. Los liposomas utilizados comprendían esfingomielina y colesterol.

**Resultados**

Se evaluaron 35 de los 51 pacientes. La mediana de edad de estos 35 pacientes era de 62 años (intervalo de 19-86), y 21 de los pacientes eran hombres. Doce de los pacientes presentaban NHL folicular, 7 presentaban la forma transformada, 11 presentaban la forma macrocítica difusa, 3 presentaban la forma de células de Mantle, 1 presentaba la forma de células NK, y uno ALL. El grado clínico era alto en 1, agresivo en 17, indolente en 10, y transformado en 7 pacientes. La LDH sérica era alta en 16 de 35 pacientes, y la microglobulina B2 era mayor que 3,0 mg/l en 19 de 30 pacientes. La mediana del número de regímenes terapéuticos previos era de 3 (intervalo de 1-10). Dieciocho de los 35 pacientes fueron refractarios al régimen inmediatamente anterior a la vincristina encapsulada en liposomas. Los 35 habían recibido previamente una administración de vincristina. Para los 34 pacientes con NHL, 14 pacientes mostraron una respuesta completa o parcial, para una tasa de respuesta global del 40% (95% de intervalo de confianza: 24%-58%). Las respuestas según el grado clínico se muestran en la tabla 1.

|   | Indolente | Transformado | Agresivo | Transformado o agresivo |
|---|-----------|--------------|----------|-------------------------|
| n.º de pacientes                                    | 10        | 7            | 17       | 24                      |
| n.º de respondedores (respuesta completa o parcial) | 1         | 5            | 8        | 13                      |
| % de respuesta completa o parcial                   | 10        | 71           | 47       | 54                      |
| 95% de intervalo de confianza                       | 1-45      | 29-96        | 23-72    | 33-74                   |

**Conclusiones**

La mediana de la duración de la respuesta fue de 4 meses. El hecho de que la mitad de los pacientes respondedores mantuvieron la respuesta durante al menos 4 meses después del tratamiento es una respuesta sorprendente, inesperada e impresionante desde el punto de vista clínico para un grupo heterogéneo de pacientes a los que previamente se les habría adjudicado una prognosis muy mala.

Los anteriores resultados demuestran que pueden administrarse dosis completas de vincristina liposómica en NHL en recaída con una buena actividad, incluso en poblaciones muy pretratadas.

Además, la vincristina liposómica ha demostrado una toxicidad no específica significativamente menor que la vincristina libre. La neurotoxicidad periférica es el efecto tóxico más frecuente y limitante de la dosis de la vincristina

libre. Los efectos neuropáticos periféricos habitualmente comienzan en adultos que reciben una dosis total de 5 a 6 mg (2-3 dosis de vincristina libre) y en general son significativos después de una dosis acumulada de 15-20 mg (8-10 dosis de vincristina libre). De manera significativa, en el presente estudio un paciente típico recibió 3-5 mg en una sola dosis, y se administraron unas dosis acumuladas de hasta 37 mg, sin que ninguno de los pacientes presentase una significativa neurotoxicidad periférica inducida por vincristina liposómica. Es probable que sean toleradas dosis totales incluso mayores. Estas dosis mayores son muy deseables para la gestión de NHL, y representan un paso adelante significativo y sorprendente en el tratamiento de esta enfermedad.

**Ejemplo 3: Uso de los vinca alcaloides liposómicos como tratamiento de primera línea para linfomas**

Este ejemplo ilustra el uso de vinca alcaloides liposómicos como tratamiento de primera línea, en combinación con otros quimioterapéuticos, para el tratamiento de pacientes que presentan linfomas, en particular linfoma no hodgkiniano (de bajo grado o de grado intermedio). Los pacientes que presentan NHL transformado o agresivo pueden recibir este tratamiento de combinación mejorado como tratamiento de primera línea, o el médico puede preferir un tratamiento con el agente OncoTCS™ por sí solo como se describió en los ejemplos previos. El régimen de terapia de combinación indicado a continuación aprovecha el resultado sorprendente de que pueden administrarse unas dosis mucho mayores de vincristina cuando se administran en los liposomas de la presente invención, con una toxicidad muy reducida.

El régimen de combinación preferido es un régimen CHOP mejorado ("Lipo-CHOP") que comprende: Ciclofosfamida, Hidroxi-daunorrubicina (doxorubicina), OncoTCS™, y Prednisona. Un ciclo de tratamiento dura aproximadamente 5 días, y los ciclos se repiten aproximadamente cada 21-28 días. Un ejemplo de ciclo consiste en:

- 20 Ciclofosfamida (750 mg/m<sup>2</sup> IV, d 1)
- Hidroxi-daunorrubicina (50 mg/m<sup>2</sup> N, d 1)
- OncoTCS™ (2,0 mg/m<sup>2</sup> Rev, d 1, (no es necesario un límite))
- Prednisona (100 mg PO qd x 5 day)

Los tratamientos se realizan con las mismas intervenciones asistenciales requeridas para el tratamiento CHOP convencional.

Se espera que los pacientes que recibieron el tratamiento CHOP mejorado muestren una mejora significativa frente al CHOP convencional en las tasas de remisión parcial y completa, el periodo de remisión/tiempo hasta la recaída después del tratamiento, y mediana de tiempo de supervivencia.

**Ejemplo 4: Tratamiento de linfomas con vincristina liposómica como agente único**

30 En otro estudio, 50 pacientes humanos que presentan diferentes clases de linfoma fueron tratados con vincristina liposómica como agente único, según se describe en el ejemplo 2. Los resultados se indican en la siguiente tabla:

|                                    | Primera recaída desde RC | Refractario primario | Post-ABMT | ≥ 2 recaídas | Población del estudio multicéntrico |
|------------------------------------|--------------------------|----------------------|-----------|--------------|-------------------------------------|
| n.º de pacientes evaluables        | 11                       | 11                   | 10        | 26           | 36                                  |
| n.º RC                             | 4                        | 0                    | 0         | 0            | 0                                   |
| n.º RP                             | 4                        | 0                    | 2         | 10           | 12                                  |
| Tasa de respuesta global (%)       | 73                       | 0                    | 20        | 38           | 33                                  |
| 95% de intervalos de confianza (%) | 39 a 95                  | 0 a 28               | 1 a 32    | 20 a 59      |                                     |

18% de neurotoxicidad de grado 3 a 4 neurotoxicity; no se produjeron muertes tóxicas.

RC = respuesta completa

RP = respuesta parcial

Refractario primario significa que no se observó una respuesta al tratamiento inicial.

ABMT = Transplante de médula ósea autólogo

De nuevo, estos resultados demuestran que el tratamiento con vincristina liposómica como agente único es un excelente tratamiento para los linfomas. Estos resultados sugieren con fuerza un papel para la vincristina liposómica en Lipo-CHOP y para el tratamiento de primera línea de los linfomas con un único agente.

**Ejemplo 5: Otros estudios**

- 5 La figura 1 proporciona los resultados de un ensayo clínico que emplea los métodos descritos en la presente, que demuestra que los presentes métodos son particularmente eficaces para el tratamiento de las formas indolentes, transformadas, en recaída, y agresivas después de un trasplante de médula ósea (BMT) del linfoma no hodgkiniano.

**Ejemplo 6: Respuesta a la vincristina liposómica por número de regímenes anteriores**

- 10 La figura 2 proporciona los resultados que muestran el número de pacientes evaluables con NHL agresivo en recaída, el número de dichos pacientes que muestran una remisión o respuesta completa (RC), el número de dichos pacientes que muestran una remisión o respuesta parcial (RP), el porcentaje que muestra una RC o una RP, y el 95% de intervalo de confianza para cada valor porcentual. Estos datos se presentan para pacientes que han recibido un tratamiento previo, dos o más tratamientos previos y, dentro de esta última categoría, los que respondieron al
- 15 tratamiento inmediatamente previo al estudio y los que no respondieron al tratamiento previo.

Este estudio demuestra que los presentes métodos son inesperadamente eficaces para tratar cada categoría de pacientes.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Vincristina encapsulada en liposomas para su uso en un método para tratar un cáncer, en la que los liposomas comprenden esfingomielina y colesterol en una proporción de entre 75/25% molar de esfingomielina/% molar de colesterol y and 50/50% molar de esfingomielina/% molar de colesterol, y vincristina a una concentración de 0,1 a 0,5 mg/ml, y en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra por vía intravenosa a una dosificación mayor que 1,4 mg/m<sup>2</sup>.
2. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de la reivindicación 1, en la que la proporción de esfingomielina a colesterol está entre 70/30 y 55/45% molar de esfingomielina/% molar de colesterol, o aproximadamente 55/45% molar de esfingomielina/% molar de colesterol.
- 10 3. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de la reivindicación 1o 2, en la que la concentración de vincristina es de 0,15 a 0,2 mg/ml.
4. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra a una dosificación de 1,5 mg/m<sup>2</sup>, 2,0 mg/m<sup>2</sup>, o 2,4 mg/m<sup>2</sup>.
- 15 5. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra a una dosis de 3 a 6 mg.
6. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra durante hasta 12 sesiones de tratamiento.
- 20 7. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra una vez cada 7 a 21 días, o cada 14 días.
8. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de la reivindicación 6, en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra mediante infusión intravenosa a lo largo de 30 minutos, a lo largo de 60 minutos, o a lo largo de 90 minutos o más.
- 25 9. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de la reivindicación 6, en la que la vincristina encapsulada en liposomas se administra mediante infusión intravenosa cada 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 o 28 días, o cada 7 a 21 días.
- 30 10. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el cáncer es un linfoma, leucemia o mieloma, o es un linfoma no hodgkiniano (NHL) o leucemia linfocítica aguda (ALL).
11. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha vincristina encapsulada en liposomas se coadministra con al menos otro compuesto o terapia.
- 35 12. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de la reivindicación 11, en la que dicho otro compuesto o terapia se selecciona de terapia de radiación, trasplante de médula ósea, terapia hormonal, cirugía, ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, un taxano, una camptotecina, una podofilina, un anticuerpo antitumoral, un fármaco antisentido, y una vacuna antitumoral.
- 40 13. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de la reivindicación 11, en la que dicho otro compuesto o terapia se selecciona del grupo que consiste en ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, y sus combinaciones.
14. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha vincristina encapsulada en liposomas se coadministra con un tratamiento para la neurotoxicidad.
- 45 15. La vincristina encapsulada en liposomas para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha vincristina es sulfato de vincristina.
- 50 16. El uso de vincristina encapsulada en liposomas para la preparación de un medicamento para tratar un cáncer, en el que los liposomas comprenden esfingomielina y colesterol en una proporción de entre 75/25% molar de esfingomielina/% molar de colesterol y and 50/50% molar de esfingomielina/% molar de colesterol, y vincristina a una concentración de 0,1 a 0,5 mg/ml, y en el que la vincristina encapsulada en liposomas se formula para la administración intravenosa a una dosificación mayor que 1,4 mg/m<sup>2</sup>.

|                               | INDOLENTE | TRANSFORMADO | LINFOMA EN RECAÍDA | REFRACTARIO AGRESIVO | AGRESIVO POST-BMT |
|-------------------------------|-----------|--------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| EVALUABLE                     | 18        | 16           | 37                 | 11                   | 10                |
| RC/RP                         | 1         | 5            | 18                 | 0                    | 2                 |
| % DE RESPUESTA                | 6         | 31           | 49                 | 0                    | 20                |
| 95% DE INTERVALO DE CONFIANZA | 0-28      | 11-59        | 32-66              | 0-28                 | 1-32              |

FIG. 1.

|                               | 1 Rx  | > 2 Rx | > 2, RESPONDE AL ÚLTIMO Rx | > 2, NO RESPONDE AL ÚLTIMO Rx |
|-------------------------------|-------|--------|----------------------------|-------------------------------|
| EVALUABLE                     | 11    | 26     | 8                          | 18                            |
| RC                            | 4     | --     | --                         | --                            |
| RP                            | 4     | 10     | 3                          | 7                             |
| % DE RESPUESTA                | 73    | 38     | 38                         | 39                            |
| 95% DE INTERVALO DE CONFIANZA | 39-95 | 20-59  | 9-76                       | 17-64                         |

FIG. 2.