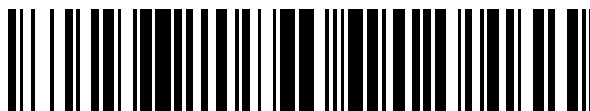


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 621**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4745** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 47/04** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2006.01)  
**A61K 47/24** (2006.01)  
**A61K 47/30** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2005 PCT/JP2005/009953**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2005 WO05117878**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2005 E 05745848 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 1752150**

54 Título: **Preparación de irinotecán**

30 Prioridad:

**01.06.2004 JP 2004163742**

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

**21.12.2016**

73 Titular/es:

**KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (100.0%)  
1-19, Higashi Shimbashi 1-chome, Minato-ku  
Tokyo 105-8660, JP**

72 Inventor/es:

**YOSHINO, KEISUKE;  
NOZAWA, SHIGENORI;  
ISOZAKI, MASASHI;  
SAWADA, SEIGO;  
KATO, IKUO y  
MATSUZAKI, TAKESHI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 594 621 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

Preparación de irinotecán

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una formulación de irinotecán que incluye un liposoma que incorpora irinotecán y/o una sal del mismo a alta concentración y a una composición farmacéutica que contiene el mismo.

## 10 Antecedentes de la invención

Una categoría de productos farmacéuticos a utilizar en el tratamiento contra el cáncer es un inhibidor de la topoisomerasa, y ejemplos de los mismos incluyen camptotecina. La camptotecina es un alcaloide penta-cíclico, que se ha extraído y aislado de *Camptotheca acuminata* (una planta originaria de China), por Wall *et al.* (EE. UU.) en 1966, y se descubrió que poseía una elevada actividad antineoplásica y un amplio espectro antineoplásico (documento 1 no relacionado con patentes). Un agente de quimioterapia contra el cáncer convencional ejerce una actividad antineoplásica por inhibición de la topoisomerasa II, mientras que la camptotecina inhibe una función enzimática de la topoisomerasa que desempeña un papel en la replicación del ADN, reparación, recombinación génica, y transcripción por inhibición de la topoisomerasa I.

20 Camptotecina posee algunos problemas de uso como fármaco. Entre ellos, con respecto a la insolubilidad en agua, se han propuesto algunos análogos de camptotecina solubles en agua, cada uno de estos mejoró en términos de insolubilidad (véase, por ejemplo, el documento de Patente 1). En particular, el clorhidrato de irinotecán (CPT-11), que es un derivado de camptotecina soluble en agua y se puso en el mercado en 1994 en Japón, es un profármaco y ejerce una alta actividad antineoplásica, por lo que era muy esperado en campos clínicos. Tras la administración, el clorhidrato de irinotecán, que es un profármaco, se metaboliza en SN-38, que es un metabolito activo, y ejerce actividad antineoplásica.

30 Mientras tanto, cuando se administran irinotecán y una sal del mismo, se provocan efectos secundarios graves, tales como disfunción de la médula ósea y problemas gastrointestinales. Por lo tanto, su uso está estrictamente restringido. Además, existe un problema de que una actividad antineoplásica se reduce por hidrólisis de un anillo de  $\alpha$ -hidroxilactona debido a la sensibilidad en un entorno acuoso, que es único a camptotecina y un análogo de la misma.

35 Para tratar de resolver los problemas anteriores y llevar a cabo el tratamiento óptimo contra el cáncer utilizando un análogo de camptotecina como el antimetabolito específico al ciclo celular, es necesario mantener la concentración local del fármaco durante un periodo de tiempo prolongado. No obstante, es un hecho que un fármaco de este tipo posea una semivida de apenas varias horas tras la administración intravenosa o la administración subcutánea. El fármaco es útil como agente de control de liberación que puede utilizarse para administrar un agente farmacéutico que tiene una concentración terapéutica. Un enfoque para resolver estos problemas, administrar un análogo de camptotecina de forma estable y eficaz en un sitio de lesión diana, y ejercer una actividad antineoplásica en un sitio de lesión diana es incorporar el fármaco en un transportador que tiene forma de vesícula cerrada. Se han hecho ya algunas propuestas sobre la formación de una formulación liposomal que incluye camptotecinas. Por ejemplo, se ha informado que, cuando camptotecina se incluye en una membrana liposomal, la hidrólisis de un anillo  $\alpha$ -hidroxilactona se suprime (véanse, por ejemplo, el documento de Patente 2 y el documento 2 no relacionado con patentes). Además, se ha divulgado un método que causa que una membrana liposomal contenga SN-38 en sí, que es un cuerpo principal activo de clorhidrato de irinotecán (documentos 3 y 4 no relacionados con patentes). Sin embargo, SN-38 es difícil de estabilizar en una membrana liposomal y desaparece rápidamente en la sangre, por lo que resulta complicado que la concentración de SN-38 en plasma se mantenga durante tiempo prolongado.

50 Se ha informado asimismo de un ejemplo de fabricación basado en un método habitual en el que el clorhidrato de irinotecán (un derivado soluble en agua) se encierra en un liposoma por el método de carga pasiva y se estabiliza fijándolo electrostáticamente en la membrana de tipo bicapa lipídica (documento 5 no relacionado con patentes).

55 Documento de patente 1: JP 3-4077 B

Documento de patente 2: JP 9-504517 A

Documento 1 no relacionado con patentes: *Am. Chem. Soc.*, 94 (1966), 388

Documento 2 no relacionado con patentes: Tomas G. Burke *et al.*, *Biochemistry*, 32 (1993), 5352-5364

Documento 3 no relacionado con patentes: W. Gao *et al.*, *J. of Chromatography B*, 791 (2003), 85-92

60 Documento 4 no relacionado con patentes: Joshua Williams *et al.*, *J. of Controlled Release*, 91 (2003), 167-172

Documento 5 no relacionado con patentes: Yasuyuki Sazuka *et al.*, *Cancer Letter* 127 (1998), 99-106

El documento WO 03/041682 A2 se dirige a composiciones transportadoras lipídicas como liposomas. Se describe una preparación liposomal que comprende floxuridina (FUDR) e irinotecán.

65

El documento US 2003/091621 A1 se dirige a la encapsulación de fármacos en liposomas. Este documento también describe formulaciones liposomales que encapsulan irinotecán.

5 El documento WO 03/028696 A2 se dirige a composiciones farmacéuticas para la administración de combinaciones de fármacos. Las composiciones comprenden vehículos de administración como liposomas. Se describe una composición que comprende irinotecán.

Divulgación de la invención

10 Problemas a resolver por la invención

15 La cantidad de clorhidrato de irinotecán a incorporar en un liposoma por el método anteriormente descrito de encapsulación de clorhidrato de irinotecán (el método de carga pasiva) que ya se ha informado es de aproximadamente 0,05 (fármaco (mol)/lípidos total (mol)). Con tal cantidad incorporada, la concentración de clorhidrato de irinotecán en plasma y la concentración de SN-38, que es un metabolito activo del mismo, difícilmente se mantienen durante un tiempo prolongado, y estas cantidades no son suficientes para efectos clínicos. Aunque la retención de clorhidrato de irinotecán en sangre es mejorada por la formación liposomal, la concentración de SN-38, que es un metabolito activo en plasma, apenas se mantiene durante mucho tiempo puesto que la velocidad de eliminación de la sangre sigue siendo rápida.

20 Aún no se ha informado acerca de una formulación que encierra una cantidad de encapsulación clínicamente apropiada/suficiente de irinotecán (un profármaco) y/o una sal del mismo en una vesícula cerrada y que existe en sangre en un estado de hidrólisis de un anillo de  $\alpha$ -hidroxilactona suprimido durante un tiempo prolongado para mantener la concentración de SN-38, que es un metabolito activo en plasma, con el fin de mantener la concentración de SN-38, que es un metabolito activo de clorhidrato de irinotecán en plasma durante un tiempo prolongado.

25 En vista de tales circunstancias, un objetivo de la presente invención es proporcionar, como formulación que tiene una cantidad de encapsulación de fármacos suficiente a efectos clínicos, una formulación de irinotecán que puede incluir irinotecán y/o una sal del mismo en un liposoma con una alta eficiencia de encapsulación de al menos 0,1 (fármaco (mol)/lípidos totales (mol)) y de mantener la concentración de SN-38, que es un metabolito activo de clorhidrato de irinotecán en plasma durante un tiempo prolongado.

Medios para resolver los problemas

35 Los inventores de la presente invención han llevado a cabo amplios estudios para alcanzar los objetivos anteriormente descritos. Como resultado, han obtenido los siguientes hallazgos: cuando el método de carga remota basado en un gradiente iónico se selecciona particularmente como método de encapsulación del fármaco para irinotecán y/o una sal del mismo en una vesícula cerrada (un gradiente iónico se forma en el interior/fuera de la vesícula cerrada, y al fármaco se le permite penetrar a través de la membrana vesicular cerrada para introducir el fármaco), el fármaco puede ser encapsulado a una alta concentración, que difícilmente se consigue con el método de carga pasiva convencional, y la retención en sangre es mejorada dramáticamente en comparación con un liposoma preparado con un método convencional, con el resultado que la concentración de 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38) (que es un metabolito activo de clorhidrato de irinotecán) en plasma puede mantenerse constante durante un periodo de tiempo prolongado. Es más, los inventores han obtenido los siguientes hallazgos: cuando se selecciona el método de carga remota, la estabilidad de la formulación a 37 °C y la estabilidad de la formulación a largo plazo a 4 °C pueden mejorarse considerablemente. Por lo tanto, se ha confirmado que puede adquirirse una formulación que incluye un liposoma,

40 en el que irinotecán está encapsulado a una alta eficiencia de encapsulación de 0,1 (fármaco (mol)/lípidos totales (mol)), que es una cantidad de encapsulación del fármaco suficiente para un efecto clínico. No se ha informado de una formulación que incluye una vesícula cerrada en la que irinotecán y/o una sal del mismo están encerrados en tal concentración y puede mantener la concentración de SN-38 (que es un metabolito activo de clorhidrato de irinotecán) en plasma durante un tiempo prolongado. En consecuencia, a fin de alcanzar los objetivos anteriormente descritos, la presente invención proporciona lo siguiente.

55 (1) Una formulación de irinotecán según se define en la reivindicación 1.  
El tamaño medio de partículas de una formulación de irinotecán de la presente invención es preferentemente 0,02 a 250  $\mu\text{m}$ .

60 En la presente invención, irinotecán y/o una sal del mismo puede encapsularse en un liposoma a una alta concentración, por ejemplo, mediante el siguiente método de carga remota que utiliza un gradiente iónico.

(2) La formulación de irinotecán según el punto (1), en el cual la formulación de irinotecán posee un gradiente iónico entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del liposoma. Al utilizar el gradiente iónico descrito anteriormente, pueden incorporarse a la concentración irinotecán y/o una sal del mismo en la vesícula cerrada en estado de ionización.

65 (3) La formulación de irinotecán según el punto (2), en el cual el gradiente iónico es un gradiente de concentración de protones que posee un gradiente de pH en el que el valor de pH de la fase acuosa interna es inferior a un valor de pH de la fase acuosa externa.

(4) La formulación de irinotecán según el punto (3), en el cual el gradiente de pH está formado por un gradiente de concentración de un ion amonio y/o un gradiente de concentración de un compuesto orgánico que posee un grupo amino que puede protonarse. Por ejemplo, en el caso en que la concentración iónica de amonio en la fase acuosa interna sea superior a la de la fase acuosa externa, puede formarse un gradiente de pH en el que el valor de pH de la fase acuosa interna es inferior al valor de pH de la fase acuosa externa.

En el punto (1) anterior, resulta preferente un aspecto en el cual el componente de membrana principal es un fosfolípido que posee una temperatura de transición de fase de 50 °C o más.

Ejemplos preferentes específicos del fosfolípido incluyen un fosfolípido hidrogenado y/o un esfingofosfolípido.

(5) El liposoma puede contener además un lípido distinto al fosfolípido y/o un agente modificador de superficie.

Al igual que el otro lípido, el colesterol resulta preferente.

Ejemplos preferentes del agente modificador de superficie incluyen un derivado de polímero hidrófilo. Ejemplos específicos del polímero hidrófilo incluyen un polietilenglicol con un peso molecular de 500 a 10.000 daltons, que puede introducirse como un derivado de fosfolípido o colesterol.

(6) Resulta igualmente preferente un aspecto en el cual la formulación de irinotecán según el punto 5 contiene un compuesto que posee un grupo funcional básico como el agente modificador de superficie.

Ejemplos particularmente preferentes del compuesto que posee un grupo funcional básico incluyen clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina.

(9) Una composición farmacéutica, que incluye la formulación de irinotecán según uno cualquiera de los puntos (1) a (8).

#### Efectos de la invención

Una formulación de irinotecán proporcionada en la presente invención encapsula irinotecán y/o una sal del mismo en una cantidad encapsulada de al menos 0,07 (fármaco (mol)/lípidos totales (mol)) e incluye el fármaco a una alta concentración suficiente para una efecto clínico. Como se describe en los Ejemplos a continuación, una formulación de irinotecán de la presente invención ha mejorado notablemente la retención en sangre en comparación con una formulación liposomal de irinotecán convencionalmente conocida, de modo que puede existir en sangre durante un periodo de tiempo prolongado. Además, la formulación ha mejorado drásticamente la estabilidad de la formulación a 37 °C y la estabilidad de la formulación a largo plazo a 4 °C.

#### Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] Este es un gráfico que muestra los resultados (velocidad de liberación) de un ensayo de estabilidad acelerada de la formulación a 37 °C para la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 1.

[Fig. 2] Este es un gráfico que muestra los resultados (velocidad de liberación) de un ensayo de estabilidad acelerada de la formulación a 37 °C para la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 3.

[Fig. 3] Este es un gráfico que muestra los resultados (tamaño de partículas) de un ensayo de estabilidad acelerada de la formulación a 37 °C para la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 3.

[Fig. 4] Este es un gráfico que muestra las concentraciones de clorhidrato de irinotecán en plasma en cada momento de extracción de sangre tras la inyección en un ensayo sobre la retención en sangre.

[Fig. 5] Este es un gráfico que muestra la relación entre el valor de pH de una fase acuosa externa y la eficiencia de encapsulación de CPT-11 (%) o la relación existente de la forma circular abierta (%).

[Fig. 6] Este es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 8 de la presente invención por el cambio de volumen tumoral presuntivo con el tiempo.

[Fig. 7] Este es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 8 de la presente invención por el cambio de peso corporal del ratón.

[Fig. 8] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración total de CPT-11 en plasma sanguíneo en un experimento farmacocinético en el Ejemplo 8.

[Fig. 9] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración de CPT-11 liberada del liposoma en plasma sanguíneo en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 8.

[Fig. 10] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración de SN-38 en plasma sanguíneo en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 8.

[Fig. 11] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración de SN-38G en plasma sanguíneo en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 8.

[Fig. 12] Este es un diagrama que muestra hemotoxicidad (linfocito) de la preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 8.

[Fig. 13] Este es un diagrama que muestra hemotoxicidad (neutrófilo) de la preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 8.

[Fig. 14] Este es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 9 por el cambio de volumen tumoral presuntivo con el tiempo.

[Fig. 15] Este es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 9 por el cambio de peso corporal del ratón.

[Fig. 16] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración total de CPT-11 en plasma sanguíneo en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 9.

[Fig. 17] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración de CPT-11 liberada del liposoma en plasma sanguíneo en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 9.

[Fig. 18] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración de SN-38 en plasma sanguíneo en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 9.

[Fig. 19] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración de SN-38G en plasma sanguíneo en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 9.

5 [Fig. 20] Este es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 por el cambio de volumen tumoral presuntivo con el tiempo en el Ejemplo 10.

[Fig. 21] Este es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 por el cambio de peso corporal del ratón en el Ejemplo 10.

10 [Fig. 22] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración de CPT-11 en plasma sanguíneo en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 10.

[Fig. 23] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración de SN-38 en plasma sanguíneo en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 10.

[Fig. 24] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración de SN-38G en plasma sanguíneo en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 10.

15 [Fig. 25] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración de CPT-11 en tumores en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 10.

[Fig. 26] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración de SN-38 en tumores en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 10.

20 [Fig. 27] Este es un diagrama que muestra la transición de la concentración de SN-38G en tumores en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 10.

[Fig. 28] Este es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 por el cambio de volumen tumoral presuntivo con el tiempo en el Ejemplo 12.

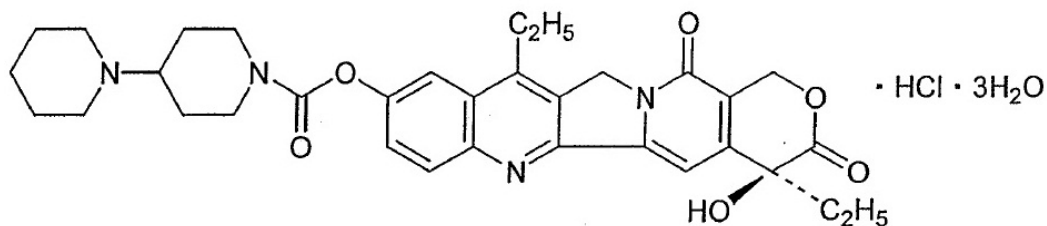
[Fig. 29] Este es un diagrama que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 por el cambio de peso corporal del ratón en el Ejemplo 12.

25 Mejor modo de llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle.

30 Irinotecán es un compuesto que posee un esqueleto de camptotecina y se representa por un nombre químico de (+)-(4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4-piperidino-piperidino)carboniloxi]-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,14(4H,12H)-diona. Se muestra a continuación irinotecán y/o una sal del mismo es un agente antineoplásico y es una sustancia soluble en agua utilizada como sal de clorhidrato (HCl (clorhidrato) de irinotecán). En la presente memoria descriptiva, el término "irinotecán y/o una sal del mismo" se refiere eventualmente como "irinotecán" o "fármaco". Mientras tanto, el término "sal de clorhidrato de irinotecán" se refiere eventualmente como "clorhidrato de irinotecán" o "CPT-11".

[Fórmula química 1]



40 La presente invención proporciona una formulación de irinotecán según se define en la reivindicación 1.

Un liposoma se compone de una membrana de tipo bicapa fosfolípida y es una vesícula cerrada que posee una estructura que forma un espacio separado desde el área externa por la membrana que se forma en base a caracteres polares de grupos hidrófobos y grupos hidrófilos del lípido, y una fase acuosa (fase acuosa interna) se incluyó en el espacio vesicular. Una formulación liposomal se forma utilizando el liposoma al incorporar un fármaco como transportador.

El "fosfolípido" es un componente principal de una biomembrana y es una sustancia anfipática, y la molécula posee un grupo hidrófobo compuesto por un grupo alquilo de cadena larga y un grupo hidrófilo compuesto por un grupo fosfato. Ejemplos de fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina (= lecitina), fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y un esfingofosfolípido, tal como esfingomiélin, un fosfolípido natural o sintético, tal como cardiolipina o un derivado de la misma, y un compuesto que ha sido hidrogenado de acuerdo con un método convencional. En lo sucesivo, el término "fosfolípido" se refiere eventualmente como fosfolípidos para abarcar a estos.

55

De estos, resultan preferentes un fosfolípido hidrogenado, tal como fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FCSH), esfingomielina (EM), y similares.

5 Como componente de membrana principal, puede contenerse una única especie de fosfolípido o varias especies de fosfolípidos.

10 En un liposoma, un fosfolípido que posee una temperatura de transición de fase superior a una temperatura corporal (35 a 37 °C) se utiliza preferentemente como componente de membrana principal para que no se filtre fácilmente un fármaco encapsulado durante un periodo de almacenamiento o en un cuerpo, tal como sangre. Es más, en el caso de fabricación de un liposoma tal, a veces se expone a una temperatura superior a la temperatura corporal. Es decir, el liposoma se fabrica a veces en una condición de temperatura de aproximadamente 50 a 70 °C, por ejemplo, aproximadamente 60 °C, y el efecto térmico sobre la formación liposomal aumenta, de modo que se utiliza particularmente de forma preferente un componente de membrana principal que posee una temperatura de transición de fase superior a esas temperaturas. En concreto, el componente de membrana principal es preferentemente un fosfolípido que posee una temperatura de transición de fase de 50 °C o superior.

20 El liposoma puede contener otro componente de membrana junto con el componente de membrana principal anteriormente descrito. Por ejemplo, resulta preferente que un liposoma contenga un lípido diferente a un fosfolípido o un derivado del mismo (en lo sucesivo, referido eventualmente como otros lípidos), y la membrana está formada por un lípido mezclado junto con el fosfolípido anteriormente descrito.

25 El término "lípido diferente a un fosfolípido" significa un lípido que posee un grupo hidrófobo compuesto por un grupo alquilo de cadena larga o similares en su molécula y no contiene grupo fosfato alguno en su molécula. Ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan particularmente a, gliceroglicolípidos, esfingoglicolípidos y esteroides, tales como colesterol (descrito a continuación como agente estabilizante), y un derivado del mismo, tal como producto hidrogenado. Ejemplos del derivado de colesterol incluyen esteroides que poseen cada uno un anillo de ciclopentanohidrofenantreno, y ejemplos específicos de los mismos incluyen, pero no se limitan particularmente a, colesterol.

30 El lípido mezclado puede contener una única especie o varias especies de los otros lípidos.

35 La velocidad de liberación de la formulación de irinotecán en plasma puede ser regulada por la cantidad de colesterol. Para reducir la velocidad de liberación a un nivel bajo, la formulación contiene colesterol en una cantidad preferentemente de 0 a 20 % en moles, mientras que para aumentar la velocidad de liberación a un nivel alto, la formulación contiene colesterol en una cantidad de 30 a 50 % en moles, preferentemente 40 a 50 % en moles.

40 Un liposoma en la presente invención puede mantener la estructura de membrana descrita anteriormente junto con el lípido formador de la membrana descrito anteriormente y puede contener otro componente de membrana que puede contenerse en el liposoma sin apartarse de los objetivos de la presente invención. Como ejemplo de otro componente de membrana se incluye un agente modificador de superficie que proporciona una característica prevista a un componente de membrana transportadora mediante el cambio de una propiedad física lipídica. Como ejemplos de agente modificador de superficie se incluyen, pero no se limitan particularmente a, una sustancia cargada, un derivado de un polímero hidrófilo, un derivado de un polisacárido soluble en agua, y similares.

45 Ejemplos de las sustancias cargadas incluyen, pero no se limitan particularmente a, un compuesto que posee un grupo funcional básico, tal como un grupo amino, grupo amidino, o grupo guanidino; un compuesto que posee un grupo funcional ácido; y similares.

50 Ejemplos del compuesto básico incluyen DOTMA divulgado en el documento JP 61-161246 A, DOTAP divulgado en el documento JP 05-508626 A, transfectam divulgado en el documento JP 02-292246 A, TMAG divulgado en el documento JP 04-108391 A, clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina divulgado en el documento WO 97/42166, y similares, sal, DOSPA, TfxTM-50, DDAB, DC-CHOL, y DMRIE.

55 Ejemplos del compuesto que posee el grupo funcional ácido incluyen: un ácido graso, tal como ácido oleico, ácido esteárico; gangliósidos que tienen ácido siálico, tales como gangliósido GM1 y gangliósido GM3; un tensioactivo basado en aminoácidos, tal como N-acil-L-glutamina, y similares.

60 En el caso que la sustancia cargada anteriormente descrita sea una sustancia que incluye un compuesto que posee un grupo funcional básico de unión a lípido, se refiere como un lípido cationizado. El resto lipídico del lípido cationizado se estabiliza en una bicapa lipídica de un liposoma y el resto del grupo funcional básico puede existir en la superficie de membrana de la bicapa lipídica del transportador (en la superficie de la membrana externa y/o en la superficie de la membrana interna). La modificación de la membrana con un lípido cationizado permite la mejora de la adhesividad o similar entre la membrana liposomal y la célula.

65 Ejemplos de polisacáridos solubles en agua incluyen, pero no se limitan particularmente a, polisacáridos solubles en agua, tales como ácido glucurónico, ácido siálico, dextrano, pululano, amilosa, amilopectina, quitosano, manano,

ciclodextrina, pectina, y carragenina. Un ejemplo de un derivado de polisacárido soluble en agua incluye glicolípido o similares.

5 Ejemplos de polímeros hidrófilos incluyen, pero no se limitan particularmente a, polietilenglicol, Ficoll, alcohol polivinílico, copolímero alternante de estireno-anhídrido maleico, copolímero alternante de éter divinílico y anhídrido maleico, polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polivinilmetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, polihidroxipropil metacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polihidroxipropil metacrilato, polihidroxietil acrilato, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, poliasparto amida, y ácido poliamino sintético.

10 El polímero hidrófilo tiene preferentemente una estructura para modificar un liposoma. En particular, un extremo de la cadena polimérica tiene preferentemente la estructura. Es decir, resulta preferente que el polímero hidrófilo a utilizar en la modificación incluya un resto corporal principal del polímero hidrófilo y un resto estructural para modificar un liposoma. En el caso que la estructura sea un resto hidrófobo, tal como un lípido, el resto corporal principal del polímero hidrófilo se fija de manera que sobresalga en la superficie externa del liposoma en la forma que el resto hidrófobo se inserta en la membrana liposomal, mientras que en el caso en que la estructura sea un grupo funcional reactivo que puede unirse covalentemente a un componente de membrana liposomal, el resto corporal principal del polímero hidrófilo se fija de manera que sobresale de la superficie externa del liposoma mediante un enlace covalente a un componente de membrana liposomal, tal como un fosfolípido expuesto en la superficie externa del liposoma.

20 En lo sucesivo, se describirá a continuación un compuesto hidrófobo a utilizar para formar un compuesto polímero hidrófilo-polímero hidrófobo por un enlace a un resto corporal principal de un polímero hidrófilo.

25 El compuesto hidrófobo no está particularmente limitado. Ejemplos del mismo incluyen un compuesto que posee una región hidrófoba (compuesto hidrófobo). Ejemplos del compuesto hidrófobo incluyen: un fosfolípido y otro lípido, tal como esteroil que forma un lípido mezclado descrito a continuación; un alcohol alifático de cadena larga; un éster de ácidos grasos de glicerina; y similares. De ellos, un fosfolípido resulta un aspecto preferente. Además, el compuesto hidrófobo puede poseer un grupo funcional reactivo. Un enlace formado por el grupo funcional reactivo es deseablemente un enlace covalente, y ejemplos específicos de los mismos incluyen, pero no se limitan particularmente a, un enlace amida, enlace éster, enlace éter, enlace sulfuro, o enlace disulfuro.

35 Una cadena de acilo incluida en el fosfolípido es deseablemente un ácido graso saturado. La longitud de cadena de la cadena de acilo es deseablemente C<sub>14</sub> a C<sub>20</sub>, más deseablemente C<sub>16</sub> a C<sub>18</sub>. Ejemplos de la cadena de acilo incluyen dipalmitoil, diestearoil, y palmitoilestearoil.

40 Un fosfolípido no está particularmente limitado. Por ejemplo, al igual que el fosfolípido, puede utilizarse uno que posea un grupo funcional que puede reaccionar con el polímero hidrófilo. Ejemplos específicos de tal fosfolípido que tiene un grupo funcional que puede reaccionar con un polímero hidrófilo incluyen fosfatidiletanolamina que posee grupos amino, fosfatidilglicerol que tiene grupos hidroxilo, y fosfatidilserina que tiene grupos carboxilo. Es un aspecto preferente utilizar la fosfatidiletanolamina descrita anteriormente.

45 Un derivado de polímero hidrófilo-lípido se compone del polímero hidrófilo y lípido descritos anteriormente. La combinación del polímero hidrófilo y lípido descrita anteriormente no está particularmente limitada. En función del fin, puede emplearse una combinación adecuada. Ejemplos del mismo incluyen un derivado de polímero hidrófilo formado por la unión de al menos uno seleccionado entre un fosfolípido, otros lípidos, tales como esteroil, alcohol alifático de cadena larga, y éster de ácidos grasos de glicerina en al menos uno seleccionado entre PEG, PG, y PPG. Ejemplos específicos de los mismos incluyen un alquilo polioxipropileno, en particular, es un aspecto preferente que, en caso en que el polímero hidrófilo sea polietilenglicol (PEG), un fosfolípido o colesterol se selecciona como lípido. Ejemplos de un derivado de PEG-lípido formado por una dicha combinación incluyen un derivado de PEG-fosfolípido o un derivado de PEG-colesterol.

50 Para el derivado de polímero hidrófilo-lípido, un derivado positiva, negativa o neutralmente cargado puede seleccionarse eligiendo el lípido. Por ejemplo, en caso en que DSPE se seleccione como un lípido, el derivado lipídico exhibe una carga negativa por el efecto de grupos fosfato, mientras que en caso en que el colesterol se seleccione como un lípido, el derivado lipídico exhibe una carga neutra. El lípido puede seleccionarse en función de la finalidad.

60 El peso molecular de PEG no está particularmente limitado. Generalmente, el peso molecular de PEG oscila de 500 a 10.000 daltons, preferentemente 1.000 a 7.000 daltons, y más preferentemente 2.000 a 5.000 daltons.

El peso molecular de PG no está particularmente limitado. En general, el peso molecular de PG oscila de 100 a 10.000 daltons, preferentemente 200 a 7.000 daltons, y más preferentemente 400 a 5.000 daltons.

65 El peso molecular de PPG no está particularmente limitado. Generalmente, el peso molecular de PPG oscila de 100 a 10.000 daltons, preferentemente 200 a 7.000 daltons, y más preferentemente 1.000 a 5.000 daltons.

De ellos, un aspecto preferente es un derivado de PEG-fosfolípido. Ejemplos del derivado de PEG-fosfolípido incluyen polietilenglicol-diestearoil-fosfatidiletanolamina (PEG-DSPE). PEG-DSPE es preferente debido a que es un compuesto para uso general y fácilmente disponible.

- 5 El polímero hidrófilo descrito anteriormente puede utilizarse individualmente o dos o más de los polímeros pueden utilizarse en combinación.

Dicho derivado de polímero hidrófilo-lípido puede fabricarse mediante un método conocido convencionalmente. Ejemplos de un método de síntesis de un derivado de PEG-fosfolípido que sean un ejemplo del derivado de polímero hidrófilo-lípido incluyen un método de reacción de PEG con un fosfolípido que posee un grupo funcional que puede reaccionar con PEG utilizando un catalizador. Ejemplos del catalizador incluyen cloruro cianúrico, carbodiimida, anhídrido de ácido, y glutaraldehído. Se deja que el grupo funcional descrito anteriormente se una covalentemente a PEG por una reacción de este tipo, a fin de obtener un derivado de PEG-fosfolípido.

- 15 En un liposoma que ha sido sometido a una modificación de la superficie mediante el uso de dicho derivado de polímero-lípido hidrófilo, cuando se previene la adsorción de una proteína opsonina o similares en plasma en la superficie liposomal, la estabilidad liposomal en sangre se mejora, la captura por RES puede evitarse, y la capacidad de administración del fármaco a un tejido o célula que es una diana de administración puede mejorarse.

- 20 La relación modificada de un lípido membranal (lípidos totales) por el derivado de polímero hidrófilo-lípido descrito anteriormente es, según una relación con respecto al lípido membranal, generalmente de 0,1 a 20 % en moles, preferentemente 0,1 a 5 % en moles, más preferentemente 0,5 a 5 % en moles.

Tenga en cuenta que, en la presente invención, el término "lípidos totales" significa los lípidos totales que forman una membrana que no sea un derivado polimérico hidrófilo-lípido. En concreto, se incluyen fosfolípidos y otros lípidos (incluyendo colesterol), se incluye además un agente modificador de superficie en el caso en que se incluya el agente modificador de superficie que no sea el derivado de polímero hidrófilo-lípido, pero no se incluye un fosfolípido, tal como fosfatidiletanolamina (PE) o colesterol, incluidos en el derivado de polímero hidrófilo-lípido.

30 En la presente invención, la modificación de la membrana liposomal por el derivado de polímero hidrófilo-lípido anteriormente descrito (PEG-PE) puede llevarse a cabo mediante la distribución selectiva en la membrana externa. En concreto, en la preparación de una formulación liposomal descrita a continuación, el liposoma puede formarse tras mezclar uniformemente un lípido formador de liposomas y PEG-PE (pre-introducción). El PEG-PE puede introducirse una vez que el liposoma se forme mediante un método convencional utilizando un lípido mezclado obtenido por medio de la mezcla de los lípidos formadores de liposomas que no contienen PEG-PE (post-introducción), aunque resulta particularmente preferente un liposoma formado mediante la realización selectiva de la modificación de la superficie en solo la capa externa de la membrana lipídica de tipo bicapa al modificar la superficie membranal con un polímero hidrófilo del exterior después de formar un liposoma no modificado compuesto de la bicapa lipídica (post-introducción).

40 Un derivado de polímero hidrófilo-lípido se utiliza como agente de modificación para la introducción de un polímero hidrófilo, el resto de polímero hidrófilo se mantiene en un estado que se proyecta hacia el exterior, y el resto lipídico, que es un resto hidrófobo, se mantiene en un estado estable mediante la introducción en la membrana de tipo bicapa lipídica de liposoma, de modo que puede formarse un liposoma que posee la superficie de la capa externa de la bicapa lipídica en la cual existe y se distribuye la unión del polímero hidrófilo al lípido.

50 Tras una etapa de formación liposomal, la desestabilización, tal como agregación se produce en el liposoma en función de la temperatura o tiempo. Dicha desestabilización es diferente de acuerdo con la composición lipídica liposomal, de modo que se sabe que la temperatura o tiempo es diferente de acuerdo con la composición lipídica. Con el fin de evitar la desestabilización que es diferente de acuerdo con la composición lipídica, es deseable establecer una etapa de modificación de polímero hidrófilo tras la etapa de formación liposomal.

55 El tiempo de adición de un polímero hidrófilo en una etapa de adición de polímero hidrófilo ocurre de manera deseable casi inmediatamente después de la etapa de formación liposomal. En concreto, el tiempo se encuentra preferentemente en 180 minutos ya que el efecto térmico en componentes membranales o sustancias encerradas es pequeño. El tiempo se encuentra más preferentemente en 120 minutos, más preferentemente en 45 minutos, lo más deseable inmediatamente después de la etapa de formación liposomal. Más específicamente, tras la etapa de formación liposomal, el dispersante liposomal puede verse directamente en una solución de polímero hidrófilo. Mientras tanto, se puede adoptar un método de adición de una solución de polímero hidrófilo al dispersante liposomal después de la etapa de formación liposomal. Además, también puede adoptarse un método de decantación del dispersante liposomal y la solución de polímero hidrófilo simultáneamente en otro recipiente para mezcla. En este caso, desde el punto de vista de la uniformidad de concentración y uniformización de la temperatura, es deseable añadir una etapa de agitación mediante un agitador o similares.

65 Una vez añadido un polímero hidrófilo en una etapa de modificación de polímero hidrófilo, la mezcla se agita de manera deseable con calentamiento durante un tiempo predeterminado a una temperatura de transición de fase o



superior. El tiempo de agitación con calefacción va de 0 a 120 minutos, preferentemente 0 a 60 minutos, más preferentemente 0 a 45 minutos.

5 Contario a los métodos descritos anteriormente, un liposoma que contiene un lípido formador de membrana, tal como un fosfolípido que posee un grupo funcional reactivo se fabrica por un método convencional, y luego PEG activado en extremo se añade al líquido externo del liposoma que se une a un lípido formador de membrana, tal como un fosfolípido que posee el grupo funcional, para fabricar así un liposoma.

10 Aparte de los métodos descritos anteriormente, los componentes descritos anteriormente se mezclan, y la mezcla se descarga a alta presión por un emulsionante tipo descarga a alta presión, a fin de obtener de ese modo un liposoma. Este método se describe específicamente en "*Liposome in Life Science*" (Terada, Yoshimura, *et al.*; Springer-Verlag Tokyo (1992)), incorporado en el presente documento por referencia.

15 En el caso descrito anteriormente, para determinar el tamaño del liposoma a un tamaño predeterminado, se disponen algunas técnicas (editado por G. Gregoriadis "*Liposome Technology Liposome Preparation and Related Techniques*" 2ª edición, Vol. I-III, CRC Press), incorporado en el presente documento por referencia.

20 Como estructura membranal lipídica de un liposoma, se conocen estructuras membranales, tales como una vesícula unilamelar (pequeña vesícula unilamelar (PVU) o gran vesícula unilamelar (GVU)) de tipo bicapa lipídica, y una vesícula multilaminar (VML), que incluye el plural de bicapas lipídicas.

25 Aunque un liposoma de acuerdo con la presente invención puede estar compuesto de cualquier estructura membranal, resulta preferente un liposoma compuesto de una vesícula unilamelar, y específicamente, es preferente un liposoma GVU.

30 Un dispersante liposomal puede formarse en una forma unilamelar al pasar forzosamente por un filtro una pluralidad de veces utilizando una extrusora. En general, se utilizan dos o más especies de filtros con diferentes tamaños de poro (un filtro con un tamaño de poro mayor que un tamaño de poro predeterminado y un filtro para obtener un tamaño de poro predeterminado al fin). Cuantas más veces se pasen los filtros con diferentes tamaños de poro utilizando una extrusora, mayor será la velocidad de formación unilamelar, de modo que el producto resultante pasa a ser considerado como un liposoma prácticamente compuesto de una vesícula unilamelar. El liposoma prácticamente compuesto de una vesícula unilamelar significa específicamente un liposoma que posee la vesícula unilamelar de manera que la velocidad de la vesícula unilamelar en todos los transportadores (vesículas) que forman una formulación liposomal puede ser 50 % o más, preferentemente 80 % o más.

35 En el liposoma descrito anteriormente, las cadenas de polímeros hidrófilos en su superficie externa se distribuyen hacia el exterior del liposoma, mientras que la superficie lateral en fase acuosa interna de la capa interna de la bicapa lipídica no se modifica, por lo que las cadenas de polímero hidrófilo no se distribuyen sustancialmente en la fase acuosa interna. En el caso de un liposoma que posee la estructura de distribución, la estabilidad de la membrana puede mantenerse en comparación con un liposoma que posee polímeros hidrófilos distribuidos a ambos lados de las membranas interna y externa de la membrana bicapa, incluso si el valor de pH de la fase acuosa interna es bajo. Además, el efecto de estabilidad en sangre puede obtenerse incluso si la cantidad total de polímeros hidrófilos es pequeña en comparación con un liposoma que posee los polímeros distribuidos a ambos lados de las capas interna y externa de la membrana bicapa.

45 Tenga en cuenta que el término "retención en sangre" significa que una propiedad de un fármaco encerrado en un transportador está presente en sangre. Cuando el fármaco se libera del transportador, el fármaco desaparece rápidamente de la sangre y afecta a un sitio expuesto al fármaco. Un fármaco que tiene excelente retención en sangre puede administrarse en una dosis inferior.

50 Un transportador de la presente invención puede hallarse en forma esférica o en una forma similar. El tamaño de partículas (diámetro externo de partículas) de las mismas no está particularmente limitado aunque se comprende entre 0,02 a 250  $\mu\text{m}$ , preferentemente 0,03 a 0,4  $\mu\text{m}$ , más preferentemente 0,05 a 0,2  $\mu\text{m}$ . El diámetro externo de las partículas es un valor medio del diámetro de todas las partículas en una formulación liposomal, que se determina por el método de dispersión dinámica de luz. En concreto, la determinación puede realizarse utilizando Zetasizer (Malven Instruments 3000HS o S ZEM 5002).

55 Una formulación de irinotecán de la presente invención puede contener además un estabilizador farmacéuticamente aceptable y/o antioxidante dependiendo de su vía de administración. Ejemplos de estabilizador incluyen, pero no se limitan particularmente a, sacáridos, tales como glicerol y sacarosa. Ejemplos de antioxidante incluyen, pero no se limitan particularmente a, ácido ascórbico, ácido úrico, homólogos de tocoferol (por ejemplo, vitamina E), y similares. Hay cuatro isómeros de tocoferol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ ), todos los cuales pueden utilizarse en la presente invención.

65 La formulación de irinotecán puede contener además un aditivo farmacéuticamente aceptable dependiendo de su vía de administración. Ejemplos de aditivo incluyen agua, solución salina fisiológica, un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polímero de carboxivinilo,

carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilato de sodio, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, carboximetilalmidón sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantano, goma arábica, caseína, gelatina, agar, diglicerina, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol esteárico, ácido esteárico, seroalbúmina humana (SAH), manitol, sorbitol, lactosa, TFS, un polímero biodegradable, un medio libre de suero, un tensioactivo aceptable como aditivo farmacéutico, un tampón de pH fisiológico aceptable en un cuerpo vivo, o similares. Un aditivo que se va a utilizar no es limitado, pero puede seleccionarse entre los aditivos descritos anteriormente en función de su forma farmacéutica apropiada o en combinación con otro aditivo.

En la presente invención, una formulación de irinotecán que contiene tales aditivos puede proporcionarse como una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica de la presente invención puede almacenarse por un método general, por ejemplo, en un refrigerador a una temperatura de 0 a 8 °C o a temperatura ambiente comprendida entre 1 a 30 °C.

En la presente invención, un liposoma adopta una forma en la que CPT-11 se encapsula. Se sabe que un anillo de  $\alpha$ -hidroxilactona en CPT-11 es conocido por hidrolizarse en un intervalo de pH superior a un estado neutro. Por lo tanto, en el liposoma de la presente invención, se requiere que la fase acuosa interna del liposoma se mantenga en un pH ácido para suprimir la hidrólisis del anillo de  $\alpha$ -hidroxilactona independientemente de si CPT-11 se recoge en la bicapa lipídica o en la fase acuosa interna.

Un lípido es conocido generalmente por hidrolizarse en función del valor de la temperatura o pH. En particular, se conocen ésteres de carboxilato de ácidos grasos en las posiciones sn-1 y sn-2 por hidrolizarse y descomponerse fácilmente en un lisolípido y un ácido graso (Grit et al., *Chem. Phys. Lipids* 64, 3-18, 1993). Tales productos descompuestos alteran la composición de la membrana lipídica convencional, y se mejora la permeabilidad de la membrana lipídica, que origina daños en la estabilidad de los liposomas. Por lo tanto, cuando la fase acuosa interna se mantiene ácida, el pH en la fase acuosa externa es deseablemente de manera aproximada neutro desde el punto de vista de la estabilidad lipídica.

Una situación en la que estas dos condiciones contrarias se restringen más severamente es una etapa de introducción del fármaco. En la etapa de introducción del fármaco, se requiere que la mezcla se caliente hasta al menos la temperatura de transición de fase de la membrana lipídica, que favorece significativamente la hidrólisis lipídica. Con el fin de suprimir la hidrólisis lipídica, es deseable que el pH en la fase acuosa externa se ajuste a aproximadamente neutro. No obstante, cuando el pH en la fase acuosa externa se ajusta a aproximadamente neutro, se favorece la hidrólisis de un anillo de  $\alpha$ -hidroxilactona en CPT-11. En vista de estas dos condiciones contrarias, el valor de pH en la fase acuosa externa en la etapa de introducción del fármaco es preferentemente 4,0 a 8,0, más preferentemente 4,0 a 7,0, más preferentemente 5,0 a 7,0.

Para completar una formulación de irinotecán altamente incorporada de la presente invención, se forma un liposoma transportador y, entonces un método referido como el método de carga remota se lleva a cabo para introducir el fármaco utilizando un gradiente iónico en el interior/fuera de la membrana liposomal. El método de carga remota puede utilizarse para un fármaco común que puede existir en un estado de carga en el caso en el que el fármaco se disuelva en un medio acuoso apropiado. Cuando un gradiente iónico se forma en el interior/fuera del liposoma, el fármaco puede encapsularse permeabilizando la membrana liposomal en función del gradiente formado.

Ejemplos de un gradiente iónico formado a través de la membrana liposomal incluyen un gradiente de concentración  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Una técnica para la adición de un fármaco en un liposoma formado previamente por el método de carga remota para el gradiente de concentración  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  se describe en el documento US 5077056 (incorporado en el presente documento por referencia), que puede llevarse a cabo con referencia a la descripción.

En la presente invención, ejemplos preferentes del gradiente iónico incluyen un gradiente de concentración de protones, y se ejemplifica un modo de un gradiente de pH formado ajustando el valor del pH del interior de la membrana (fase acuosa interna) más bajo que el valor del pH del exterior de la membrana (fase acuosa externa). En concreto, el gradiente de pH puede estar formado en base a un gradiente de concentración de iones amonio y/o un gradiente de concentración de un compuesto orgánico que posee un grupo amino que puede protonarse.

Un ejemplo específico de un método de encapsulación de un fármaco (irinotecán o una sal del mismo) en un liposoma mediante el gradiente de concentración de ion amonio se describirá a continuación. En primer lugar, se forma previamente un liposoma en un tampón acuoso que contiene 0,1 a 0,3 M de una sal de amonio, y el medio externo se intercambia por un medio que no contiene iones amonio (por ejemplo, una solución de sacarosa), para formar así un gradiente de ion amonio en el interior/fuera de la membrana liposomal. Los iones amonio internos se equilibran con amoniaco y protones, y el amoniaco penetra la membrana lipídica y se dispersa para eliminar el amoniaco del liposoma interno. Con la eliminación de amoniaco, la porción equilibrada en el liposoma se cambia a la formación de protones. Como resultado, los protones se acumulan en el liposoma, y un gradiente de pH se forma en el interior/fuera del liposoma. Cuando se añade un fármaco a un dispersante liposomal que posee tal gradiente de pH, el fármaco se incorpora en el liposoma.

Una sal de amonio capaz de hacer el gradiente de concentración de ion amonio incluye, pero no se limita particularmente a, sulfato de amonio, hidróxido de amonio, acetato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, citrato de amonio, succinato de amonio, lactobionato de amonio, carbonato de amonio, tartrato de amonio, y oxalato de amonio.

5 Tenga en cuenta que una técnica en sí para la introducción de un fármaco en un liposoma formado previamente por el método de carga remota para un gradiente de concentración de iones amonio se describe en el documento 5192549 (incorporado en el presente documento por referencia), que puede llevarse a cabo con referencia a la descripción.

10 De modo conveniente, el compuesto orgánico que posee un grupo amino que puede protonarse tiene un peso molecular bajo. Ejemplos específicos del mismo incluyen, entre otros, metilamina, etilamina, propilamina, dietilamina, etilendiamina, y similares.

15 En la presente invención, un modo adecuado es que irinotecán o una sal del mismo se incorpore por el método de carga remota mediante el gradiente de concentración de iones amonio.

20 Una formulación de irinotecán de la presente invención se forma mediante la incorporación de irinotecán o una sal del mismo en el transportador anteriormente descrito a una concentración superior a 0,07 mol/mol (mol de fármaco/mol de lípidos totales de la membrana), preferentemente superior a 0,1 mol/mol.

25 En la presente invención, el término "encerrar" significa un estado en el cual un fármaco está encapsulado en un transportador. El término también significa un estado en el cual parte o la totalidad de moléculas del fármaco se incluyen en una capa de un lípido que es un componente del transportador. Un transportador de la presente invención se purifica por un método comúnmente utilizado (tal como, filtración en gel, diálisis, separación de membrana, o centrifugación), para eliminar de este modo los fármacos no descargados en el transportador.

30 Se proporciona un transportador tras la etapa de eliminación de los fármacos no descargados. Por lo tanto, puede producirse un gradiente de concentración del fármaco entre el interior y el exterior del transportador a través de una bicapa lipídica. Preferentemente, el transportador de la presente invención no contiene fármacos libres fuera de la bicapa lipídica tras la preparación del transportador. Así pues, los fármacos encerrados en el transportador se liberan al área externa. El transportador de la presente invención con fármacos encerrados llega a un sitio diana, con el resultado de que administra los fármacos encerrados en el sitio diana. La administración de los fármacos al sitio diana puede lograrse recogiendo los fármacos incorporados en el transportador en el sitio diana o al ejercer el efecto de los fármacos en el sitio diana o próximo al mismo incluso si los fármacos no se recogen en el sitio diana.

35 En la presente invención, el término "liberación" significa que un fármaco encerrado en un transportador se dispersa hacia el exterior de una vesícula cerrada atravesando una membrana lipídica que forma el transportador o cambiando parte de la estructura de la membrana lipídica. Cuando el clorhidrato de irinotecán se metaboliza en plasma en SN-38, que es un metabolito activo y expuesto en un sitio diana a una alta concentración durante mucho tiempo, se exhibe una fuerte actividad antineoplásica, por lo que es importante para controlar la liberación. La velocidad de liberación de una formulación de irinotecán en plasma puede ser controlada ajustando la cantidad de colesterol, y se espera un efecto preferente ajustando la cantidad de colesterol. El término "velocidad de liberación" significa una velocidad de un fármaco que exuda hacia el exterior de una vesícula cerrada a partir de los componentes transportadores encapsulados del transportador y el clorhidrato de irinotecán a un fármaco incorporado en el transportador (relación en peso o relación molar). La frase "velocidad de liberación es baja" significa que la cantidad de un fármaco que exuda hacia el exterior de una vesícula cerrada por unidad de tiempo es pequeña.

40 En la presente invención, el término "sitio diana" significa un sitio específico en el que un fármaco encapsulado en un transportador se libera y actúa, y significa una célula, tejido, órgano o el órgano interno que se especifica en cada sitio, y un interior del mismo. El sitio diana, tal como una célula, tejido, órgano o el órgano interno, y un interior del mismo puede ser un sitio a tratar con un fármaco. Cuando un fármaco liberado se expone al sitio, se ejerce un efecto. Ejemplos del sitio diana incluyen, pero no se limitan particularmente a, un tumor.

45 Ejemplos de un tumor a tratar incluyen, pero no se limitan particularmente a, un tumor sólido. Ejemplos específicos de los mismos incluyen cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de intestino grueso, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de laringe, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer uterino, y cáncer de ovarios. El sitio diana es una célula tumoral, tejido, órgano o el órgano interno, un interior de los mismos, y similares. Por lo tanto, en la presente invención, una enfermedad significa el tumor descrito anteriormente, y se espera que un fármaco ejerza un efecto antineoplásico en él.

50 En la presente invención, el término "exposición" significa que un fármaco liberado en el exterior de un transportador actúa sobre el área exterior. Específicamente, cuando un fármaco liberado se aproxima y contacta con un sitio diana, el fármaco ejerce su efecto antineoplásico como su acción. Cuando el fármaco actúa sobre el sitio diana, actúa por vía tópica en una célula en un ciclo celular en el cual la síntesis de ADN se lleva a cabo en el sitio diana,

65

de modo que se ejerce un efecto esperado. Para ejercer un efecto tal, debe mantenerse un equilibrio entre la velocidad de liberación de un fármaco de un transportador y la retención en sangre del transportador.

5 Un transportador de la presente invención libera irinotecán y/o una sal del mismo a una velocidad de liberación preferente, y el irinotecán liberado y/o una sal del mismo se metaboliza adicionalmente en SN-38, que es un metabolito activo. La presente invención se utiliza para exponer SN-38 a un sitio diana predeterminado durante un tiempo prolongado. Por lo tanto, en la presente invención, con el fin de prevenir y/o tratar una enfermedad padecida por un huésped, la administración sistémica o tópica al huésped (paciente) puede llevarse a cabo parenteralmente mediante la administración de un transportador en el cual una cantidad eficaz de irinotecán y/o una sal del mismo se encierra para liberar la cantidad eficaz de irinotecán y/o una sal del mismo en el huésped o para exponer una cantidad eficaz de SN-38 a un sitio diana a una concentración alta durante un tiempo prolongado. Ejemplos del huésped como administración diana incluyen mamíferos, preferentemente seres humanos, monos, ratones, animales de granja, y similares.

15 Ejemplos de una vía de administración parenteral a seleccionar incluyen inyección intravenosa (I.V), tal como goteo, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, e inyección subcutánea, y un método de administración puede seleccionarse apropiadamente en función de la edad o síntoma de un paciente. Un transportador de la presente invención se administra a un paciente que padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar el síntoma de la enfermedad o aliviar, al menos, parte del síntoma. Por ejemplo, una dosis eficaz de un fármaco a encapsular en un transportador se selecciona a partir de un intervalo de 0,01 mg a 100 mg por kg de peso corporal por día. Sin embargo, la dosis del transportador de la presente invención no está limitada a ello. Para el periodo de administración, la administración puede llevarse a cabo después de la aparición de la enfermedad, o puede llevarse a cabo de forma profiláctica para aliviar el síntoma hasta la aparición en el caso en el que se prevé la aparición de la enfermedad. Además, un periodo de administración adecuado puede seleccionarse en función de la edad o síntoma de un paciente.

Ejemplos específicos del método de administración incluyen la administración de una composición farmacéutica utilizando una jeringa o goteo. Mientras tanto, se inserta un catéter en un cuerpo (por ejemplo, lumen o vaso sanguíneo) de un paciente o un huésped para guiar su borde en torno a un sitio diana, y la composición puede administrarse a través del catéter de un sitio diana predeterminado o cerca del sitio o un sitio desde el que se espera que la sangre fluya hacia el sitio diana.

35 Como se describe en los Ejemplos, cuando se determinó la velocidad de liberación de un fármaco encerrado en un transportador de la presente invención, se descubrió que la velocidad de liberación era baja. Para calcular la velocidad de liberación, el transportador de la presente invención se precipita por centrifugación, y se determina la cantidad de fármaco presente en el sobrenadante y en el transportador.

### Ejemplos

40 En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle a modo de ejemplos, aunque la presente invención no se limita a estos ejemplos y ejemplos de ensayo.

Se determinaron de la siguiente forma cada concentración y tamaño de partículas de un liposoma encapsulado en el fármaco preparado en cada ejemplo.

- 45
- Concentración de fosfolípido (mg/ml): una concentración de fosfolípido (FCSH) en una dispersión liposomal, que se determinó utilizando un kit para la determinación de fosfolípido (Phospholipid C-Test Wako, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).
  - 50 • Concentración de lípidos totales (mol/l): una concentración en mol total (mM) de un lípido mezclado que es un componente membranal, que se calcula a partir de la concentración del fosfolípido anterior. Los lípidos totales contienen componentes lipídicos en un agente modificador de superficie preparados como un lípido mezclado pero no contienen un lípido (en los ejemplos, PE (fosfatidiletanolamina) en PEG-PE o col (colesterol) en col-PEG) en un derivado de PEG para la introducción de PEG.
  - 55 • Concentración del fármaco (mg/ml): la concentración se determinó de la siguiente manera: la formulación obtenida anteriormente se diluyó 40 veces con solución salina fisiológica, y se añadieron 2 ml de metanol a 50  $\mu$ l de la mezcla, seguido de la medición de una intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación: 360 nm, longitud de onda de fluorescencia: 435 nm) de la mezcla utilizando un espectrofluorímetro. La concentración de clorhidrato de irinotecán encerrado se representa como "cantidad de fármaco (mg)/cantidad de formulación total (ml)".
  - 60 • Cantidad de fármaco incorporada (relación molar del fármaco/lípidos totales): la concentración de clorhidrato de irinotecán encerrado en un transportador se representa como una relación molar del fármaco/lípidos totales, que se calcula a partir de una relación de la concentración del fármaco a la concentración de lípidos.
  - Tamaño de partículas (nm): 20  $\mu$ l de una dispersión liposomal se diluyeron en 3 ml con solución salina fisiológica, y un tamaño medio de partículas se determinó por Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments).
- 65

Los siguientes son nombres abreviados y pesos moleculares de los componentes utilizados.

FCSH: fosfatidilcolina de soja hidrogenada (peso molecular: 790, fabricada por Lipoid, SPC3)

Col: colesterol (peso molecular: 386,65, Solvay)

5 PEG<sub>5000</sub>-PE: polietilenglicol (peso molecular: 5.000)-fosfatidiletanolamina (peso molecular: 5.938, Genzyme Corporation)

PEG<sub>2000</sub>-PE: polietilenglicol (peso molecular: 2.000)-fosfatidiletanolamina (peso molecular: 2.725, NOF Corporation)

10 PEG<sub>1600</sub>-Col: polietilenglicol (peso molecular: 1.600)-colesterol (peso molecular: 1.982, NOF Corporation)

CPT-11: clorhidrato de irinotecán (peso molecular: 677,19)

R-DHPE: rodamina dihexadecanoil fosfatidiletanolamina (peso molecular: 1.333,81, Molecular Probes, Inc.)

TRX-20: clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamida (peso molecular: 609,41, Joko Pharmaceutical Co., Ltd.).

[Ejemplo 1]

15 Para confirmar un método capaz de alcanzar una formulación liposomal altamente encapsulada con clorhidrato de irinotecán, se intentó la introducción de fármacos en una concentración alta mediante el método de carga remota (Ejemplo de preparación 1) o por el método de carga pasiva (Ejemplo 1 de preparación comparativo). Para todas las formulaciones liposomales incorporadas con clorhidrato de irinotecán (en lo sucesivo, abreviada como formulación CPT-11), se utilizó liposoma y PGE-PE (post-introducido) como transportador aunque los métodos de introducción son diferentes.

(Ejemplo de Preparación 1) <Método de carga remota>

25 (1) Preparación del lípido mezclado: se disolvieron 0,422 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FCSH) y 0,176 g de colesterol (Col) en 25 ml de t-butanol (Kanto Kagaku) calentado a 60 °C, y la mezcla se enfrió en hielo, seguido por liofilización, para preparar así un lípido mezclado de FCSH:Col = 54:46 (relación molar).

30 (2) Preparación del liposoma: a 0,598 g del lípido mezclado preparado anteriormente se añadieron 10 ml de una solución de sulfato de amonio de 250 mM, y el lípido se dejó incrementar completamente. Después, la mezcla se agitó con un agitador vórtex, y la mezcla resultante se pasó secuencialmente a través de un filtro (tamaño de poro: 0,2 µm X 5 veces, 0,1 µm X 10 veces, Whatman) unido a una extrusora (The Extruder T. 10, Lipex biomembranes Inc.) a 68 °C, para preparar de ese modo una dispersión liposomal.

35 (3) Introducción de PEG-PE: se añadieron a la dispersión liposomal resultante 1,21 ml (correspondiente a 0,75 % en moles de la cantidad de lípidos totales del lípido mezclado) de una solución de polietilenglicol 5000-fosfatidiletanolamina (PEG<sub>5000</sub>-PE) en agua destilada (36,74 mg/ml), y la mezcla se calentó a 60 °C durante 30 minutos, para introducir de ese modo PEG<sub>5000</sub>-PE.

Se realizó una sustitución en fase acuosa externa utilizando una columna de gel que se había sometido a una sustitución disolvente con una solución de 10 mM de histidina/sacarosa al 10 % (pH 6,0).

40 Una concentración de FCSH se determinó utilizando un kit para la determinación del fosfolípido. Una cantidad de lípidos totales (mM) se calculó a partir de la concentración de FCSH.

(4) Encapsulación del fármaco: se preparó una solución de clorhidrato de irinotecán (CPT-11)/agua de OI (agua purificada con membrana de ósmosis inversa) que posee una concentración de 10 mg/ml.

45 La solución de clorhidrato de irinotecán se añadió a la dispersión liposomal en una cantidad de CPT-11/FCSH = 0,2 (p/p) para la concentración de FCSH (mg/ml) anterior, y la mezcla se agitó a 60 °C durante 60 minutos, para introducir de ese modo clorhidrato de irinotecán. Tras la introducción, la muestra se enfrió en hielo. Después de la encapsulación de clorhidrato de irinotecán, la dispersión liposomal se hizo pasar a través de una columna de gel que se había sometido a la sustitución disolvente con una solución de 10 mM de histidina/sacarosa al 10 % (pH 6,5) para eliminar los fármacos no encapsulados.

50 Las composiciones y los tamaños de partículas de las formulaciones de CPT-11 obtenidos anteriormente se muestran en la Tabla 1.

Se obtuvieron formulaciones de CPT-11 altamente encapsuladas de la presente invención.

(Ejemplo 1 de preparación comparativo) <Método de carga pasiva>

55 A 0,2992 g de un lípido mezclado (FCSH:Col = 54:46 (relación molar)) preparado por el mismo método que en el Ejemplo de preparación 1, se añadieron 5 ml de una solución de clorhidrato de irinotecán (solución de CPT-11/sacarosa al 10 % que tiene una concentración de 10 mg/ml), y se permitió que el lípido aumentase completamente. La mezcla se agitó con un agitador vórtex, y la mezcla resultante se pasó secuencialmente a través de un filtro (0,2 µm X 5 veces, 0,1 µm X 10 veces) unido a una extrusora a 68 °C de la misma forma que en el Ejemplo de preparación 1, para preparar de ese modo un liposoma encapsulado con clorhidrato de irinotecán.

65 Al liposoma se añadieron 0,61 ml (correspondiente a 0,75 % en moles de la cantidad de lípidos totales del lípido mezclado) de PEG<sub>5000</sub>-PE de la misma forma que en el Ejemplo de preparación 1 (3), y la mezcla se calentó a 60 °C durante 30 minutos, para introducir de ese modo PEG<sub>5000</sub>-PE. Posteriormente, los fármacos no encapsulados se eliminaron utilizando una columna de gel que se había sometido a sustitución disolvente con una solución de 10 mM de histidina/sacarosa al 10 % (pH 6,5).

Las composiciones y los tamaños de partícula de las formulaciones de CPT-11 obtenidos anteriormente se muestran en la Tabla 1.

5 El fármaco se introdujo con la misma cantidad de fármaco que en el Ejemplo de preparación 1, pero las formulaciones de CPT-11 altamente encapsuladas no se obtuvieron por el método de carga pasiva.

[Ejemplo 2]

10 Se investigó la cantidad inicial requerida para la obtención de una formulación de CPT-11 altamente encapsulada de la presente invención en el método de carga remota.

(Ejemplo de preparación 2)

15 El procedimiento del Ejemplo de preparación 1 se repitió excepto que, en la encapsulación del fármaco descrita en el Ejemplo de preparación 1 (4), la relación CPT-11/FCSH (p/p) de una solución acuosa de CPT-11/OI (10 mg/ml) que se va a añadir a la dispersión liposomal con PGE-PE post-introducido preparada de la misma forma que (1) a (3) se cambia a 0,1, 0,2, 0,4, y 0,8, a fin de obtener formulaciones de CPT-11. Las composiciones y los tamaños de partículas de las formulaciones de CPT-11 obtenidas anteriormente se muestran en la Tabla 1.

20 Como se muestra en la Tabla 1, las formulaciones de CPT-11 altamente soportadas (encapsuladas) que tienen el fármaco en una concentración totalmente eficaz para uso clínico pueden obtenerse por el método de carga remota mediante el aumento de la cantidad de fármaco inicial (relación de fármaco/FCSH).

25 [Tabla 1]

Tabla 1

Ejemplo de preparación	Composición membranal inicial (relación molar)		Concentración lipídica		Cantidad de fármaco inicial	Concentración de fármaco	Cantidad de fármaco soportado	Tamaño de partículas
	Lípido	PEG-PE	Fosfolípido (FCSH)	Lípidos totales				
			mg/ml	mol/l				
Ejemplo de preparación 1			12,6	0,03	0,2	2,41	0,11712	120,9
Ejemplo 1 de preparación comparativo			13,73	0,032	0,2	0,29	0,013	120,8
			11,37	0,027	0,1	1,32	0,073	125,2
			8,98	0,021	0,2	1,88	0,132	124,8
Ejemplo de preparación 2-(1)			7,08	0,017	0,4	2,99	0,266	123,1
			4,54	0,011	0,8	2,96	0,41	126,5
	54/46	0,75						

(Ejemplo de ensayo 1) Estabilidad acelerada de la formulación a 37 °C

Cada formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 1 se calentó a 37 °C durante un periodo predeterminado. Después del calentamiento, la formulación de CPT-11 se diluyó 20 veces añadiendo solución salina fisiológica, y se realizó ultracentrifugación ( $1 \times 10^5$  g, 2 horas, 10 °C) para precipitar una formulación de CPT-11 (liposoma encapsulado con clorhidrato de irinotecán). Se determinó la cantidad de clorhidrato de irinotecán presente en el sobrenadante para calcular la velocidad de liberación (%) del clorhidrato de irinotecán de la formulación de CPT-11. Los resultados se muestran en la Fig. 1.

Se descubrió que la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 1 de preparación comparativo posee la velocidad de liberación de clorhidrato de irinotecán de aproximadamente 60 % tras el calentamiento a 37 °C durante 7 días, mientras que se descubrió que la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 1 por el método de carga remota libera poco clorhidrato de irinotecán incluso después del calentamiento a 37 °C durante 7 días. Por lo tanto, se esclareció que la encapsulación de clorhidrato de irinotecán en un liposoma mediante el método de carga remota permite la preparación de una formulación de CPT-11 altamente soportada que posee una excelente estabilidad de formulación.

(Ejemplo de ensayo 2) Estabilidad de la formulación a 37 °C

Cada formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 2 se calentó a 37 °C durante un periodo predeterminado. Después del calentamiento, para la formulación de CPT-11, se determinó la velocidad de liberación de clorhidrato de irinotecán de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 1. Se descubrió que la velocidad de liberación de cada formulación de CPT-11 era 1 % o menos incluso después del calentamiento a 37 °C durante 14 días.

Por lo tanto, se esclareció que la velocidad de liberación de la formulación de CPT-11 preparada por el método de carga remota no se ve afectada en gran medida por la cantidad de fármaco soportado (relación de fármaco/lípidos totales), e incluso una formulación de CPT-11 extremadamente muy encapsulada posee excelente estabilidad de formulación.

[Ejemplo 3]

Un liposoma que posee una composición diferente de la membrana en el Ejemplo de preparación 1 se utilizó como transportador para preparar una formulación de CPT-11. Específicamente, el procedimiento para la encapsulación de clorhidrato de irinotecán se llevó a cabo por el método de carga remota de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1 utilizando un liposoma PEG-PE post-introducido (Ejemplo de preparación 3) o un liposoma PEG-PE pre-introducido (Ejemplo 1 de preparación referencial), incluyendo el lípido mezclado mostrado a continuación como componente membranal.

(Ejemplo de preparación 3)

(1) Preparación del lípido mezclado: se disolvieron 1,5317 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FCSH), 0,6419 g de colesterol (Col), y 0,005 g de rodamina dihexadecanoil fosfatidiletanolamina (R-DHPE) en 50 ml de t-butanol calentado a 60 °C, y la mezcla se enfrió en hielo, seguido por liofilización, para preparar así un lípido mezclado con una relación molar de FCSH:Col:R-DHPE = 54:46:0,1.

(2) Preparación del liposoma: se llevó a cabo la adición de 10 ml de una solución de sulfato de amonio de 250 mM, al agitarse con un agitador vórtex, y filtrándose con un filtro unido a una extrusora (0,2  $\mu$ m X 5 veces, 0,1  $\mu$ m X 10 veces) de la misma manera que el Ejemplo de preparación 1, excepto que se utilizaron 0,37 g del lípido mezclado preparado anteriormente, a fin de obtener una dispersión liposomal.

Posteriormente, la sustitución en fase acuosa externa se llevó a cabo con una solución de 10 mM de histidina/sacarosa al 10 % (pH 6,0).

(3) Introducción de PEG-PE: a la dispersión liposomal resultante se añadió una solución de polietilenglicol 2000-fosfatidiletanolamina (PEG<sub>2000</sub>-PE) en agua destilada (36,74 mg/ml) (correspondiente a 2,8 % en moles de la cantidad de lípidos totales), y la mezcla se calentó a 60 °C durante 30 minutos, para introducir de ese modo PEG<sub>2000</sub>-PE.

(4) De la misma manera que la encapsulación del fármaco en el Ejemplo de preparación 1, se añadieron 10 mg/ml de una solución de CPT-11/agua de Ol a la dispersión liposomal en una cantidad requerida para CPT-11/FCSH = 0,2 (p/p) para introducir clorhidrato de irinotecán. Posteriormente, la mezcla se enfrió en hielo, y los fármacos no encapsulados se eliminaron con una solución de 10 mM de histidina/sacarosa al 10 % (pH 6,5). La formulación de CPT-11 resultante se muestra en la Tabla 2.

(Ejemplo 1 de preparación referencial)

Se repitió el procedimiento en el Ejemplo de preparación 3, excepto que PEG<sub>2000</sub>-PE a añadir en el Ejemplo de preparación 3 (3) había sido añadido previamente al lípido mezclado como componente membranal para preparar un liposoma que posee PEG-PE disperso a ambos lados de las membranas internas y externas, para preparar de ese modo una formulación de CPT-11. El procedimiento se muestra a continuación.



A 0,37 g del lípido mezclado (FCSH:Col:R-DHPE = 54:46:0,1 (relación molar)) preparado de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 3 (1) y 0,094 g (correspondiente a una cantidad (5,6 % en mol) dos veces la cantidad en el Ejemplo de preparación 3) de PEG<sub>2000</sub>-PE se añadió 1 ml de etanol, y la mezcla se disolvió completamente por agitación a 65 °C durante 30 minutos.

Después de confirmar que la mezcla se disolvió completamente mediante agitación, a la solución de etanol se añadieron 10 ml de una solución de sulfato de amonio preparada de manera que presente 250 mM. Después de ello, se llevaron a cabo los mismos procedimientos que en el Ejemplo de preparación 3 (2) con un agitador vórtex y una extrusora, y la sustitución en fase acuosa externa se llevó a cabo para la dispersión liposomal obtenida mediante el uso de una solución de sacarosa al 10 %.

De la misma manera que en el Ejemplo de preparación 3 (4), 10 mg/ml de una solución de CPT-11/agua de OI se añadieron a la dispersión liposomal en una cantidad requerida para el valor CPT 11/FCSH = 0,2 (p/p) para introducir clorhidrato de irinotecán. Después de la introducción, la mezcla se enfrió en hielo, y los fármacos no encapsulados se eliminaron de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 3 (4). La formulación de CPT-11 resultante se muestra en la Tabla 2.

[Tabla 2]

Tabla 2

	Composición de membrana inicial (relación molar)		Concentración lipídica		Concentración del fármaco	Cantidad de fármaco soportado	Tamaño de partículas
	Lípido	PEG-PE	Fosfolípido	Lípidos totales	mg/ml	Mol de fármaco/mol lípido tota	nm
	FCSH:Col:R-DHPE		mg/ml	mol/l			
Ejemplo de preparación 3	54:46:0,1	2,8	8,12	0,019	1,52	0,114	123,8
Ejemplo 1 de preparación referencial	54:46:0,1	5,6	6,88	0,016	1,21	0,107	102,3

(Ejemplo de ensayo 3) Estabilidad acelerada de la formulación a 37 °C

Para cada formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 3, se llevó a cabo un ensayo acelerado calentándola a 37 °C durante 1 mes. Se recogió una alícuota de la formulación de CPT-11 calentada cada semana, y se diluyó 20 veces mediante la adición de solución salina fisiológica, seguido de ultracentrifugación (1 X 10<sup>5</sup> g, 2 horas, 10 °C) para precipitar una formulación de CPT-11. La intensidad de fluorescencia correspondiente a la cantidad de clorhidrato de irinotecán presente en el sobrenadante se determinó para calcular la velocidad de liberación del liposoma (%). Los resultados se muestran en la Fig. 2. Mientras tanto, el tamaño de partículas del liposoma en la dispersión calentada se midió cada semana. Los resultados se muestran en la Fig. 3.

Las Figs. 2 y 3 revelan que el liposoma preparado en el Ejemplo de preparación 3 no liberó fármaco alguno a 37 °C, incluso después de 1 mes (Fig. 2) y tenía un tamaño de partículas básicamente constante (Fig. 3), de modo que poseía una excelente estabilidad de formulación. Por otro lado, para el liposoma PEG-PE pre-introducido preparado en el Ejemplo 1 de preparación referencial, se inició la liberación del fármaco a 37 °C en la tercera semana, la velocidad de liberación de la cuarta semana era extremadamente alta (Fig. 2), y el tamaño de partículas se incrementó desde la tercera semana (Fig. 3), por lo que se sugirió que se produjo ruptura de membrana a partir de la tercera semana.

A raíz de estos resultados, para una formulación de CPT-11 altamente soportada de la presente invención, se descubrió que el liposoma PEG-PE post-introducido preparado mediante la adición de PEG-PE después de la formación liposomal tiene una forma preferente.

[Ejemplo 4]

Con el fin de ensayar la estabilidad de conservación a largo plazo y la estabilidad en sangre de una formulación de CPT-11 de la presente invención, las formulaciones de CPT-11 se prepararon a continuación por métodos en los Ejemplos de preparación 4 y 5.

(Ejemplo de preparación 4)

Se introdujo un fármaco por el método de carga remota de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1, excepto que la sustitución en fase acuosa externa para la dispersión liposomal PEG-PE post-introducido se llevó a cabo utilizando una columna de gel que se había sometido a sustitución disolvente con una solución de 10 mM de MES/sacarosa al 10 % (pH 6,0) en el Ejemplo de preparación 1 (3), para preparar de este modo una formulación de CPT-11 altamente soportada. Las composiciones se muestran en la Tabla 3.

(Ejemplo de preparación 5)

El procedimiento en el Ejemplo de preparación 4 se repitió excepto que el lípido mezclado a continuación preparado en (1) se utilizó como componente membranal, para preparar de este modo una formulación de CPT-11 altamente soportada que contiene clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina que es una sustancia cargada. El procedimiento se muestra a continuación.

(1) Preparación del lípido mezclado: 0,4561 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FCSH), 0,1876 g de colesterol (Col), y 0,0563 g de clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina (TRX-20) se disolvieron en 25 ml de t-butanol calentado a 60 °C, y la mezcla se enfrió en hielo, seguido por liofilización, para preparar así un lípido mezclado de FCSH:Col:TRX-20 = 50:42:8 (relación molar).

El procedimiento del Ejemplo de preparación 1 (2) se repitió excepto que se utilizaron 0,700 g del lípido mezclado preparado anteriormente, para preparar de este modo una dispersión liposomal.

A la dispersión liposomal se añadieron 1,42 ml (correspondiente a 0,75 % en moles de la cantidad de lípidos totales del lípido mezclado) de una solución de PEG<sub>5000</sub>-PE en agua destilada (36,74 mg/ml) para introducir PEG<sub>5000</sub>-PE. Posteriormente, el fármaco se introdujo por el método de carga remota de la misma forma que el Ejemplo de preparación 1 (3), excepto que la sustitución en fase acuosa externa para la dispersión liposomal se llevó a cabo con una solución de 10 mM de MES/sacarosa al 10 % (pH 6,0), para preparar de ese modo una formulación de CPT-11 altamente soportada. La composición se muestra en la Tabla 3.

(Ejemplo de ensayo 4) Ensayo de estabilidad de la preservación a largo plazo a 4 °C

Cada una de las formulaciones de CPT-11 obtenidas anteriormente se almacenó a 4 °C durante un periodo predeterminado. Tras transcurrir el periodo de tiempo predeterminado, el tamaño de partículas de la formulación de CPT-11 y la velocidad de liberación (%) de clorhidrato de irinotecán de la formulación de CPT-11 se midieron de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Tabla 3

		Ejemplo de preparación 4	Ejemplo de preparación 5
Composición de membrana inicial	Lípido	FCSH/Col	FCSH/Col/TRX-20
		54/46	50/42/8
Relación molar	PEG-PE	0,75	0,75
Concentración lipídica	Fosfolípido (FCSH) mg/ml	12,02	11,77
	Lípido total mol/l	0,028	0,03
Concentración de fármaco	mg/ml	2,67	2,41
Cantidad de fármaco soportado	mol de fármaco/mol de lípido total	0,136	0,119
Tamaño de partículas nm	Inicial	126,3	123,3
	Tras 6 meses de almacenamiento	122,2	125,4
Velocidad de liberación %	Inicial	0,63	0,12
	Tras 6 meses de almacenamiento	0,38	0,17

Para cada una de las formulaciones de CPT-11 preparadas en el Ejemplo 4 anterior, el tamaño de partículas y la velocidad de liberación no cambiaron incluso 6 meses después del almacenamiento a 4 °C. Por lo tanto, se esclareció que cada formulación de CPT-11 preparada mediante el método de carga remota tiene una excelente

estabilidad de conservación a largo plazo.

(Ejemplo de ensayo 5) Retención en sangre

- 5 Cada formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 4 (Ejemplos de preparación 4 y 5) o una solución de clorhidrato de irinotecán en solución salina fisiológica (que contiene 1 mg/ml de clorhidrato de irinotecán) se inyectó por vía intravenosa en la cola de un ratón (BALB/c, hembra, 5 semanas de vida, CLEA Japan, Inc.) en una cantidad de clorhidrato de irinotecán de 10 mg/kg (correspondiente a 8,77 g/kg en términos de cantidad de irinotecán).
- 10 Se extrajo sangre 1,6, y 24 horas después de la inyección y se centrifugó (3.000 rpm, 10 minutos, 4 °C) para recoger plasma. La concentración de clorhidrato de irinotecán en cada plasma se midió por medición de la intensidad de fluorescencia. El plasma se almacenó en un refrigerador hasta la medición. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y en la Fig. 4.
- 15 En el caso de cada formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 4, la concentración de clorhidrato de irinotecán en el plasma podría medirse hasta 24 horas después de la inyección en la vena de la cola, mientras que en el caso de la solución de clorhidrato de irinotecán en solución salina fisiológica, la concentración podría medirse solo 1 hora después de la inyección en la vena de la cola.
- 20 Por lo tanto, la formulación de CPT-11 preparada por el método de carga remota ha permitido el mantenimiento de la concentración de clorhidrato de irinotecán en plasma a una concentración elevada durante un periodo de tiempo prolongado.

[Tabla 4]

25

Tabla 4

Tiempo transcurrido (h)	Concentración en plasma (µg/ml)		
	1	6	24
Formulación de CPT-11 (Ejemplo de preparación 4)	189,41	128,03	13,18
Formulación de CPT-11 que contiene TRX-20 (Ejemplo de preparación 5)	185,29	84,67	3,38
Solución de clorhidrato de irinotecán en solución salina fisiológica	0,39	ND	ND

[Ejemplo 5]

- 30 Con el fin de ensayar la eficacia del fármaco de una formulación de CPT-11 altamente encapsulada de la presente invención, las formulaciones de CPT-11 se prepararon en los Ejemplos de preparación 6 a 9 a continuación.

(Ejemplo de preparación 6)

- 35 El procedimiento en el Ejemplo de preparación 4 se repitió excepto que el lípido mezclado preparado en (1) se utilizó a continuación como componente membranal, para preparar de este modo una formulación de CPT-11 altamente soportada que contiene clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina que es una sustancia cargada. El procedimiento se muestra a continuación.

- 40 (1) Preparación de lípido mezclado: 4,562 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FCSH), 1,876 g de colesterol (Col), y 0,564 g de clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina (TRX-20) se disolvieron en 50 ml de t-butanol calentado a 60 °C, y la mezcla se enfrió en hielo, seguido por liofilización, para preparar así un lípido mezclado de FCSH:Col:TRX-20 = 50:42:8 (relación molar).

- 45 El procedimiento del Ejemplo de preparación 1 se repitió excepto que se utilizaron 7,002 g del lípido mezclado preparado anteriormente, para preparar de este modo una dispersión liposomal.

- 50 A la dispersión liposomal se añadió una solución de polietilenglicol 5000-fosfatidiletanolamina (PEG<sub>5000</sub>-PE) en agua destilada (36,74 mg/ml) correspondiente a 0,75 % en moles de la cantidad de lípidos totales, y la mezcla se calentó a 60 °C durante 30 minutos para introducir PEG<sub>5000</sub>-PE. Posteriormente, el fármaco se introdujo por el método de carga remota de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1 (4), para preparar de ese modo una formulación de CPT-11 altamente encapsulada. La composición se muestra en la Tabla 5.

[Tabla 5]

55

Tabla 5

	Composición de membrana inicial (relación molar)		Concentración lipídica		Concentración del fármaco	Cantidad de fármaco soportado	Tamaño de partículas
	Lípido	PEG-PE	Fosfolípido	Lípidos totales	mg/ml	Mol de fármaco/mol de lípidos totales	nm
	FCSH:Col:TRX-20		mg/ml	mol/l			
Ejemplo de preparación 6	50:42:8	0,75	18,36	0,047	3,66	0,115	134,3

(Ejemplo de preparación 7)

- 5 El procedimiento en el Ejemplo de preparación 4 se repitió excepto que el lípido mezclado preparado en (1) se utilizó a continuación como componente membranal, para preparar de este modo una formulación de CPT-11 altamente soportada que contiene clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina que es una sustancia cargada. El procedimiento se muestra a continuación.
- 10 (1) Preparación del lípido mezclado: 4,562 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FCSH), 1,518 g de colesterol (Col), y 1,126 g de clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina (TRX-20) se disolvieron en 50 ml de t-butanol calentado a 60 °C, y la mezcla se enfrió en hielo, seguido por liofilización, para preparar así un lípido mezclado de FCSH:Col:TRX-20 = 50:34:16 (relación molar).
- 15 El procedimiento del Ejemplo de preparación 1 se repitió excepto que se utilizaron 7,207 g del lípido mezclado preparado anteriormente para preparar así un dispersante liposomal.

A la dispersión liposomal se añadió una solución de polietilenglicol 1600-colesterol (PEG<sub>1600</sub>-Col) en agua destilada (36,74 mg/ml) correspondiente a 2,0 % en moles de la cantidad de lípidos totales, y la mezcla se calentó a 60 °C durante 30 minutos para introducir PEG<sub>1600</sub>-Col. Posteriormente, el fármaco se introdujo por el método de carga remota de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1 (4), excepto que la sustitución en fase acuosa externa para la dispersión liposomal se llevó a cabo con una solución de 10 mM de MES/sacarosa al 10 % (pH 6,0), para preparar de ese modo una formulación de CPT-11 altamente encapsulada. La composición se muestra en la

25 [Tabla 6]

Tabla 6

Ejemplo de preparación 7	Composición de membrana inicial (relación molar)		Concentración lipídica		Concentración de fármaco	Cantidad de fármaco soportado	Tamaño de partículas
	Lípido	Col-PEG	Fosfolípido	Lípidos totales			
	FCSH:Col:TRX:20		mg/ml	mol/l	mg/ml	Mol de fármaco/mol de lípidos totales	nm
	50:34:16	2	15,78	0,041	3,26	0,119	133,7

(Ejemplo de preparación 8)

5 El procedimiento en el Ejemplo de preparación 4 se repitió excepto que el lípido mezclado preparado en (1) se utilizó a continuación como componente membranal, para preparar de este modo una formulación de CPT-11 altamente soportada que contiene clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina que es una sustancia cargada. El procedimiento se muestra a continuación.

10 (1) Preparación de lípido mezclado: 4,562 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FCSH), 1,876 g de colesterol (Col), y 0,564 g de clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina (TRX-20) se disolvieron en 50 ml de t-butanol calentado a 60 °C, y la mezcla se enfrió en hielo, seguido por liofilización, para preparar así un lípido mezclado de FCSH:Col:TRX-20 = 50:42:8 (relación molar).

15 El procedimiento del Ejemplo de preparación 1 se repitió excepto que se utilizaron 7,002 g del lípido mezclado preparado anteriormente, para preparar de este modo una dispersión liposomal.

20 A la dispersión liposomal se añadió una solución de polietilenglicol 5000-fosfatidiletanolamina (PEG<sub>5000</sub>-PE) en agua destilada (36,74 mg/ml) correspondiente a 0,75 % en moles de la cantidad de lípidos totales, y la mezcla se calentó a 60 °C durante 30 minutos para introducir PEG<sub>5000</sub>-PE. Posteriormente, el fármaco se introdujo por el método de carga remota de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1 (4), para preparar de ese modo una formulación de CPT-11 altamente soportada. La composición se muestra en la Tabla 6.

(Ejemplo de preparación 9)

25 El procedimiento en el Ejemplo de preparación 4 se repitió excepto que el lípido mezclado preparado en (1) se utilizó a continuación como componente membranal, para preparar de este modo una formulación de CPT-11 altamente soportada que contiene clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina que es una sustancia cargada. El procedimiento se muestra a continuación.

30 (1) Preparación del lípido mezclado: 4,940 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (FCSH), 2,060 g de colesterol (Col) se disolvieron en 50 ml de t-butanol calentado a 60 °C, y la mezcla se enfrió en hielo, seguido por liofilización, para preparar así un lípido mezclado de FCSH:Col = 54:46 (relación molar).

35 El procedimiento del Ejemplo de preparación 1 se repitió excepto que se utilizaron 7,002 g del lípido mezclado preparado anteriormente, para preparar de este modo una dispersión liposomal.

40 A la dispersión liposomal se añadió una solución de polietilenglicol 5000-fosfatidiletanolamina (PEG<sub>5000</sub>-PE) en agua destilada (36,74 mg/ml) correspondiente a 0,75 % en moles de la cantidad de lípidos totales, y la mezcla se calentó a 60 °C durante 30 minutos para introducir PEG<sub>5000</sub>-PE. Posteriormente, el fármaco se introdujo por el método de carga remota de la misma manera que en el Ejemplo de preparación 1 (4), para preparar de ese modo una formulación de CPT-11 altamente soportada. La composición se muestra en la Tabla 7.

[Tabla 7]

Tabla 7

	Composición de membrana inicial (relación molar)		Concentración lipídica		Concentración de fármaco	Cantidad de fármaco soportado	Tamaño de partículas
	FCSH:Col:TRX:20		mg/ml	mol/l	mg/ml	Mol de fármaco/mol de lípidos totales	nm
Ejemplo de preparación 8	50:42:8	0,75	19,04	0,049	3,22	0,098	121,6
Ejemplo de preparación 9	54:46:0	0,75	19,66	0,045	3,28	0,107	119,9

[Ejemplo 6]

Se examinó el efecto del valor del pH de una fase acuosa externa en la velocidad de encapsulación del fármaco.

5 (Ejemplo de preparación 10)

10 (1) Preparación del lípido mezclado: se pesaron 7,01 g de FCSH y 2,93 g de Col, y se añadieron 10 ml de etanol absoluto a ello. Entonces, estos se disolvieron con calentamiento a 68 °C. Después de confirmar que se disolvieron completamente, se añadieron 90 ml de solución de sulfato de amonio (250 mM) a los mismos, y la mezcla se agitó con calentamiento a 68 °C.

15 (2) Preparación del liposoma: tras la compleción de la agitación con calentamiento, la mezcla resultante se pasó a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,2 µm, cinco veces utilizando una extrusora calentada a 68 °C. Posteriormente, el filtro se intercambió por un filtro con un tamaño de poro de 0,1 µm, y el filtrado se hizo pasar a través del filtro cinco veces. A partir de entonces, el filtro se intercambió de nuevo por un filtro con un tamaño de poro de 0,1 µm, y el filtrado se hizo pasar a través del filtro cinco veces. Introducción de PEG<sub>5000</sub>-DSPE: después de la extrusión, a la muestra se añadieron 20,4 ml de una solución PEG<sub>5000</sub>-DSPE (36,74 mg/ml) con el fin de determinar un contenido en PEG<sub>5000</sub>-DSPE predeterminado (% en mol), y la mezcla se agitó a 60 °C durante 30 minutos, para introducir de este modo PEG<sub>5000</sub>-DSPE. Después de la introducción, la muestra se enfrió en hielo.

20 (3) Sustitución en fase acuosa externa: para cada muestra enfriada con hielo (8 ml), la sustitución en fase acuosa externa se llevó a cabo utilizando una columna de gel que se había sometido a la sustitución adecuada con cada una de las soluciones de la fase acuosa externa que posee diferentes valores de pH (pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, o 9,0), concretamente, las soluciones de la fase acuosa externa que poseen pH 4,0, 5,0 (soluciones de 10 mM de ácido acético/sacarosa al 10 %), la solución de fase acuosa externa que posee pH 6,0 (solución de 10 mM de histidina/sacarosa al 10 %), las soluciones de la fase acuosa externa que poseen pH 7,0, 8,0, 9,0 (soluciones de 10 mM de Tris/sacarosa al 10 %). Después de la sustitución de fase acuosa externa, se determinó cada concentración de FCSH utilizando un kit de determinación de fosfolípidos para la dispersión liposomal. La cantidad de fosfolípidos totales (mM) se calculó a partir de la concentración de FCSH.

25 (4) Encapsulación del fármaco: se preparó una solución de clorhidrato de irinotecán (CPT-11)/agua de OI (agua purificada con membrana de ósmosis inversa) con una concentración de 10 mg/ml. La solución de clorhidrato de irinotecán se añadió a la dispersión liposomal en una cantidad de CPT-11/cantidad de lípidos totales = 0,16 (mol/mol) con respecto a la cantidad de lípidos totales (mM) anterior, y la mezcla se agitó a 60 °C durante 60 minutos, para introducir de ese modo clorhidrato de irinotecán. Después de la introducción, la muestra se enfrió en hielo. Después de la encapsulación de clorhidrato de irinotecán, la dispersión liposomal se hizo pasar a través de una columna de gel que se había sometido a la sustitución con una solución de 10 mM de histidina/sacarosa al 10 % (pH 6,5) para eliminar los fármacos no encapsulados.

La concentración lipídica (FCSH), la concentración del fármaco (CPT-11) y el tamaño de partículas de cada formulación de CPT-11 obtenidas anteriormente se muestran en la Tabla 8.

40 (Eficiencia de encapsulación del fármaco)

Para cada formulación de CPT-11 obtenida anteriormente, la eficiencia de la encapsulación del fármaco (%) se calculó a partir de la relación de la concentración del fármaco final de CPT-11 con respecto a la concentración inicial del fármaco 0,16 (mol/mol) de acuerdo con la siguiente expresión.

45

[Fórmula matemática 1]

$$\text{Eficiencia de encapsulación de CPT-11 (\%)} = \left\{ \frac{\text{CPT-11 final/lípidos totales (mol/mol)}}{\text{CPT-11 inicial/lípidos totales (mol/mol)}} \times 100 \right.$$

50 Los resultados se muestran en la Tabla 8 y en la Fig. 5. La tabla y la figura muestran lo siguiente: en el caso en que el valor de pH de la fase acuosa externa sea 8,0 o menos, la eficiencia de encapsulación de CPT-11 (%) es un valor extremadamente alto del 90 % o más, mientras que en el caso en el que el valor sea mayor a 8,0, la eficiencia de encapsulación de CPT-11 (%) disminuye.

[Tabla 8]



Tabla 8

Fase acuosa externa pH	Concentración de FCSH (mg/ml)	Concentración de CPT-11 (mg/ml)	CPT-11 inicial/lípidos totales (mol/mol)	CPT-11 final/lípidos totales (mol/mol)	Eficiencia de encapsulación (%)	Tamaño de partículas (nm)
4	11,4	2,9	0,16	0,163	101,9	121,5
	12,5	3,2		0,159	99,4	123,8
5	12,7	3,3		0,164	102,5	122,6
	12,5	3,1		0,157	98,1	124,0
6	13,0	3,2		0,154	96,3	123,5
	14,3	3,4		0,151	94,4	122,9
7	12,1	3,1		0,158	98,8	124,7
	13,7	3,2		0,148	92,5	122,4
8	13,3	3,1		0,147	91,9	124,1
	13,6	3,2		0,148	92,5	123,8
9	12,4	2,4		0,120	75,0	121,4
	12,8	2,3		0,115	71,9	124,1

[Ejemplo 7]

- 5 Se examinó el efecto del valor del pH de la fase acuosa externa en la estabilidad del fármaco.

10 A 1 ml de cada una de las fases acuosas externas que tienen diferentes valores de pH, concretamente, las soluciones de la fase acuosa externa que poseen pH 4,0, 5,0 (soluciones de 10 mM de ácido acético/sacarosa al 10 %), la solución de fase acuosa externa que posee pH 6,0 (solución de 10 mM de histidina/sacarosa al 10 %), las soluciones de la fase acuosa externa que poseen pH 7,0, 8,0, 9,0 (soluciones de 10 mM de Tris/sacarosa al 10 %) (pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, o 9,0) que se utilizaron en (3) del Ejemplo de preparación 10 se añadieron 0,7 ml de una solución de clorhidrato de irinotecán (CPT-11)/agua de OI con una concentración de 10 mg/ml (agua purificada con membrana de ósmosis inversa), y la mezcla se agitó a 60 °C durante 60 minutos.

- 15 La solución de CPT-11 obtenida anteriormente se diluyó 20 veces con cada solución de fase acuosa externa, y 5 µl de la muestra se sometieron a medición por cromatografía líquida de alta resolución. A partir de entonces, la relación de hidrólisis (relación existente de la forma circular abierta) (%) del anillo de α-hidroxilactona se calculó de acuerdo con la siguiente expresión.

$$\text{Relación existente de la forma circular abierta de CPT-11 (\%)} = \left\{ \frac{\dot{A}_{\text{abierta}}}{\dot{A}_{\text{abierta}} + 1,102 \times \dot{A}_{\text{cerrada}}} \right\} \times 100$$

- 20  $\dot{A}_{\text{abierta}}$ : Un área del pico de la forma circular abierta de CPT-11  
 $\dot{A}_{\text{cerrada}}$ : Un área del pico de la forma circular abierta de CPT-11

25 Los resultados se muestran en la Fig. 5.

- 30 Se esclareció que, en el caso en que el valor del pH de la fase acuosa externa sea 8,0 o más, la relación existente de la forma circular abierta de CPT-11 (%) aumentó y era un valor extremadamente alto del 95 % o más. Con el fin de mantener la actividad de CPT-11, se requiere que el valor del pH sea 4,0 o menos para suprimir la hidrólisis del anillo de α-hidroxilactona. Sin embargo, desde el aspecto de la estabilidad lipídica (hidrólisis lipídica), el valor de pH es deseablemente de manera aproximada 6,0 a 7,0. Teniendo en cuenta los resultados del Ejemplo 6, se descubrió que el valor de pH de la fase acuosa externa después de la introducción del fármaco era deseablemente de manera aproximada 4,0 a 7,0.

[Ejemplo 8]

(Ejemplo de preparación 11)

5 (1) Preparación del liposoma

Se pesaron 70,87 g de FCSH y 29,13 g de Col, y se añadieron 100 ml de etanol absoluto al ello. Entonces, estos se disolvieron con calentamiento a 68 °C. Después de confirmar que se disolvieron completamente, se añadieron 900 ml de solución de sulfato de amonio (250 mM) a los mismos, y la mezcla se agitó con calentamiento a 68 °C.

10

(2) Regulación del tamaño de partículas del liposoma

Regulación del tamaño de partículas del liposoma: después de la compleción de la agitación con calentamiento, la mezcla resultante se pasó a través de un filtro con un tamaño de poro de 100 nm cinco veces utilizando una extrusora calentada a 68 °C.

15

Introducción de PEG<sub>5000</sub>-DSPE: después de la extrusión, a la muestra se añadieron 200 ml de una solución de PEG<sub>5000</sub>-DSPE (36,74 mg/ml) con el fin de tener un contenido en PEG<sub>5000</sub>-DSPE predeterminado (% en mol), y la mezcla se agitó a 60 °C durante 30 minutos, para introducir de este modo PEG<sub>5000</sub>-DSPE. Después de la introducción, la muestra se enfrió en hielo.

20

(3) Sustitución en fase acuosa externa

Para la muestra enfriada con hielo, la sustitución en fase acuosa externa se llevó a cabo con un sistema de filtración de flujo cruzado con una solución de fase acuosa externa (solución de 10 mM de histidina/sacarosa al 10 %) (pH 6,5). Después de la sustitución en fase acuosa externa, se determinó la concentración de FCSH y la concentración de colesterol utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento. Una cantidad de clorhidrato de irinotecán que debe encapsularse se calculó a partir de la suma de la concentración de FCSH y la concentración de colesterol como la concentración de lípidos totales.

25

30

(4) Encapsulación del fármaco

Se preparó una solución de clorhidrato de irinotecán (CPT-11)/agua de OI (agua purificada con membrana de ósmosis inversa) que posee una concentración de 10 mg/ml. La solución de clorhidrato de irinotecán se añadió a la dispersión liposomal en una cantidad de CPT-11/cantidad de lípidos totales = 0,16 (mol/mol) con respecto a la cantidad de lípidos totales (mM) anterior, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 20 minutos, para introducir de ese modo clorhidrato de irinotecán. Después de la introducción, la muestra se enfrió en hielo.

35

(5) Eliminación del fármaco no encapsulado

Tras la encapsulación de clorhidrato de irinotecán, a la dispersión liposomal se añadió la solución de fase acuosa externa, y la eliminación del fármaco no encapsulado se llevó a cabo con un sistema de filtración de flujo cruzado.

40

(6) Regulación de la concentración

Para la dispersión liposomal después de la eliminación de los fármacos no encapsulados, se determinó una cantidad de clorhidrato de irinotecán utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento y se reguló a 5,0 mg/ml de concentración de clorhidrato de irinotecán.

45

(7) Esterilización del filtro

Después de la regulación de la concentración, la dispersión liposomal se introdujo en un tubo vial a través de una esterilización del filtro utilizando un filtro de esterilización con un tamaño de poro de 0,2 µm.

50

Las composiciones y los tamaños de partículas de las formulaciones de CPT-11 obtenidas anteriormente se muestran en la Tabla 9.

55

[Tabla 9]

60

Tabla 9

	Composición de membrana inicial (relación molar)		Concentración lipídica		Concentración del fármaco	Cantidad de fármaco soportado	Tamaño de partículas
	Lípido	PEG-DSPE	Fosfolípido (FCSH)	Lípidos totales	mg/ml	Mol de fármaco/mol de lípidos totales	nm
	FCSH:Col:		mg/ml	mM			
Ejemplo de preparación 11	54:46	0,75	20	47	4,92	0,16	97,2

(Ejemplo de ensayo 6) Efecto antitumoral

5 Se implantaron subcutáneamente  $2,5 \times 10^6$  células/ratón de células cancerosas de próstata humana (PC-3) en la región inguinal izquierda del ratón (BALB/c desnudo, macho, 6 semanas de vida, Charles River Japan, Inc.). Tras la implantación tumoral, un volumen tumoral presuntivo se calculó por  $1/2 ab^2$  (a representa un diámetro longitudinal de un tumor y b representa un diámetro del eje corto del mismo). Desde el día siguiente de un día (día 0) en el cual un volumen tumoral presuntivo alcanzó  $40 \text{ mm}^3$ , en 3 ocasiones cada cuatro días (días 1, 5 y 9), una preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 11 o una solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán se inyectó a una vena de la cola del ratón. Hubo ratones que no recibieron inyección alguna de cualquiera de los agentes como grupo de control.

10 Un volumen tumoral presuntivo y un peso corporal de un ratón se midieron en los días 1, 5, 9, 12, 16, y 22.

15 Tras extirpar los tumores y medir un peso de los mismos en el día 22, se calculó, además, una tasa de inhibición del crecimiento tumoral T.I (%) mediante la siguiente fórmula.

$$\% \text{ T. I.} = (1 - \text{peso medio tumoral en un grupo de tratamiento} / \text{peso medio tumoral en un grupo de control}) \times 100$$

20 La Tabla 10 y Figs. 6 y 7 muestran los resultados.

25 La preparación de CPT-11 y la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán demostraron cada una un efecto supresor significativo del crecimiento tumoral en el cáncer de próstata humano con el grupo de tratamiento comparado con el grupo control. La preparación de CPT-11 demostró mayor efecto antitumoral que la de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán (Tabla 10, Fig. 6). Además, el agente tampoco influyó en el peso corporal del ratón (Fig. 7).

[Tabla 10]

Tabla 10			
	Dosis (mg/kg)	Peso tumoral (g, media $\pm$ D.E.)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de control	-	1,26 $\pm$ 0,18	-
Preparación de CPT-11 (Ejemplo de preparación 11)	25	0,03 $\pm$ 0,01	97,9
	50	0,02 $\pm$ 0,00	98,3
	100	0,01 $\pm$ 0,00	99,0
Solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán	25	0,64 $\pm$ 0,25	49,0
	50	0,66 $\pm$ 0,13	48,0
	100	0,48 $\pm$ 0,20	62,3

(Ejemplo de ensayo 7) Farmacocinética

35 La preparación de CPT-11 preparada en el ejemplo de preparación 11 o la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán se inyectó de forma continua a una vena cefálica de un macaco cangrejero (macho, 4 a 5 años, Centro de Investigación de Animales de Laboratorio con Primates de Guangxi) durante 4 minutos hasta llenar un contenido de clorhidrato de irinotecán con 10 mg/kg.

Al recoger sangre de los macacos cangrejeros inmediatamente después de la inyección y después del comienzo de la inyección; después de 10 y 30 min; y después de 1, 6, 24, 48, 72, 168, 336, y 504 horas; se obtuvo plasma en sangre por separación centrífuga. Proporcionando 50 µl de plasma en sangre con 550 µl de una solución de patrón interno B (una solución de metanol de sustancias de patrón interno) y empleando la fuerza centrífuga, el sobrenadante se diluyó con metanol 100 veces como una muestra para la medición de la concentración de CPT-11 total. Mientras tanto, proporcionar 50 µl de cada plasma en sangre con 200 µl de una solución de patrón interno A (solución de 0,147 mol/l H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> de sustancias de patrón interno), 200 µl de la misma se sometieron a una separación centrífuga (100.000 x g, durante 30 min, 10 °C). 100 µl de la capa superior se separaron y se empleó extracción en fase sólida para obtener el eluyente como muestras para la medición de la concentración de CPT-11 libre (es decir, CPT-11 liberado del liposoma, en lo sucesivo referido como "CPT-11 liberado del liposoma"), medición de la concentración de SN-38, y medición de la concentración de SN-38G (SN-38 10-O-gluconida). Las muestras obtenidas midieron cada concentración de las mismas con LC/MS/MS. Las Figs. 8 a 11 muestran los resultados.

En la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, la concentración total de CPT-11 se reduce rápidamente después de la inyección y se reduce en menor medida que el límite inferior de cuantificación (<1 µg/ml) en 1 hora. Mientras tanto, para la preparación de CPT-11, la concentración total de CPT-11 se reduce de forma exponencial a partir de 1 a 48 horas después de la inyección, y la extensión suficiente de tiempo de retención se reconoció en comparación con la de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán (Fig. 8).

En la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, la concentración de CPT-11 libre se reduce de forma relativamente rápida hasta 6 horas después de alcanzar la concentración más alta inmediatamente tras la inyección, después de lo cual la concentración se redujo de forma moderada. Mientras tanto, en la preparación de CPT-11, la concentración de CPT-11 libre alcanzó la concentración más alta 1 hora después de la inyección, y después se redujo moderadamente (Fig. 9).

En la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, la concentración de SN-38 se redujo rápidamente después de alcanzar la concentración más alta inmediatamente tras la inyección, y se redujo en menor medida que el límite inferior de cuantificación (<0,0005 µg/ml) hasta 24 horas. Mientras tanto, para la preparación de CPT-11, la concentración de SN-38 se mantuvo durante 1 hora después de alcanzar la concentración más alta inmediatamente tras la inyección. La concentración reducida tras eso, se mantuvo de 6 a 48 horas (Fig. 10).

Tanto para la preparación de CPT-11 como la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, la concentración de SN-38G aumentó 1 hora después de la inyección, para reducirse ligeramente con el mantenimiento de la concentración (Fig. 11).

(Ejemplo de ensayo 8) Hemotoxicidad

La preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 11 se inyectó en una vena de la cola de la rata (rata CD (SD)IGS, macho, 7 semanas de vida, Charles River Japan, Inc.) hasta llenar un contenido de clorhidrato de irinotecán con 3, 10, y 30 mg/kg, o llenar la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán con 30 mg/kg.

Al recoger 0,4 ml de sangre de una vena cervical de la rata antes y después de la inyección; y tras 2, 4, 6, 13, 20, y 27 días (durante 4 semanas); el número de neutrófilos y linfocitos se midió con el analizador de hematología automatizado (Sysmex XT-2000i, Sysmex). Las Figs. 12 y 13 muestran los resultados.

El número de neutrófilos se redujo transitoriamente para recuperarse rápidamente después con cualquier cantidad de inyección. En una dosis de 10 y 30 mg/kg como contenido de clorhidrato de irinotecán en comparación con 3 mg/kg del contenido, el alcance de la reducción del número era grande. En una dosis de 30 mg/kg, el número aumentó rápidamente en el periodo de recuperación. En 30 mg/kg de cada uno de los dos agentes de inyección, no se reconocieron diferencias significativas entre las transiciones en el número de neutrófilos (Fig. 12). El número de linfocitos registró una tendencia a la baja inmediatamente después de la inyección aunque solo ligeramente. Sin embargo, no hubo diferencias entre las inyecciones (Fig. 13).

Los resultados anteriores describieron hematoxicidad débil transitoria reconocida por neutrófilos en la preparación de CPT-11. No obstante, la intensidad de hematoxicidad era aproximadamente igual a la de la misma cantidad de solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán.

[Ejemplo 9]

(Ejemplo de preparación 12)

(1) Preparación del liposoma

Se pesaron 65,250 g de FCSH, 26,800 g de Col, y 8,000 g de TRX-20, y se añadieron a ello 100 ml de etanol absoluto. Entonces, estos se disolvieron con calentamiento a 68 °C. Después de confirmar que se disolvieron completamente, se añadieron 900 ml de solución de sulfato de amonio (250 mM) a ello, y la mezcla se agitó con

calentamiento a 68 °C.

(2) Regulación del tamaño de partículas del liposoma

- 5 Regulación del tamaño de partículas del liposoma: después de la compleción de la agitación con calentamiento, la mezcla resultante se pasó a través de un filtro con un tamaño de poro de 100 nm cinco veces utilizando una extrusora calentada a 68 °C.

10 Introducción de PEG<sub>5000</sub>-DSPE: tras la extrusión, a la muestra se añadieron 200 ml de una solución de PEG<sub>5000</sub>-DSPE (36,74 mg/ml) con el fin de tener un contenido en PEG<sub>5000</sub>-DSPE predeterminado (% en mol), y la mezcla se agitó a 60 °C durante 30 minutos, para introducir así PEG<sub>5000</sub>-DSPE. Después de la introducción, la muestra se enfrió en hielo.

15 (3) Sustitución en fase acuosa externa

Para la muestra enfriada con hielo, la sustitución en fase acuosa externa se llevó a cabo con un sistema de filtración de flujo cruzado con una solución de fase acuosa externa (solución de 10 mM de histidina/sacarosa al 10 %) (pH 6,5). Después de la sustitución de la fase acuosa externa, se determinó la concentración de FCSH y la concentración de colesterol utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento. Una cantidad de clorhidrato de irinotecán que debe encapsularse se calculó a partir de la suma de la concentración de FCSH, la concentración de colesterol y la concentración de TRX-20 como la concentración de lípidos totales.

(4) Encapsulación del fármaco

25 Se preparó una solución de clorhidrato de irinotecán (CPT-11)/agua de OI (agua purificada con membrana de ósmosis inversa) que posee una concentración de 10 mg/ml. La solución de clorhidrato de irinotecán se añadió a la dispersión liposomal en una cantidad de CPT-11/cantidad de lípidos totales = 0,16 (mol/mol) con respecto a la cantidad de lípidos totales (mM) anterior, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 20 minutos, para introducir de ese modo clorhidrato de irinotecán. Tras la introducción, la muestra se enfrió en hielo.

30 (5) Eliminación del fármaco no encapsulado

Tras la encapsulación de clorhidrato de irinotecán, a la dispersión liposomal se añadió la solución de fase acuosa externa, y la eliminación del fármaco no encapsulado se llevó a cabo con un sistema de filtración de flujo cruzado.

35 (6) Regulación de la concentración

Para la dispersión liposomal una vez eliminados los fármacos no encapsulados, se determinó una cantidad de clorhidrato de irinotecán utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento y se reguló a 5,0 mg/ml de concentración de clorhidrato de irinotecán.

(7) Esterilización del filtro

45 Tras la regulación de la concentración, la dispersión liposomal se introdujo en un tubo vial a través de una esterilización del filtro utilizando un filtro de esterilización con un tamaño de poro de 0,2 µm.

La composición y el tamaño de partículas de la formulación de CPT-11 obtenidos anteriormente se muestran en la Tabla 11.

50 [Tabla 11]

Tabla 11

	Composición de membrana inicial (relación molar)		Concentración lipídica		Concentración de fármaco	Cantidad de fármaco soportado	Tamaño de partículas
	Lípido	PEG-DSPE	Fosfolípido (FCSH)	Lípidos totales			
			FCSH:Col:TRX:20	mg/ml	mM		
Ejemplo de preparación 12	50:42:8	0,75	18	44	4,66	0,15	92,0

(Ejemplo de ensayo 9) Efecto antitumoral

Se implantaron subcutáneamente  $2,5 \times 10^6$  células/ratón de células cancerosas de colon humano (HCT116) en la región inguinal izquierda del ratón (BALB/c desnudo, ♂, 6 semanas de vida, Charles River Japan, Inc.). Tras la implantación tumoral, un volumen tumoral presuntivo se calculó por  $1/2 ab^2$  (a representa un diámetro longitudinal de un tumor y b representa un diámetro del eje corto del mismo). Al día siguiente, en 3 ocasiones cada cuatro días (días 1, 5 y 9), una preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 12 o una solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán se inyectó en una vena de la cola del ratón. Hubo ratones que no recibieron inyección alguna de cualquiera de los agentes como grupo de control.

Un volumen tumoral presuntivo y un peso corporal de un ratón se midieron después de 5, 8, 12, 16, y 21 días a partir de la inyección. Al extirpar los tumores 21 días después de la inyección y medir un peso de los mismos, se calculó además, una tasa de inhibición de crecimiento tumoral T. I. (%) mediante la fórmula mostrada en el Ejemplo de ensayo 6.

La Tabla 12 y Figs. 14 y 15 muestran los resultados.

La preparación de CPT-11 y la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán demostraron cada una un efecto supresor significativo del crecimiento tumoral en el cáncer de colon humano con el grupo de tratamiento comparado con el grupo control. La preparación de CPT-11 demostró mayor efecto antitumoral que la de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán (Tabla 12, Fig. 14). Además, ninguno de los agentes influyó en el peso corporal del ratón (Fig. 15).

[Tabla 12]

Tabla 12

	Dosis (mg/kg)	Peso tumoral (g, media $\pm$ D.E.)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de control	-	1,25 $\pm$ 0,15	-
Preparación CPT-11 (Ejemplo de preparación 12)	18,75	0,61 $\pm$ 0,11	51,1
	37,5	0,36 $\pm$ 0,07	70,8
	75	0,14 $\pm$ 0,03	88,7
Solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán	18,75	0,76 $\pm$ 0,06	39,0
	37,5	0,71 $\pm$ 0,08	43,4
	75	0,53 $\pm$ 0,14	57,4

(Ejemplo de ensayo 10) Farmacocinética debido a la administración individual

Después de aplicar cánulas a la vena femoral y a la vena femoral de la rata (rata CD (SD)IGS, macho, 7 semanas de vida, Charles River Japan, Inc.) con anestesia, y el establecimiento de la rata en una jaula de Bollman, la preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 12 o la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán se inyectó a la rata por vía intravenosa a través de una cánula en la vena femoral hasta llenar un contenido de clorhidrato de irinotecán con 3, 10, y 30 mg/kg.

Al recoger sangre de la rata tras la inyección; después de 2, 10, y 30 min; y después de 1, 3, 6, 9, 24 y 30 horas; 50  $\mu$ l de plasma en sangre se obtuvieron por separación centrífuga, a diluir con 200  $\mu$ l de una solución de patrón interno. Después de proporcionar 50  $\mu$ l de plasma sanguíneo diluido con la solución de patrón interno con 500  $\mu$ l de metanol y agitación, el plasma en sangre diluida se diluyó con  $H_3PO_4$  0,146 M 10 veces como muestra para la medición de la concentración de CPT-11 total. Mientras tanto, se sometieron 200  $\mu$ l del plasma en sangre diluida a separación centrífuga (100.000 x g, durante 30 min, 10 °C), y los 50  $\mu$ l obtenidos en la capa superior se diluyeron 10 veces con  $MH_3PO_4$  0,146 como muestras para la medición de la concentración de CPT-11 libre, medición de la concentración de SN-38, y medición de la concentración de SN-38G. Las muestras obtenidas midieron cada concentración de las mismas con HPLC PROSPEKT de acuerdo con métodos, tales como el método Kurita (*J. Chromatogr. B* 724, págs. 335 a 344, 1999). Las Figs. 16 a 19 muestran los resultados.

En la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, la concentración total de CPT-11 se redujo rápidamente después de la inyección y se redujo de forma exponencial a partir de 0,5 a 9 horas con cualquier cantidad de inyección (3, 10 y 30 mg/kg). Mientras tanto, para la preparación de CPT-11, la concentración total de CPT-11 se redujo casi exponencialmente a partir de 10 min a 30 horas después de la inyección, y la extensión suficiente de tiempo de retención se reconoció en comparación con la de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán (Fig. 16).

La concentración de CPT-11 liberado del liposoma se redujo casi exponencialmente a partir de 10 min a 30 horas después de la inyección de la preparación de CPT-11, y la extensión suficiente de tiempo de retención se reconoció en comparación con la de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán (Fig. 17).

5 En la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, la concentración de SN-38 se redujo rápidamente, justo tras la inyección, y se redujo moderadamente después de 1 hora con cualquier cantidad de inyección, para ser aproximadamente conservada a las 3 horas con 30 mg/kg. Mientras tanto, para la preparación de CPT-11, la concentración de SN-38 se redujo moderadamente después de alcanzar la concentración más alta a partir de 3 a 6 horas tras la inyección en dosis de 3 y 10 mg/kg, respectivamente. La concentración se redujo rápidamente durante 1 hora después de alcanzar la concentración más alta inmediatamente después de la inyección, que se conserva aproximadamente a las 9 horas con una dosis de 30 mg/kg (Fig. 18).

15 En la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, la concentración de SN-38G se redujo rápidamente 1 hora después de alcanzar la concentración más alta a los 10 min tras la inyección con cualquier cantidad de inyección, para reducirse de manera moderada posteriormente. Mientras tanto, para la preparación de CPT-11, la concentración de SN-38G aumentó 1 hora después de la inyección, para reducirse ligeramente con el mantenimiento de la concentración (Fig. 19).

20 [Ejemplo 10]

Se ensayó la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 9 como la formulación de CPT-11 altamente soportada de la presente invención.

25 (Ejemplo de ensayo 11) Efecto antitumoral

Células cancerosas de colon humano (HT-29) con 2 a 3 mm cuadrados se trasplantaron por vía subcutánea en una región inguinal de un ratón (BALB/c desnudo, macho, 6 semanas de vida, CLEA Japan, Inc.) con una aguja para trasplante. La formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 9 o una solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán se inyectó en una vena caudal tres veces en total, que se produjo en un momento (día 1) en el que se calcula aproximadamente un volumen estimado de tumores por  $1/2 ab^2$  ( a se refiere a un eje mayor de cada tumor, b se refiere a un eje menor) en torno a  $100 \text{ mm}^3$ , 4 días adicionales (día 5), y 8 días adicionales (día 9), después del trasplante tumoral. Los ratones que no recibieron inyección alguna de cualquiera de los agentes se emplearon como grupo de control.

35 El volumen estimado de tumores y un peso corporal del ratón se calcularon a los 4, 8, 12, 17, 21 días después de una primera inyección. Los tumores también se extirparon 21 días después de la inyección y se midió el peso de los tumores, para calcular de ese modo una tasa de inhibición de la proliferación tumoral, T.I. (%) por la fórmula mostrada en el Ejemplo de ensayo 6.

40 Los resultados se muestran en la Tabla 13, Fig. 20 y Fig. 21.

45 En el cáncer de colon humano, la formulación de CPT-11 y la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán mostraron cada una un fuerte efecto inhibidor de proliferación tumoral en comparación con el grupo control. Además, la formulación de CPT-11 reveló un alto efecto antitumoral en comparación con el de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán (Tabla 13, Fig. 20). Además, ninguno de los agentes afectó al peso corporal del ratón (Fig. 21).

[Tabla 13]

50

Tabla 13			
	Dosis (mg/kg)	Peso tumoral (g, media ± D.E.)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de control	-	0,58±0,29	-
Preparación CPT-11 (Ejemplo de preparación 11)	25	0,18±0,15	69,4
	50	0,09±0,06	84,1
	100	0,05±0,03	92,0
Solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán	25	0,36±0,41	38,2
	50	0,44±0,36	24,9
	100	0,33±0,32	44,0



(Ejemplo de ensayo 12) Farmacocinética debido a la administración individual

Fibrosarcoma de ratón (Meth A),  $2,5 \times 10^5$  células/ratón se trasplantaron por vía subcutánea en una región inguinal de un ratón (BALB/c, hembra, 7 semanas de vida, Japan SLC, Inc.). Los tumores se dejaron crecer en 20 días después del trasplante tumoral, y a continuación, la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 9 o una solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán se administró en una vena caudal con 10 mg/kg como concentración de clorhidrato de irinotecán.

Tras la administración, se recogió sangre de un corazón tras 10 y 30 minutos, y 1, 3, 6, 12, 24, 48, y 96 horas, y se trató en una centrifugadora (15.000 rpm, 1 minuto, 0 °C), para obtener de ese modo plasma. El plasma obtenido se diluyó 50 veces con  $H_3PO_4$  0,146 M, y se añadió a una cantidad idéntica que la solución de patrón interno, como muestra para la medición de la concentración de CPT-11 en el plasma de un animal administrado con la formulación de CPT-11. El plasma obtenido se diluyó 4 veces con  $H_3PO_4$  0,146 M, y se añadió a una cantidad idéntica que la solución de patrón interno, como muestra para la medición de una concentración de SN-38, una concentración de SN-38G en el plasma del animal administrado con la formulación de CPT-11, y una concentración del fármaco en el plasma del animal administrado con la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán.

Una vez recogida la sangre del corazón, los tumores se extrajeron de la zona inguinal, se lavaron con solución salina fisiológica, y luego se midió el peso del tumor. El tumor resultante se añadió a una cantidad de 5 veces de  $H_3PO_4$  0,146 M enfriado, y se homogeneizó con un homogeneizador de teflón. 200  $\mu$ l del tumor homogeneizado resultante se añadieron a 50  $\mu$ l de solución de patrón interno y 0,75 ml de metanol, suspendido, y luego se dejó reposar durante toda la noche a -20 °C. La solución resultante se trató en una centrifugadora (15.000 rpm, 3 minutos, 0 °C) antes de añadir 0,4 ml de  $H_3PO_4$  0,146 M a 0,1 ml de sobrenadante, para obtener así una muestra para la medición por HPLC. Cada concentración de la muestra resultante para la medición se midió con un HPLC PROSPEKT según el método Kurita (*J Chromatogr B* 724, págs. 335-344, 1999), o similares. Los resultados se muestran en las Figs. 22 a 27.

La formulación de CPT-11 aumentó un área bajo la concentración en la curva plasma-tiempo hasta 302 veces, y un tiempo de permanencia media de hasta 4,4 veces en comparación con los de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, respectivamente, debido a formulación liposomal, en la concentración de CPT-11 en el plasma (Fig. 22). Mientras tanto, la preparación como una formulación liposomal aumentó un área bajo la concentración en la curva plasma-tiempo hasta 2,5 veces al igual que para la concentración de SN-38 en el plasma, y se extendió un tiempo de permanencia media (Fig. 23). Además, la preparación como una formulación liposomal aumentó un área bajo la concentración en la curva plasma-tiempo hasta 1,8 veces al igual que para la concentración de SN-38G en el plasma, y se extendió un tiempo de permanencia media (Fig. 24).

En la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, una concentración de clorhidrato de irinotecán en los tejidos tumorales alcanzó un nivel máximo de concentración en el tejido tumoral a las 0,5 horas tras la administración, y luego disminuyó con 2,3 horas de semivida. Mientras tanto, en la formulación de CPT-11, la concentración aumentó gradualmente, y alcanzó un nivel máximo de concentración en el tejido tumoral tras 12 horas, y luego disminuyó más ligeramente que el de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, para aumentar un área bajo la concentración en la curva de tiempo-tejido tumoral 9,0 veces (Fig. 25).

En la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, una concentración de SN-38 en los tejidos tumorales alcanzó una concentración máxima en el tejido tumoral a los 10 minutos después de la administración y, a continuación disminuyó gradualmente. En la formulación de CPT-11, la concentración aumentó gradualmente a las 6 horas tras la administración, y después se mantuvo una concentración constante aproximadamente a las 48 horas. A partir de ahí, la concentración se redujo a extinción de una semivida de casi la misma forma que la de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, para aumentar un área bajo la concentración en la curva de tejido tumoral-tiempo 3,9 veces (Fig. 26).

En la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán, una concentración de SN-38G en los tejidos tumorales alcanzó una concentración máxima en los tejidos tumorales a los 10 minutos tras la administración y, a continuación disminuyó gradualmente. En la formulación de CPT-11, la concentración aumentó gradualmente, alcanzó una concentración máxima en el tejido tumoral 12 horas después de la administración y, a continuación disminuyó gradualmente (Fig. 27).

Por lo tanto, se confirmó que la retención en sangre y las propiedades de transición tumoral en la formulación de CPT-11 fueron mayores que las de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán.

[Ejemplo 11]

Se ensayó la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 7 como la formulación de CPT-11 altamente soportada de la presente invención.

(Ejemplo de ensayo 13) Efecto antitumoral debido a la administración de un fármaco tres veces

Fibrosarcoma de ratón (Meth A),  $2,5 \times 10^5$  células/ratón se trasplantaron por vía subcutánea en una región inguinal de un ratón (BALB/c, hembra, 7 semanas de vida, CLEA Japan, Inc.). La formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 7 o una solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán se inyectó en una vena caudal tres veces en total, es decir, 7, 9, y 11 días o 7, 11, y 15 días después del trasplante de los tumores. Los ratones que no recibieron inyección alguna de cualquiera de los agentes se emplearon como grupo de control.

Los tumores también se extrajeron después de 21 días de haberse producido el trasplante y se midió el peso de los tumores, para calcular de ese modo cada tasa de inhibición de la proliferación tumoral, T.I. (%) por la fórmula mostrada en el Ejemplo de ensayo 6. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

En el fibrosarcoma de ratón, la formulación de CPT-11 y la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán mostraron cada una un efecto significativo inhibitor de la proliferación tumoral en comparación con el grupo control. Además, la formulación de CPT-11 exhibió un efecto antitumoral mayor que el de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán. Además, ninguno de los agentes afectó al peso corporal del ratón.

[Tabla 14]

Tabla 14				
	Dosis (mg/kg)	Tratamiento en días	Peso tumoral (g, media $\pm$ D.E.)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de control	-	-	2,01 $\pm$ 0,30	-
Formulación de CPT-11 (Ejemplo de preparación 7)	50	7,9,11	0,20 $\pm$ 0,17	89,9
	100	7,9,11	0,08 $\pm$ 0,01	96,2
Solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán	50	7,9,11	1,47 $\pm$ 0,18	26,9
	100	7,9,11	0,28 $\pm$ 0,42	86,0
Formulación de CPT-11 (Ejemplo de preparación 7)	50	7,11,15	0,81 $\pm$ 0,47	59,6
	100	7,11,15	0,16 $\pm$ 0,12	92,3
Solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán	50	7,11,15	1,99 $\pm$ 0,47	1,0
	100	7,11,15	1,26 $\pm$ 0,49	37,4

(Ejemplo de ensayo 14) Efecto antitumoral debido a la administración de un fármaco una o dos veces

Fibrosarcoma de ratón (Meth A),  $2,5 \times 10^5$  células/ratón se trasplantaron por vía subcutánea en una región inguinal de un ratón (BALB/c, hembra, 7 semanas de vida, CLEA Japan, Inc.). La formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 7 o una solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán se inyectó en una vena caudal una o dos veces en total a los 7 y/u 11 días después del trasplante de tumores. Los ratones que no recibieron inyección alguna de cualquiera de los agentes se emplearon como grupo de control.

Los tumores también se extirparon a los 21 días de haberse producido el trasplante y se midió el peso de los tumores, para calcular de ese modo cada tasa de inhibición de la proliferación tumoral, T.I. (%) por la fórmula mostrada en el Ejemplo de ensayo 6. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

En el fibrosarcoma de ratón, las formulaciones de CPT-11 y las soluciones salinas fisiológicas de clorhidrato de irinotecán mostraron cada una un efecto significativo inhibitor de la proliferación tumoral en comparación con el grupo de control excepto una parte de las soluciones salinas fisiológicas de clorhidrato de irinotecán. Además, algunas de las formulaciones de CPT-11 exhibieron un efecto antitumoral mayor que el de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán. Además, ninguno de los dos tipos de agentes afectó al peso corporal del ratón.

[Tabla 15]

Tabla 15

	Dosis (mg/kg)	Tratamiento en días	Peso tumoral (g, media $\pm$ D.E.)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de control	-	-	3,53 $\pm$ 0,25	-
Formulación de CPT-11 (Ejemplo de preparación 7)	12,5	7	1,95 $\pm$ 0,29	44,7
	25	7	1,77 $\pm$ 0,61	49,8
	50	7	1,06 $\pm$ 0,38	70,1
Solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán	12,5	7	2,82 $\pm$ 0,51	20,2
	25	7	2,61 $\pm$ 0,40	26,0
	50	7	2,34 $\pm$ 0,17	33,7
Formulación de CPT-11 (Ejemplo de preparación 7)	25	11	1,70 $\pm$ 0,81	51,8
	50	11	1,41 $\pm$ 0,42	60,2
Solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán	25	11	2,40 $\pm$ 0,74	32,1
	50	11	1,98 $\pm$ 0,45	44,0
Formulación de CPT-11 (Ejemplo de preparación 7)	12,5	7,11	1,95 $\pm$ 0,19	44,8
	25	7,11	1,63 $\pm$ 0,39	54,0
	50	7,11	0,65 $\pm$ 0,13	81,6
Solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán	12,5	7,11	2,49 $\pm$ 0,29	29,4
	25	7,11	2,33 $\pm$ 0,62	34,1
	50	7,11	2,08 $\pm$ 0,43	41,2

[Ejemplo 12]

- 5 Se ensayó la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 8 como la formulación de CPT-11 altamente soportada de la presente invención.

(Ejemplo de ensayo 15) Efecto antitumoral

- 10 Se trasplantaron células cancerosas de pulmón humano (QG56) con 2 a 3 mm cuadrados por vía subcutánea en una región inguinal de un ratón (BALB/c desnudo, macho, 6 semanas de vida, CLEA Japan, Inc.) con una aguja para trasplante. La formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de preparación 8 o una solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán se inyectó tres veces en total en una vena caudal, que se produjo en un momento (día 1) en el cual se calculó aproximadamente un volumen estimado de un tumor por  $1/2 \cdot ab^2$  (a se refiere a un eje mayor de un tumor, b se refiere a un eje menor) en torno a  $1 \text{ mm}^3$ , 4 días adicionales (día 5), y 8 días adicionales (día 9), tras el trasplante de los tumores. Los ratones que no recibieron inyección alguna de cualquiera de los agentes se emplearon como grupo de control.

- 20 El volumen estimado de cada tumor y un peso corporal del ratón se calcularon 4, 8, 12, 16, y 21 días tras la primera inyección. Los tumores también se extirparon 21 días después de la primera inyección y se midió un peso de los tumores, para calcular de ese modo cada tasa de inhibición de la proliferación tumoral, T.I. (%) por la fórmula mostrada en el Ejemplo de ensayo 6. Los resultados se muestran en la Tabla 16, Fig. 28 y Fig. 29.

- 25 En el carcinoma pulmonar humano, la formulación de CPT-11 y la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán mostraron cada una un efecto inhibitorio significativo de la proliferación tumoral en comparación con el grupo control. Además, la formulación de CPT-11 exhibió un efecto antitumoral mayor que el de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán (Tabla 16, Fig. 28). Además, ninguno de los agentes afectó al peso corporal del ratón (Fig. 29).

- 30 [Tabla 16]

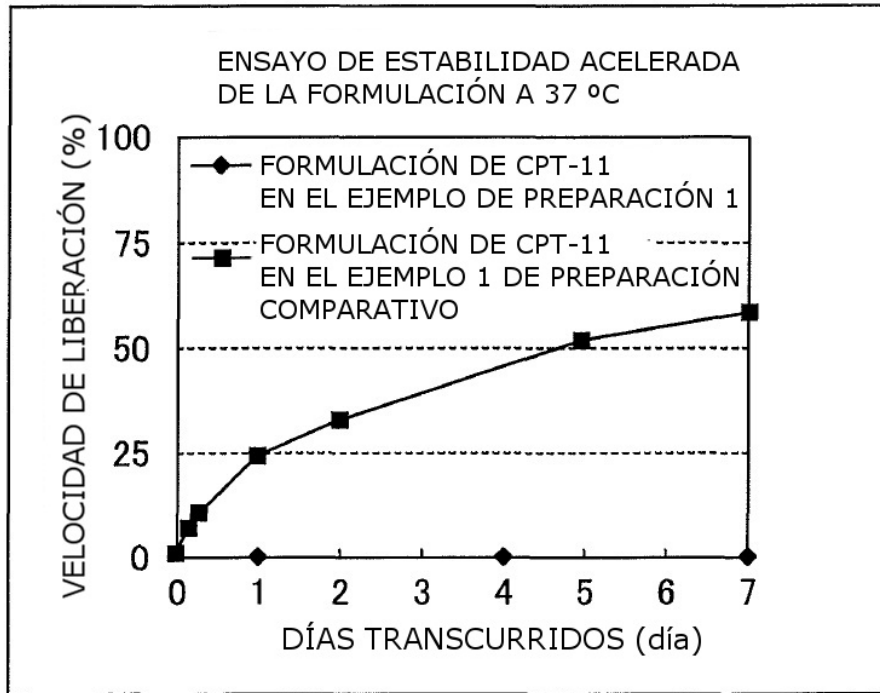
Tabla 16

	Dosis (mg/kg)	Peso tumoral (g, media $\pm$ D.E.)	Tasa de inhibición (%)
Grupo de control	-	2,91 $\pm$ 0,21	-
Formulación de CPT-11 (Ejemplo de preparación 8)	25	0,03 $\pm$ 0,02	99,0
	50	0,02 $\pm$ 0,00	99,3
	100	0,03 $\pm$ 0,02	99,2
Solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecán	25	1,88 $\pm$ 0,43	35,5
	50	1,49 $\pm$ 0,51	48,7
	100	0,95 $\pm$ 0,18	67,2

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una formulación de irinotecán que incluye un liposoma formado por una membrana de tipo bicapa lipídica que contiene un fosfolípido como componente de membrana principal, en la que irinotecán y/o una sal del mismo se encapsula en una concentración de al menos 0,1 mol/mol (mol de fármaco/mol de lípidos membranales totales), en la que solo la superficie externa del liposoma se modifica con un agente modificador de superficie que contiene un polímero hidrófilo.
- 10 2. La formulación de irinotecán según la reivindicación 1, en la que la formulación de irinotecán tiene un gradiente iónico entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del liposoma.
- 15 3. La formulación de irinotecán según la reivindicación 2, en la que el gradiente iónico es un gradiente de concentración de protones que tiene un gradiente de pH, en el que un valor de pH de la fase acuosa interna es inferior a un valor de pH de la fase acuosa externa.
- 20 4. La formulación de irinotecán según la reivindicación 3, en la que el gradiente de pH está formado por un gradiente de concentración de un ion amonio y/o un gradiente de concentración de un compuesto orgánico que tiene un grupo amino que puede protonarse.
- 25 5. La formulación de irinotecán según las reivindicaciones 1 a 4, en la que el liposoma contiene además un lípido diferente al fosfolípido y/o un agente modificador de superficie.
6. La formulación de irinotecán según la reivindicación 5, que comprende además un compuesto que tiene un grupo funcional básico como agente modificador de superficie.
7. Una composición farmacéutica, que comprende la formulación de irinotecán según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

**FIG. 1**



**FIG. 2**

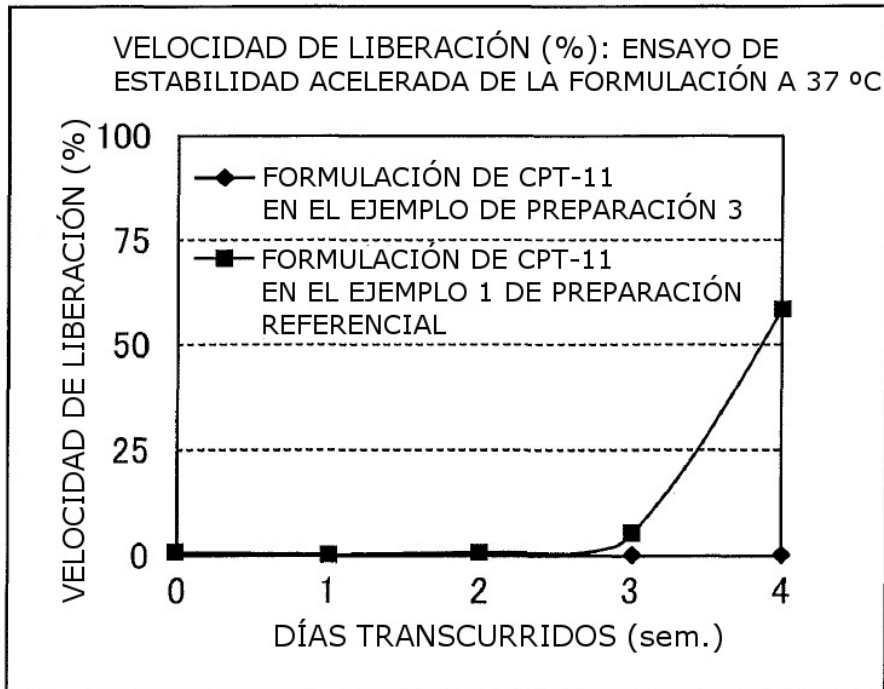


FIG. 3

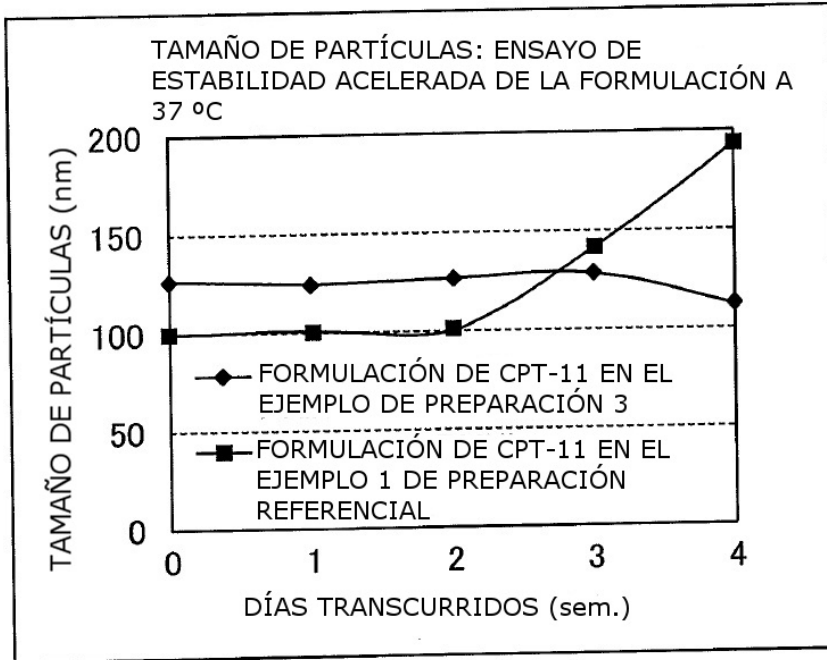


FIG. 4

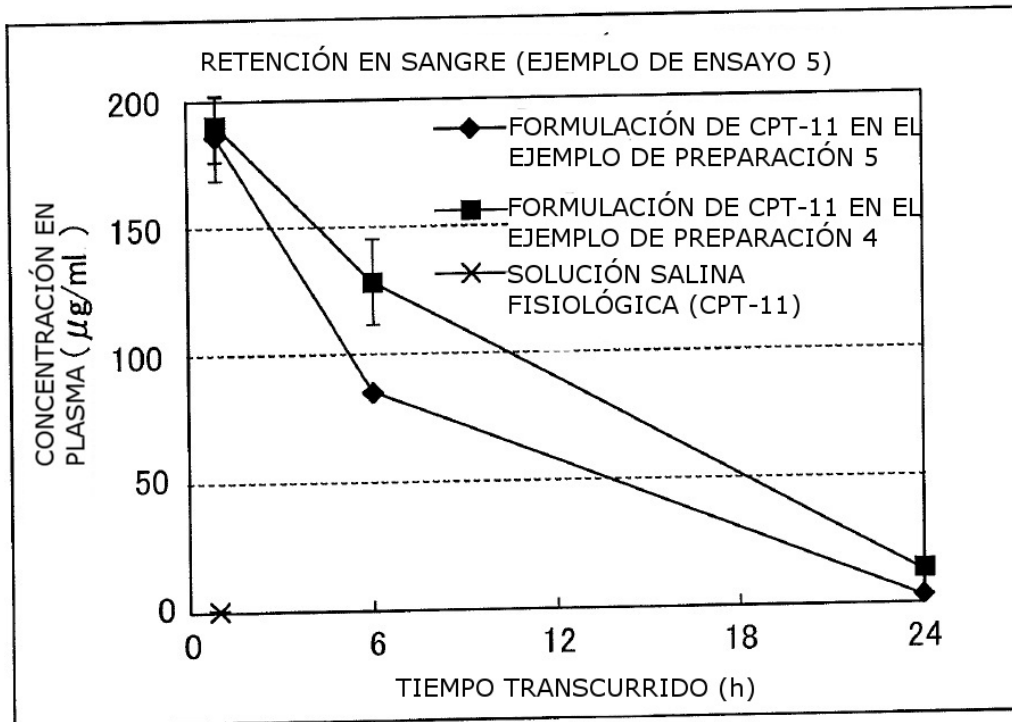


FIG. 5

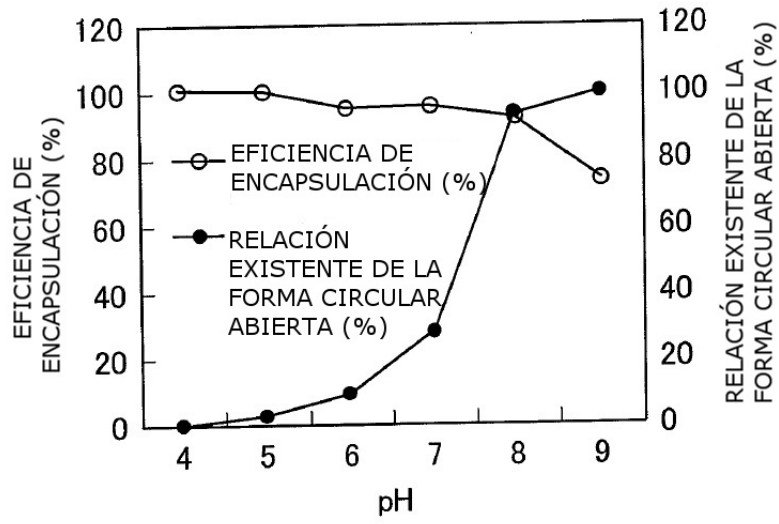




FIG. 6

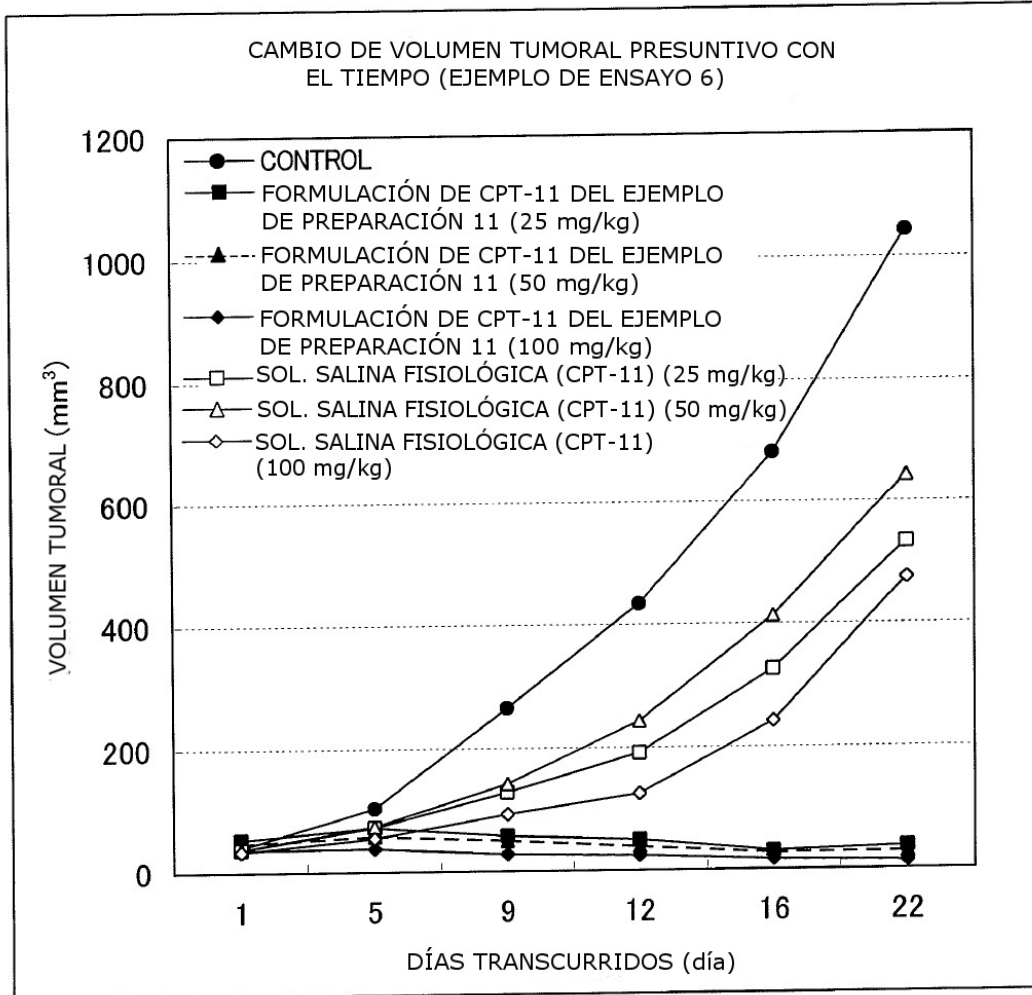
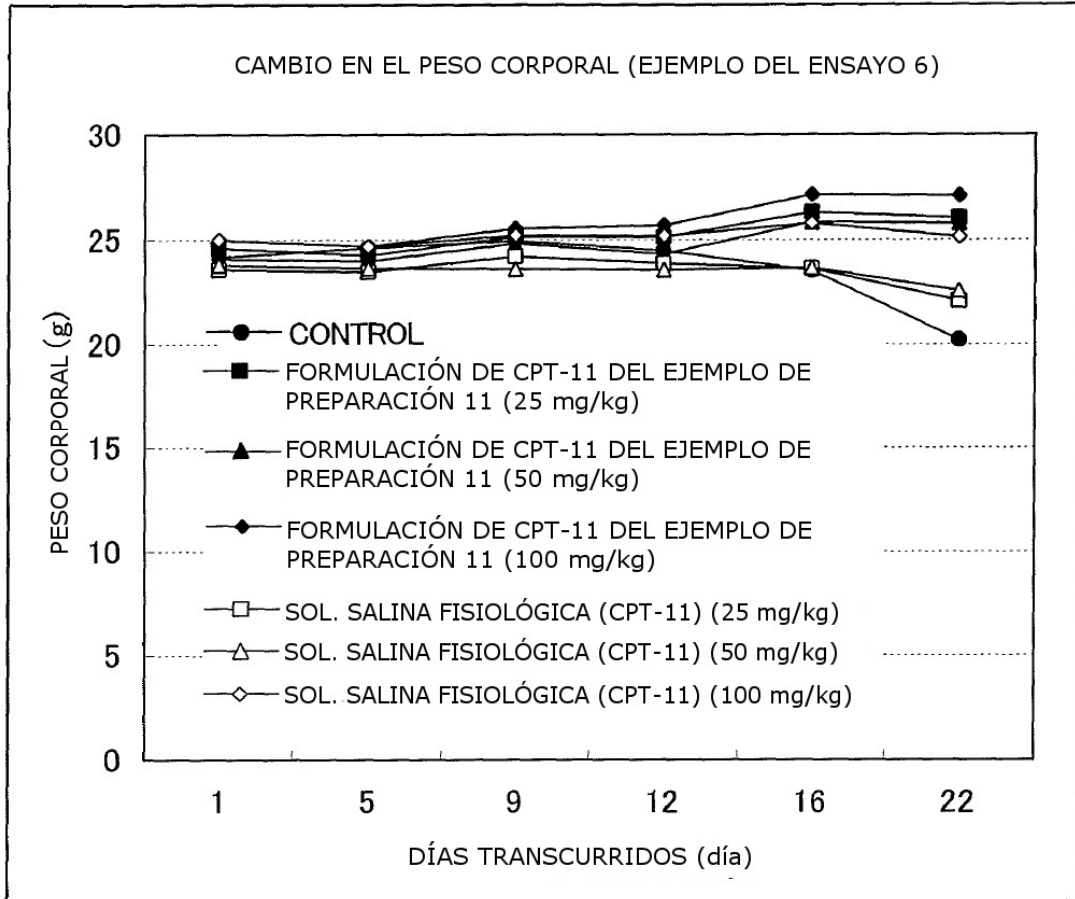
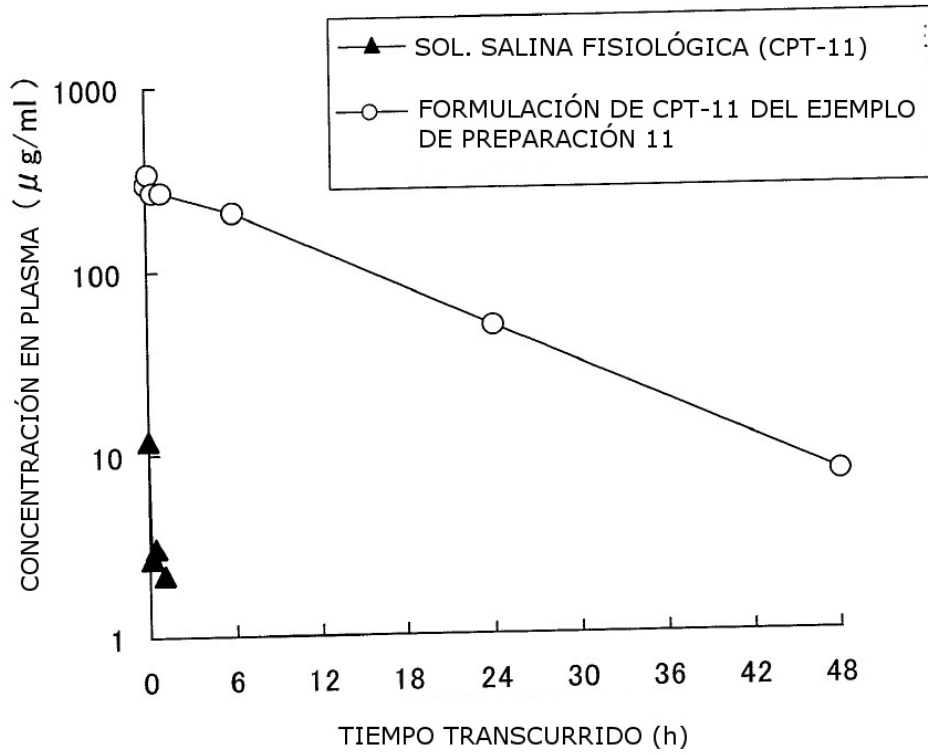


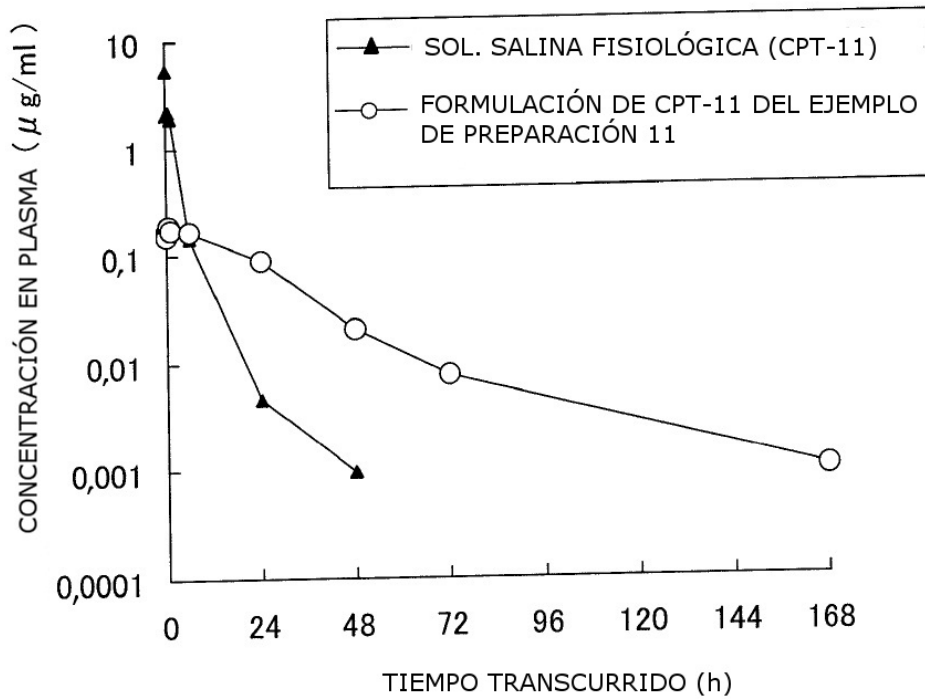
FIG. 7



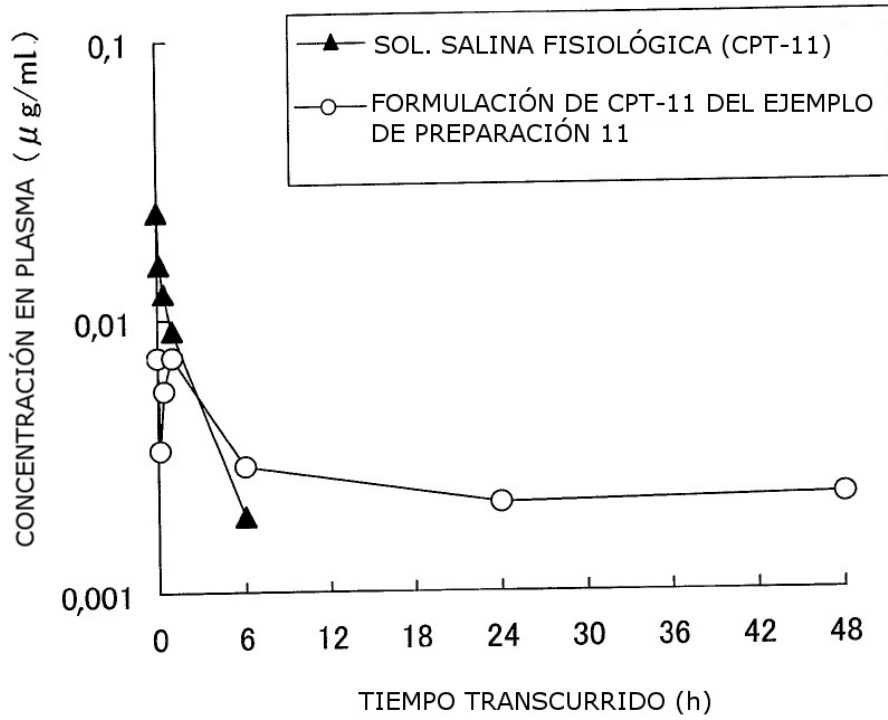
**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**

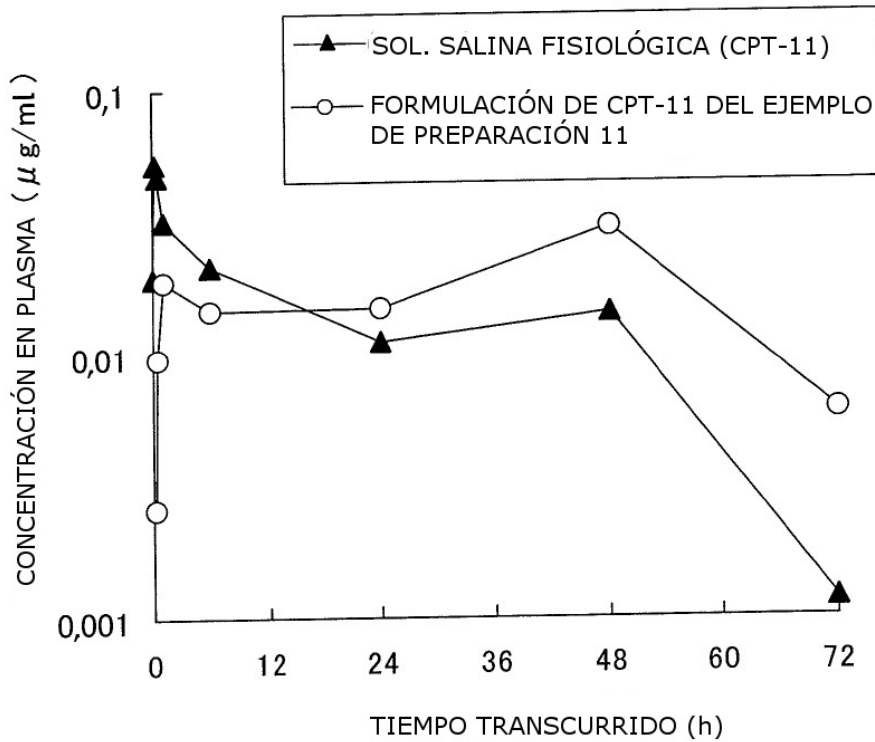


FIG. 12

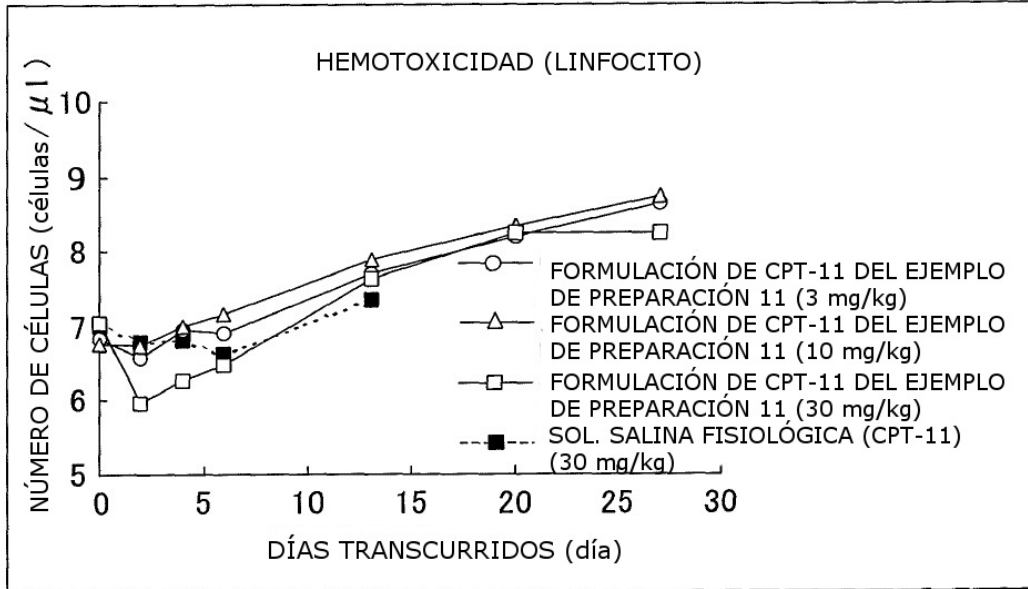


FIG. 13

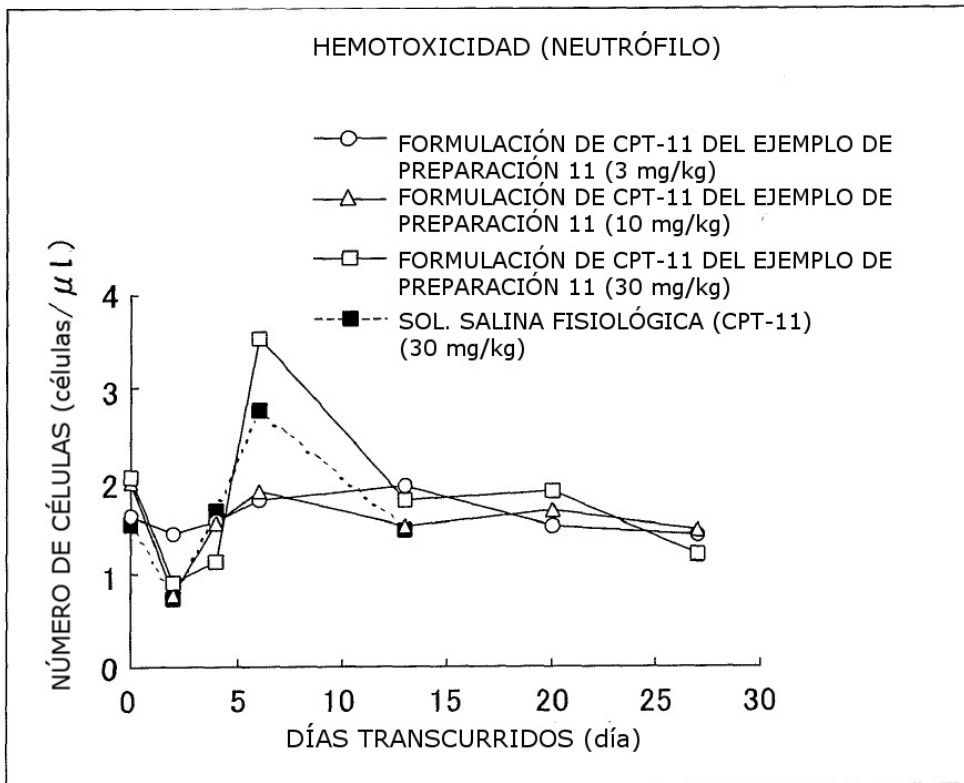


FIG. 14

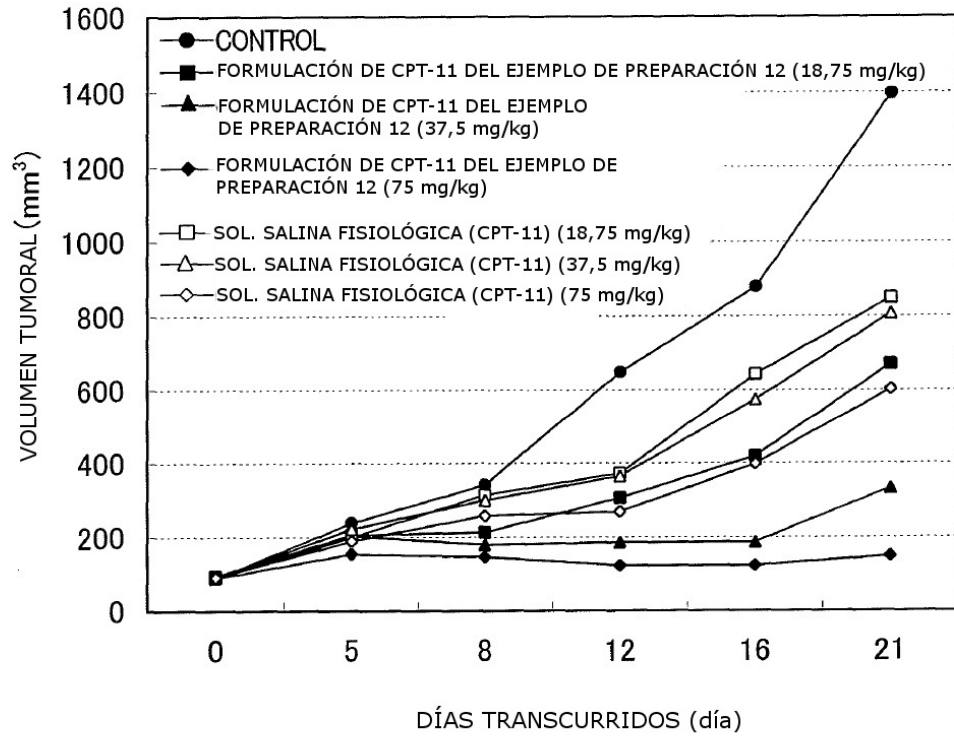


FIG. 15

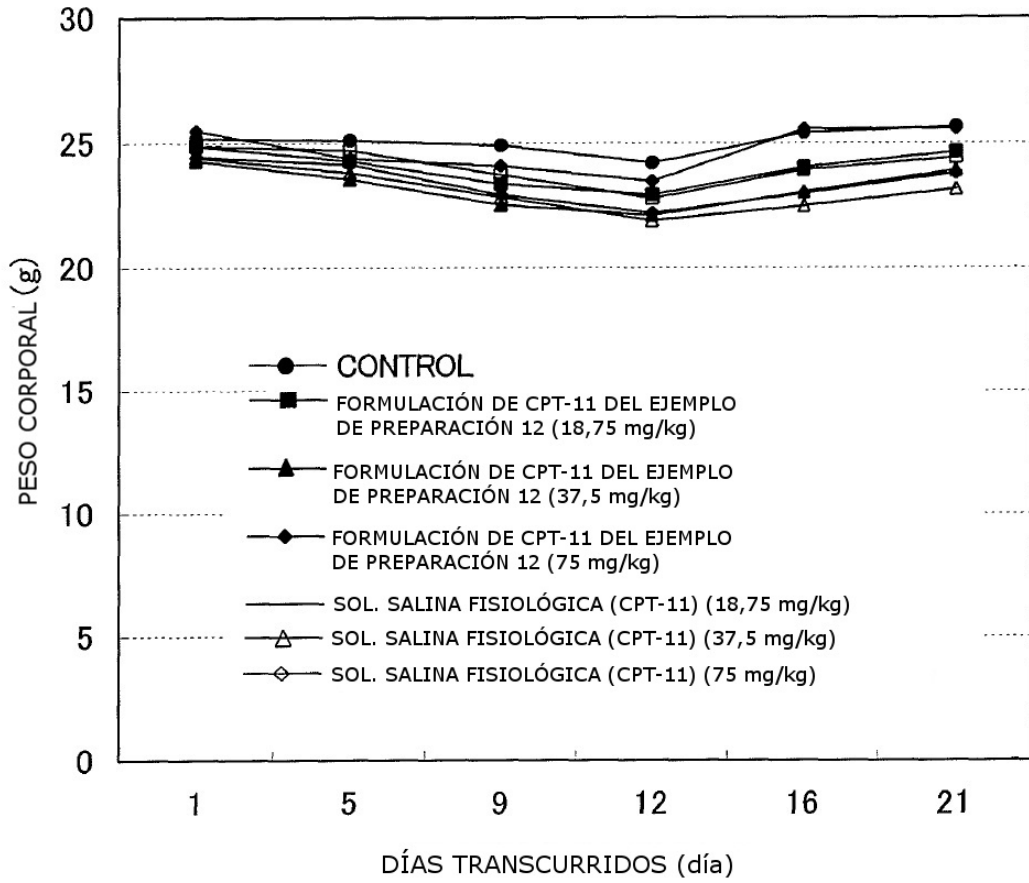


FIG. 16

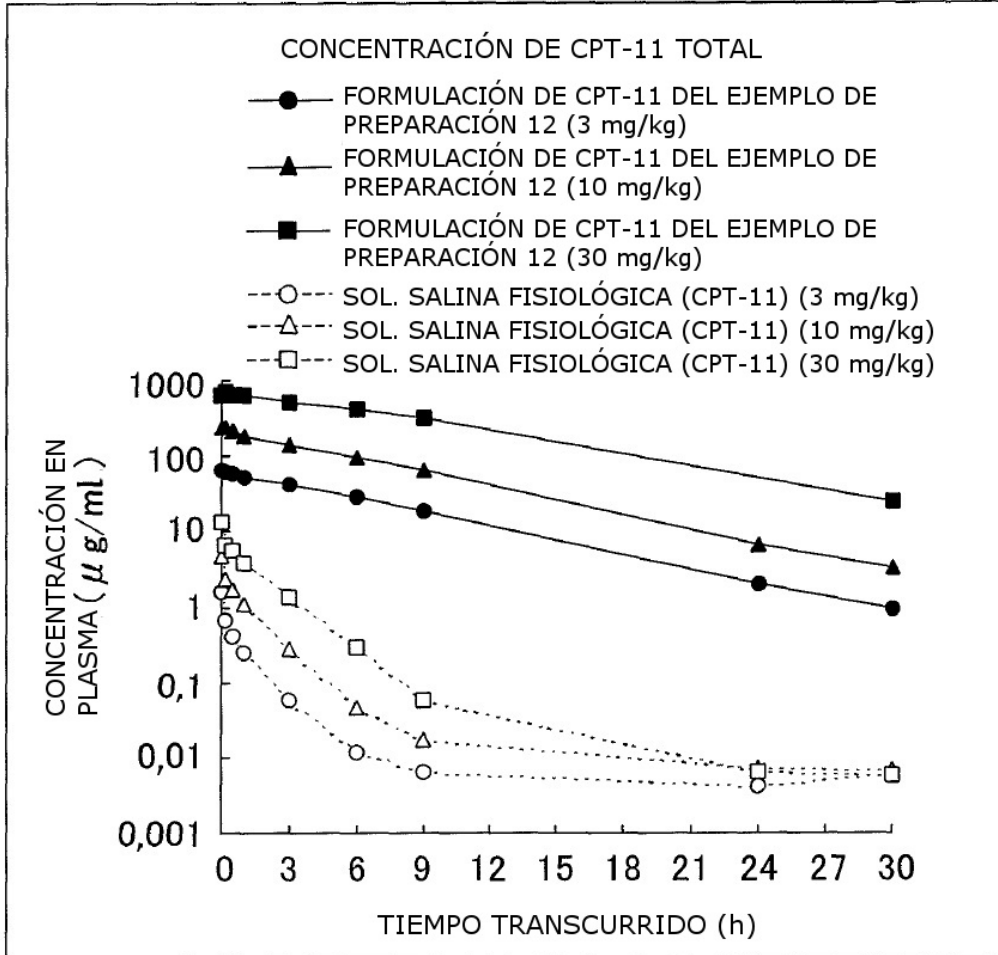




FIG. 17

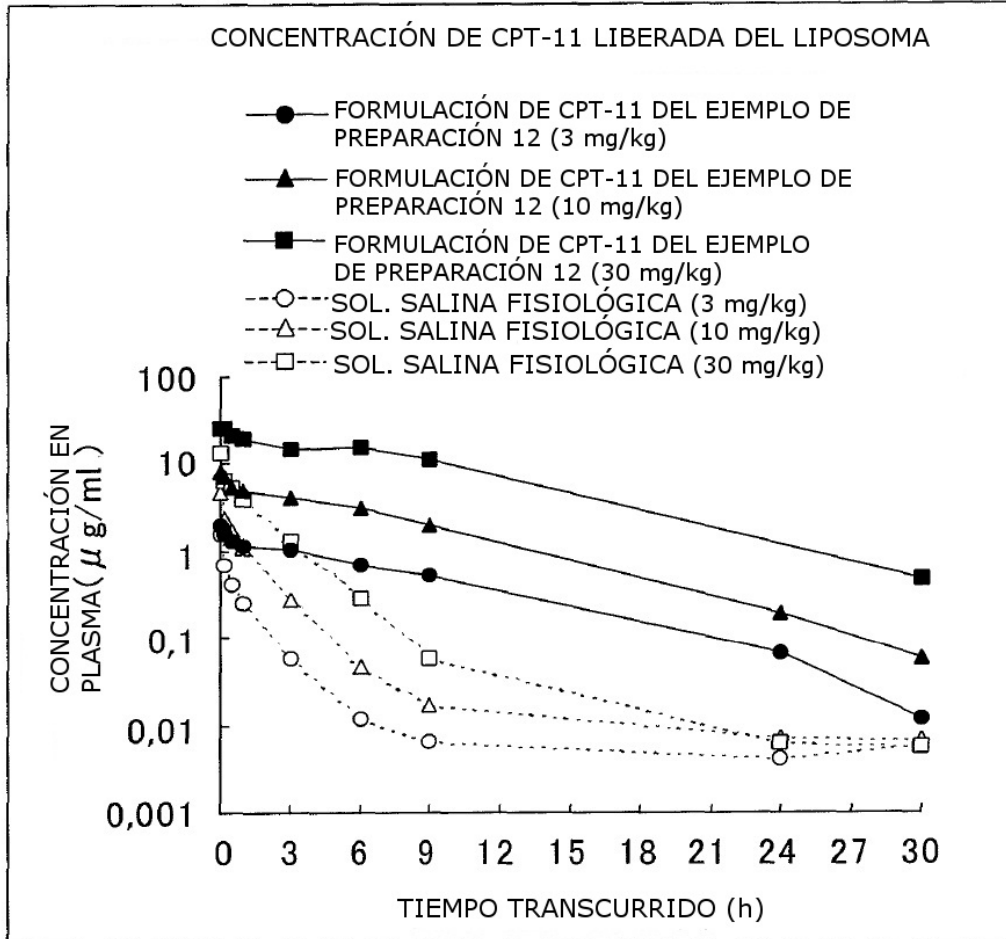


FIG. 18

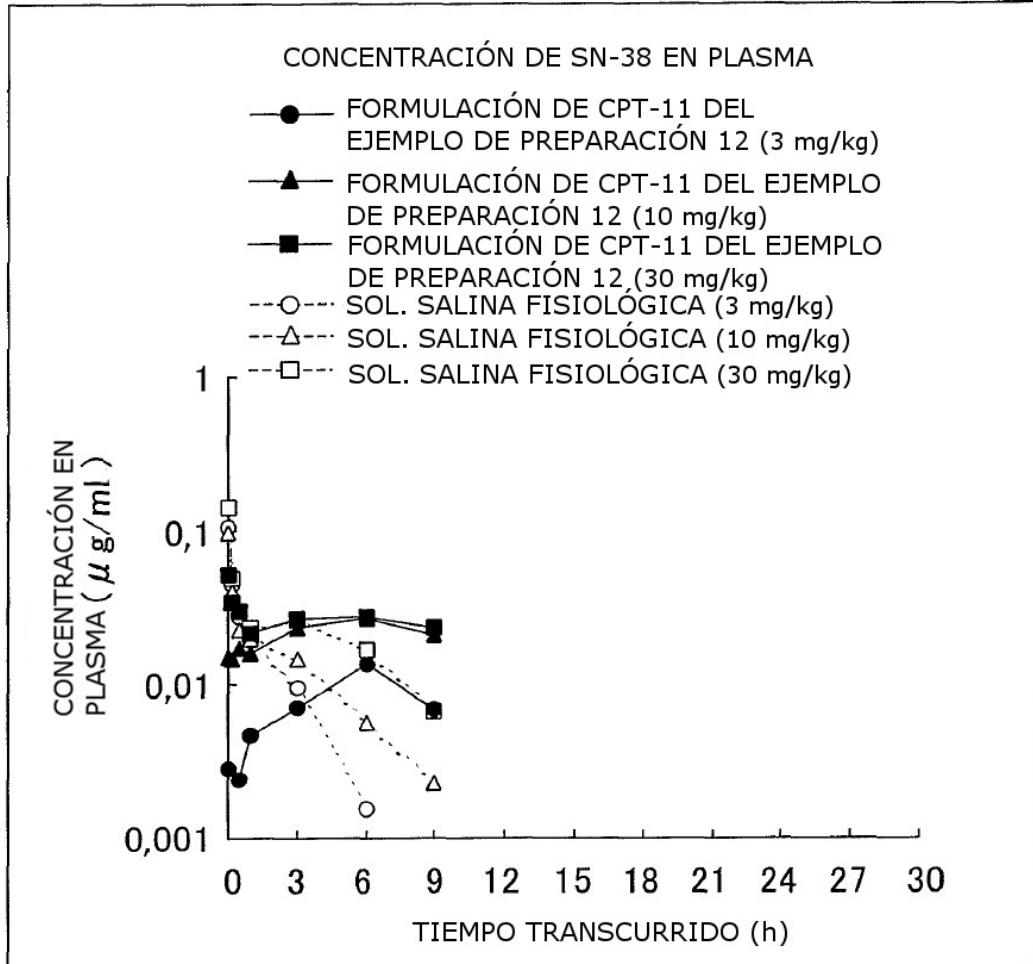


FIG. 19

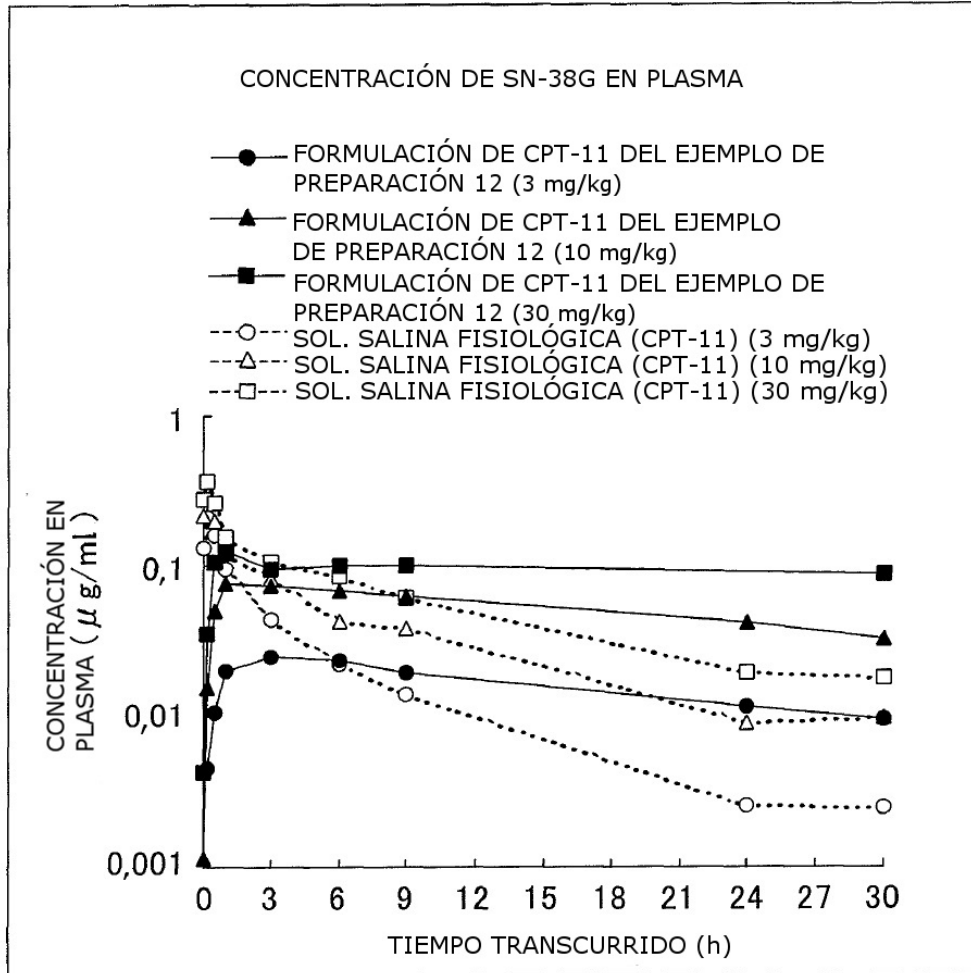


FIG. 20

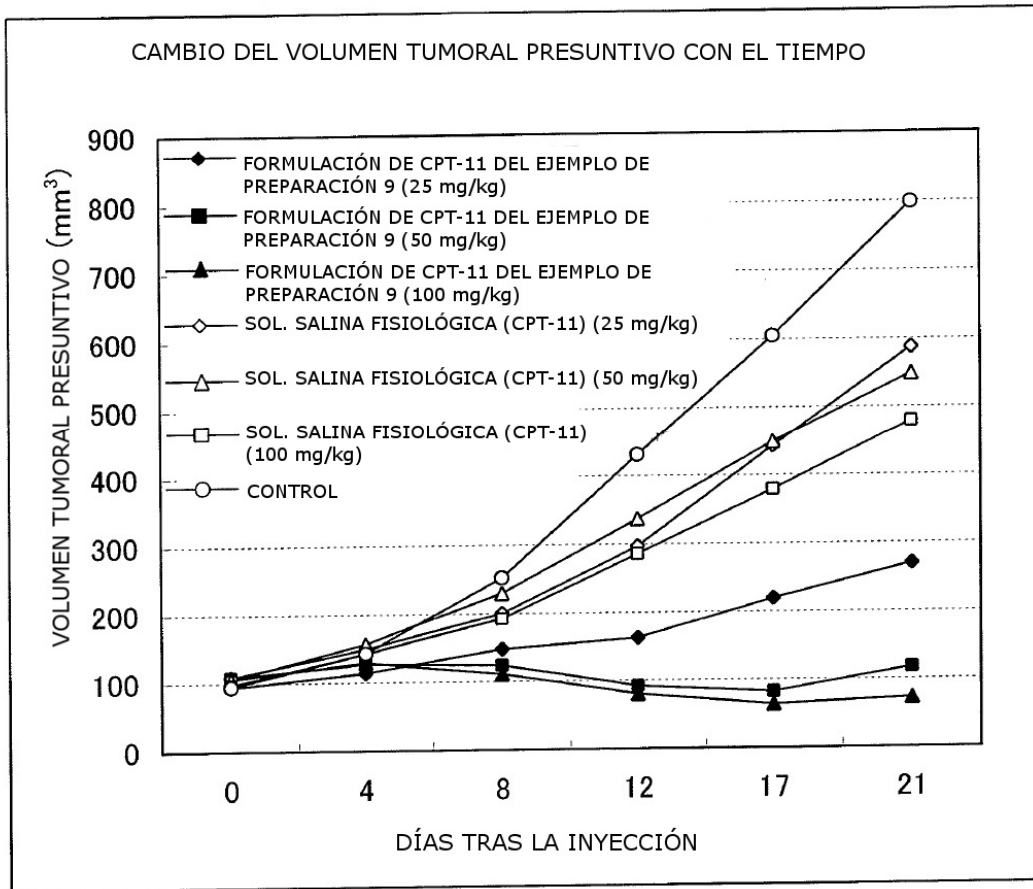


FIG. 21

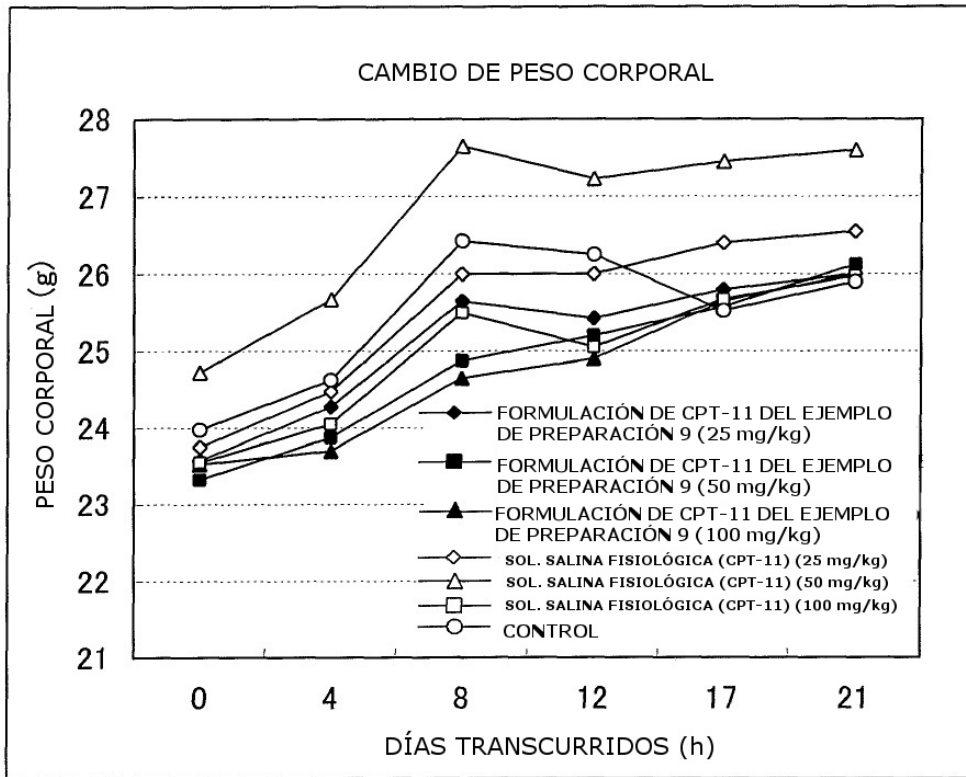


FIG. 22

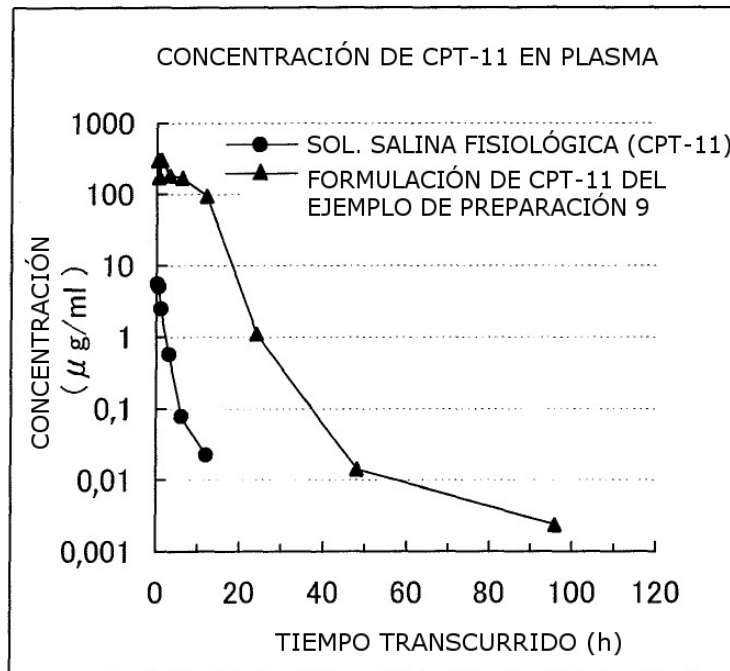


FIG. 23

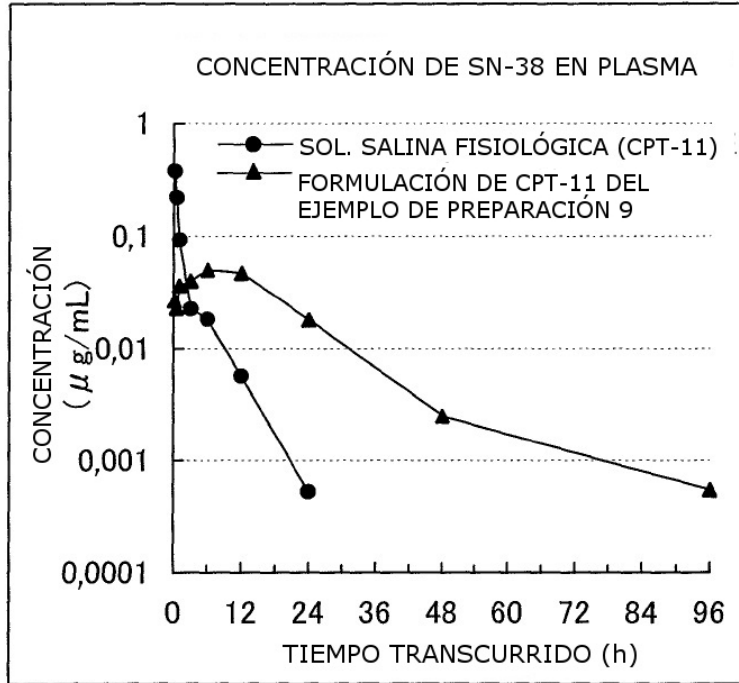


FIG. 24

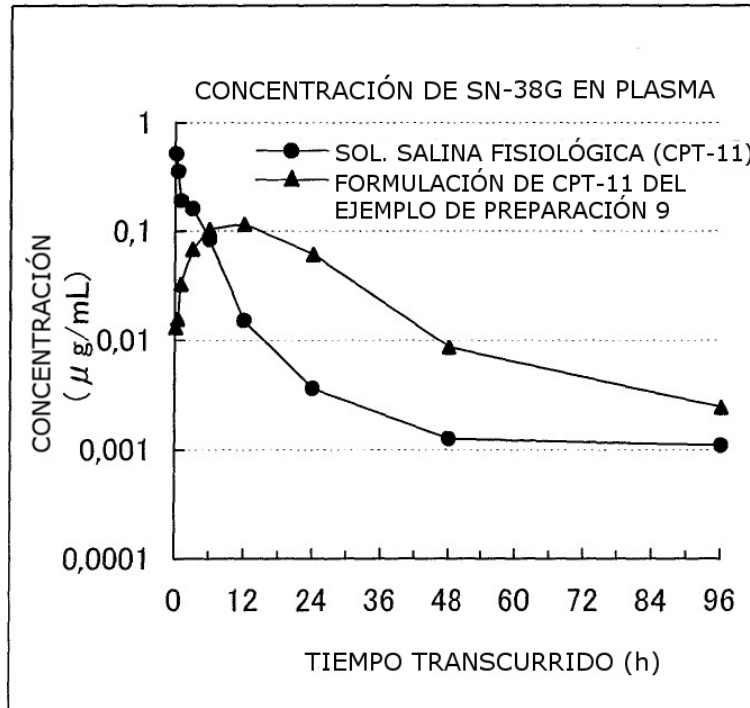


FIG. 25

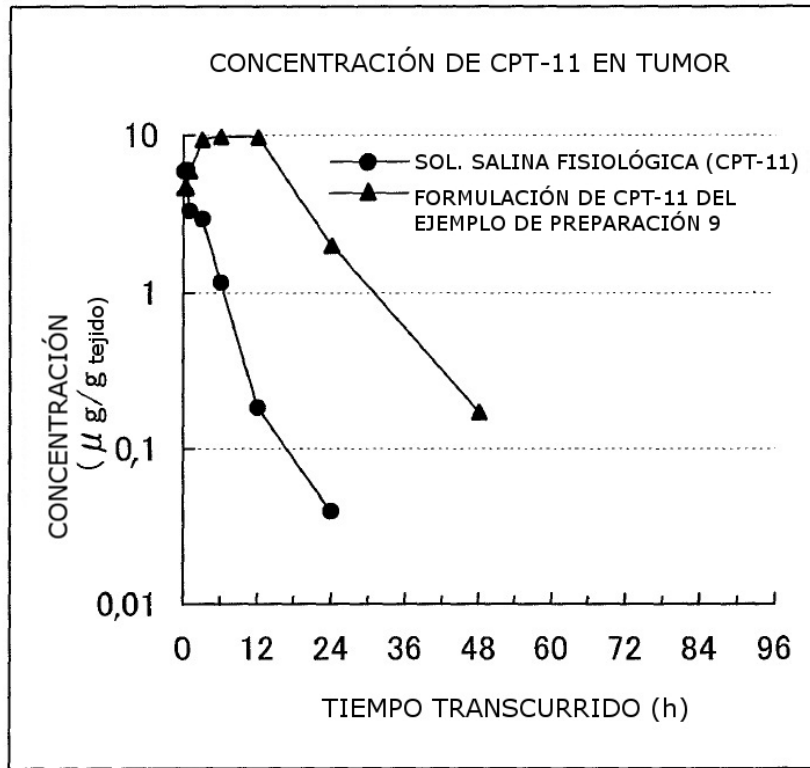


FIG. 26

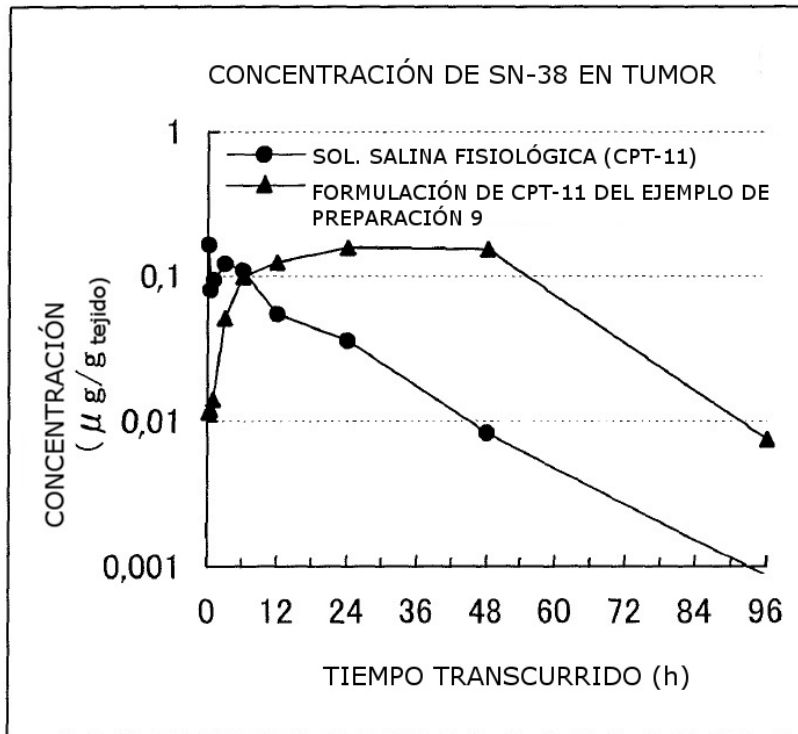


FIG. 27

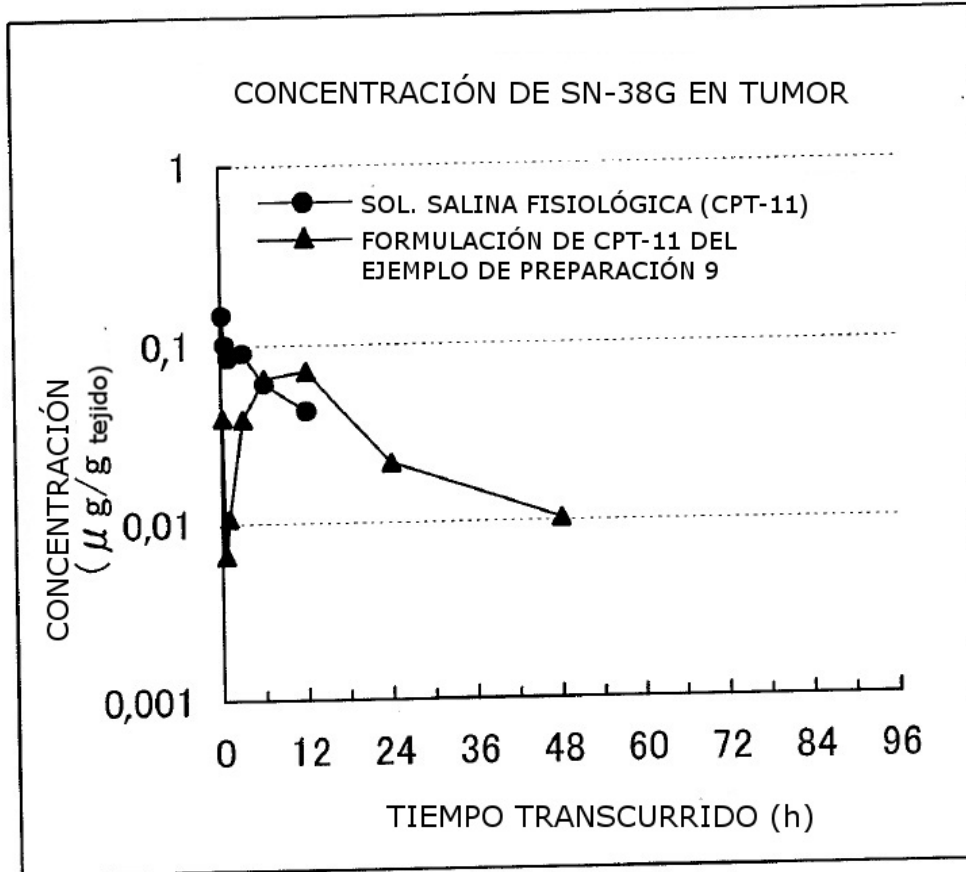




FIG. 28

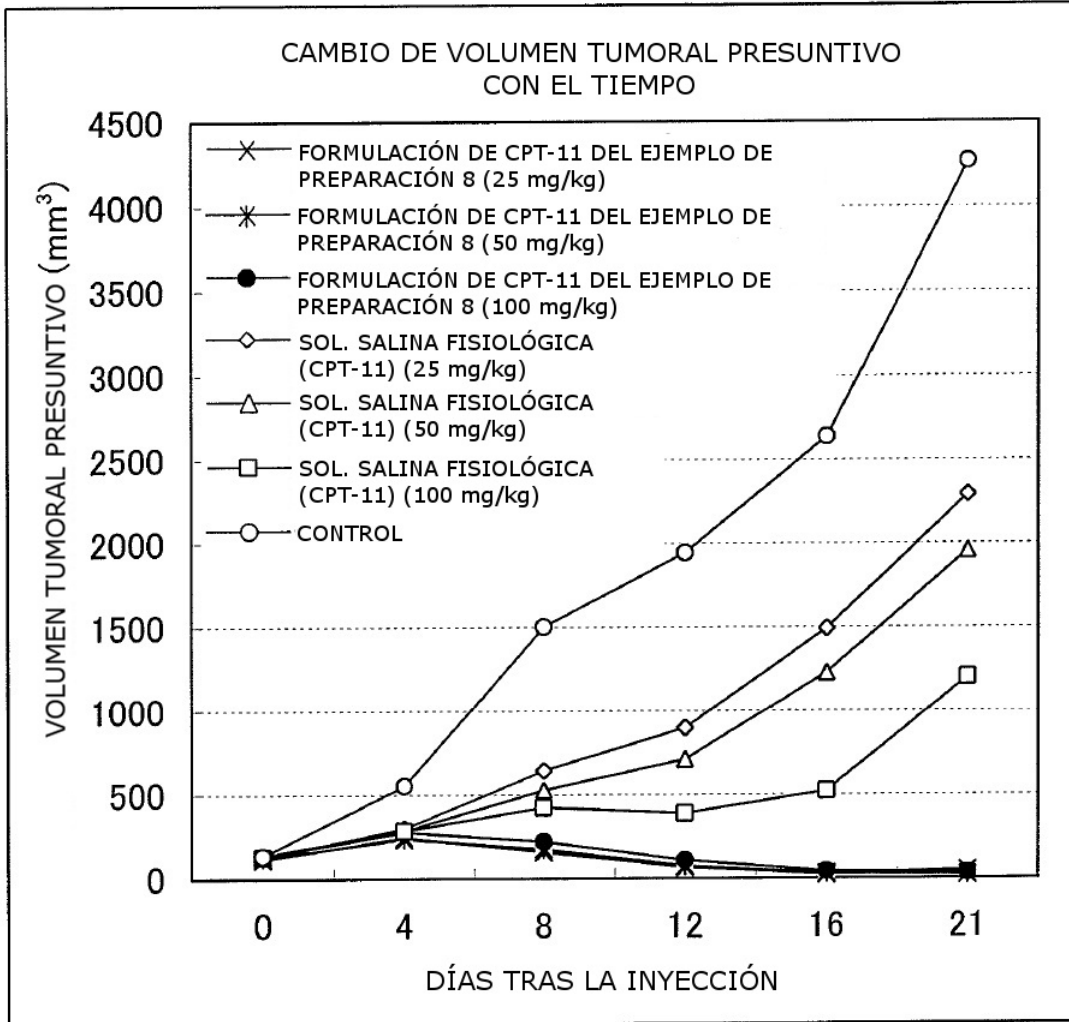


FIG. 29

