

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 063**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2008 PCT/CA2008/000563**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2008 WO08119160**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2008 E 08733666 (5)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2134353**

54 Título: **Composición de vesículas lipídicas bifásicas y método para tratar la displasia de cuello uterino por suministro intravaginal**

30 Prioridad:

30.03.2007 US 909324 P

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

15.06.2017

73 Titular/es:

**XISLE PHARMA VENTURES TRUST (100.0%)
 333 Waterfront Drive Road Town
 Tortola, VG**

72 Inventor/es:

**FOLDVARI, MARIANNA;
 KUMAR, PRAVEEN y
 DOCHERTY, JOHN M.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 617 063 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

Composición de vesículas lipídicas bifásicas y método para tratar la displasia de cuello uterino por suministro intravaginal

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición de vesículas lipídicas bifásicas y a un método para tratar la displasia de cuello uterino por suministro intravaginal.

10

Antecedentes de la invención

De los 55 millones de frotis de Pap estimados realizados cada año en los Estados Unidos, más del 5 % se presentan como anómalos (estudio de ALTS 2003). Se estima que, cada año, 800.000 mujeres presentan lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo (LIEB) (Jones, BA, Davey DD. Quality management in gynaecologic cytology using interlaboratory comparison. Arch Pathol Lab Med 2000; 124(5): 672-81).

15

Estas lesiones progresarán con el tiempo a NIC 2-3 o cáncer invasivo, especialmente en mujeres que presentan el subtipo de VPH de alto riesgo, o remitirán con el tiempo en ausencia de tratamiento. De las mujeres a las que se ha diagnosticado LIEB, el 25 % progresarán a neoplasia intraepitelial del cuello uterino (NIC) de grado 2 o 3, 22-32 % tendrá NIC 1 persistente y aproximadamente 50 %-70 % experimentarán regresión espontánea de LIEB en un periodo de 2 años (grupo ALTS 2003, Östör AG Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. Int. J. Gynecol Pathol 1993; 12: 186-92). Aproximadamente 75 % experimentarán regresión espontánea en un periodo de 5 años.

20

25

La definición de LIEB citológica del Sistema de Bethesda es diferente del sistema de clasificación de Múnich usado en Alemania y en toda la UE. LIEB corresponde a condiloma o NIC 1 en el Sistema de Bethesda. En la clasificación de Múnich estos hallazgos se representan en los grupos de Pap II W-III D. Sin embargo, debería observarse que en grupo III D también se incluyen pacientes con diagnóstico colposcópico de NIC 2 (displasia moderada).

30

En la actualidad, no hay ninguna terapia inmediata disponible para mujeres con VPH que presentan LIEB. Una vez que se ha detectado un frotis de Pap anómalo de grado bajo, el paciente y el especialista clínico tienen la elección de repetirlo una o más veces, o proceder a colposcopia. La colposcopia se acompaña con frecuencia de biopsia. Basándose en los hallazgos de colposcopia y biopsia, las opciones de tratamiento incluyen conización, crioterapia o tratamiento por láser. Las mujeres que han experimentado dichas opciones de tratamiento pueden tener un riesgo aumentado de aborto o parto prematuro.

35

Existen varias pruebas clínicas que se han publicado que describen interferones que son eficaces contra una diversidad de infecciones del cuello uterino por VPH. Los estudios sobre el uso de interferones para el tratamiento de neoplasia intraepitelial del cuello uterino presentan tasas de cura entre el 0 y el 100 %. Estas variaciones más probablemente reflejen diferencias en la dosificación, la duración del tratamiento, el modo de aplicación, el diseño del estudio, gravedad de la enfermedad y medidas de eficacia.

40

En un estudio abierto, Penna *et al.* (1994) (Penna C, Fallan MG, Gordigiani R *et al.*, Intralesional beta-interferon treatment of cervical intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus infection, Tumori 1994; 80: 146-150) presentaron 80 % de regresión lineal y 51 % de reversión de VPH de tipo 16/18 a normal después de aplicación intraperilesional diaria en el cuello uterino en mujeres con NIC asociada con infección por VPH de 3 MUI de IFN beta durante 3 semanas. De forma similar, en un estudio piloto abierto, Katesmark *et al.* (1999) (Katesmark M., Coulter Smith S., Reynolds K., Lawton F. A pilot study of the efficacy and tolerability of intralesional recombinant human beta interferons in cervical intraepithelial neoplasia. Ann Acad Singapore 1999; 28(6)775-7) mostraron un 73 % de tasa de respuesta completa de histología de NIC cuando se inyectó IFN en la zona de transformación.

45

50

Schneider *et al.* (1995) (Schneider A, Grubert T, Kirchmayr R, Wagner D, Papendick U, Schlunck G. Efficacy trial of topically administered Interferon gamma-1 b gel in comparison to laser treatment in cervical intraepithelial neoplasia. Arch Gynecol Obstet 1995; 256: 75-83) presentaron un 42 % de respuesta completa, 42 % de respuesta parcial después de terapia con gel de IFN-gamma 1b en mujeres con NIC. En este estudio, los pacientes con NIC II respondieron mejor en comparación con NIC III. También es de interés observar que los fumadores mostraron una tasa de curación significativamente menor en comparación con no fumadores.

55

Zarcone *et al.* (1995) (Zarcone R., Bellini P., Cardone G., Cardone A. Treatment of cervix condylomata with alpha-IFN leucocytar. Clin Exp Obst Gyn 1995; 22(4): 326-9) han presentado éxito en un estudio de 12 pacientes, pequeño, con terapia de IFN-alfa combinada intramuscular y tópica en el tratamiento de NIC I y II, en mujeres VPH+. La administración de dosis intramusculares de hasta 3 MUI diariamente de IFN durante 3 semanas, combinada con la aplicación intravaginal de una dosis no especificada de crema de IFN durante las últimas dos semanas de tratamiento, dio como resultado una respuesta completa en 7 pacientes, respuesta parcial en 4 pacientes, y ninguna respuesta en 1 paciente.

60

65

Syed *et al.* (1998) (Syed TA, Ahmadpour A. Ahmadpour A. Human leukocyte derived interferon-a in hydrophilic gel for the treatment of intravaginal warts in women: a placebo-controlled, double-blind study. *Intl J STD and AIDS* 1998; 9: 769-772) demostraron que una dosis diaria de 16 MUI de un gel hidrófilo de interferón alfa administrado por vía intravaginal durante 5 días consecutivos por semana durante un periodo de tratamiento de 4 semanas era significativamente más eficaz que el placebo en la curación de verrugas vaginales. Aunque estos estudios muestran que la terapia de interferón es eficaz en el tratamiento de infecciones por VPH asociadas con NIC como se mide por colposcopia confirmada por examen citológico e histológico de biopsias aleatorias, ninguno de estos estudios examina el estado del VPH después de la terapia.

El documento US6656499 desvela una composición para administración de un polipéptido de interferón que comprende vesículas lipídicas difásicas comprendidas por una bicapa lipídica que comprende un fosfolípido y un aminoácido acilado graso en una cantidad de 0,1-5 % (por ejemplo metionina que se enumera entre los aminoácidos alfa de origen natural preferidos), una emulsión de aceite en agua e interferón alfa (por ejemplo interferón alfa-2b) inmovilizado en las vesículas. Las vesículas lipídicas se prepararon con tres dosificaciones de interferón alfa: 5 MU, 15 MU y 40 MU. D1 se refiere a un método para tratar el virus del papiloma humano en un sujeto que comprende aplicar las vesículas en el sitio de la infección.

Basándose en diversas limitaciones en estos estudios, una terapia no invasiva que podría invertir la citología anómala durante los estadios tempranos del proceso de enfermedad y disminuir o erradicar la presencia de VPH proporcionaría un beneficio significativo al sistema sanitario y el bienestar físico y emocional de muchas mujeres jóvenes.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención incluye una composición de vesículas lipídicas bifásicas para tratar la displasia de cuello uterino mediante suministro intravaginal. La composición incluye una suspensión de vesículas de bicapas lipídicas que en su interior tienen, una emulsión de aceite en agua, interferón alfa 2b humano y metionina, teniendo la composición una actividad específica de interferón alfa 2b de entre aproximadamente 1 y 10 MUI (millones de unidades internacionales) por gramo de composición y entre 0,01 y 0,5 por ciento en peso de L-metionina.

La composición, que puede estar en forma de crema, contiene en realizaciones particulares, interferón alfa 2b a una actividad específica entre 1 y 3 MUI de interferón alfa 2b humano por gramo de composición y entre 0,01 y 0,5 por ciento en peso de L-metionina.

En otro aspecto, la invención incluye un método para tratar la displasia de cuello uterino en el sujeto administrando la composición anterior por vía intravaginal al sujeto, a una dosis de entre 1 y 20 MUI de interferón alfa 2b, y repitiendo la dosificación al menos 3 días/semana, durante un periodo de al menos 4 semanas.

Estos y otros objetos y características de la invención se apreciarán más completamente cuando se lea la siguiente descripción detallada de la invención junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 es una imagen escaneada de vesículas lipídicas multilamelares en la composición de la invención, preparadas usando un método de gel de proliposoma plástico anhidrido;

La FIGURA 2A es una imagen escaneada de liposomas multilamelares preparados usando un método de "gel de proliposoma plástico anhidrido" ("fusión").

La FIGURA 2B es una imagen escaneada de liposomas multilamelares con la misma composición que en 2A, pero preparados mediante un método de evaporación de disolvente.

La FIGURA 3 es una vista en sección esquemática de una VLM bifásica con un núcleo de emulsión acuosa central y

La FIGURA 4 es una parte ampliada de la VLM de la FIGURA 3.

Descripción detallada de la invención

I. Composición de liposomas bifásicos y método para su preparación

La invención se refiere a una composición de vesícula lipídica o de liposoma o de bicapa lipídica para su uso en el suministro de un interferón, por ejemplo, interferón alfa-2b mediante suministro transmucoso, por ejemplo mediante administración intravaginal, particularmente en el tratamiento de displasia de cuello uterino.

Un método preferido para preparar una vesícula lipídica multilamelar de la invención es el siguiente. Se mezclan un aceite y un potenciador de la consistencia. Por separado, se mezclan agua y un tensioactivo. También puede disolverse en el agua un agente antimicrobiano soluble en agua, por ejemplo metilparabeno o propilparabeno, un agente tamponante, tal como fosfatos, y un agente quelante, tal como EDTA. Estos se calientan suavemente, por ejemplo hasta aproximadamente 70 °C, y después se mezclan y homogeneizan con el aceite y el potenciador de la

consistencia. Esto da como resultado la formación de una emulsión con agua como la fase continua y el aceite y potenciador de la consistencia como la fase dispersa. Es deseable que las gotas de aceite tengan un diámetro inferior a aproximadamente 1 µm, especialmente inferior a aproximadamente 0,5 µm y, si fuera necesario, la emulsión puede someterse a corte adicional o a una sonicación para reducir el tamaño de las gotas.

5 Por separado, se prepara un gel de proliposoma anhidrido, mezclando fosfolípido, glicolípido y/o ceramida y un disolvente hidrófilo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, propilenglicol, y se calientan para formar una fusión. En la fusión también puede incorporarse un material para potenciar la fuerza de las bicapas lipídicas, por ejemplo, colesterol, un material para potenciar la penetración, por ejemplo, monolaurilisina y un material para transmitir una
10 carga a las bicapas lipídicas, por ejemplo, ácido esteárico. En la fusión puede incorporarse una cantidad pequeña de un antioxidante, por ejemplo, ascorbil palmitato, hidroxitolueno butilado o hidroxianisol butilado. La emulsión acuosa se añade a la fusión y los diversos componentes se someten a agitación lo que produce la formación de las vesículas lipídicas multilamelares deseadas, que en el compartimento de núcleo central tienen una emulsión acuosa que contiene el aceite y el potenciador de la consistencia como la fase dispersa.

15 En la fase acuosa de la emulsión, como se analiza posteriormente, puede incorporarse en solución, un material biológicamente activo, soluble en agua y, en particular, interferón alfa 2b humano. El interferón alfa-2b se incorpora en la fase acuosa para formar una composición final que tiene una actividad específica de entre 1 y 10 MUI por gramo de composición. La composición también se formula para que contenga entre 0,01 y 0,5 por ciento en peso de L-metionina, por ejemplo, 0,01-0,2 por ciento en peso de L-metionina, y este componente también puede
20 incorporarse en la fase acuosa a una concentración eficaz para proporcionar la concentración deseada en la composición final y un agente quelante, tal como EDTA o un antioxidante tal como L-metionina y/o un estabilizante de proteínas tal como glicina.

25 A. Formación de un gel de proliposoma plástico anhidrido

Se fusionan un componente formador de liposoma y otros excipientes necesarios con un disolvente hidrófilo farmacéuticamente aceptable, tal como propilenglicol.

30 La expresión "componente formador de liposomas" designa la sustancia o las sustancias usadas como componente principal de las bicapas lipídicas. Los componentes formadores de liposomas típicos incluyen glucolípidos, lecitinas, fosfolípidos, ceramidas o mezclas de los mismos que se usan como un ingrediente primario en la formación de la bicapa lipídica. Sin embargo, otros compuestos naturales y sintéticos que tienen el carácter anfipático requerido pueden incorporarse con el fosfolípido, el glucolípido o la ceramida, reemplazando algunos de estos materiales
35 caros, siempre que el carácter esencial de las bicapas lipídicas no se vea afectado de forma adversa. La elección de los materiales apropiados está dentro del conocimiento de los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, cardiolipina, ácido fosfatídico y los cerebrósidos, lípidos de éter y fitanoles.

40 Las formulaciones liposómicas de la presente invención preferentemente contienen fosfolípidos saturados y/o insaturados, más preferentemente fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, glucolípidos y ceramidas. Los fosfolípidos están preferentemente en combinación con un agente potenciador de la penetración tal como monolaurilisina, dipalmitoilisina o metil salicilato para conseguir potencial de suministro predominantemente transdérmico.

45 Una "sustancia grasa" puede usarse para potenciar la fuerza de las bicapas lipídicas. Los ejemplos de sustancias grasas útiles incluyen esteroides tales como colesterol, coprostanol, colestanol y colestano y ácidos grasos de cadena larga (C₁₆ a C₂₂), especialmente saturados tales como ácido esteárico. Además de potenciar la fuerza de la bicapa lipídica, los ácidos transmiten una carga negativa. Pueden usarse ácidos saturados o insaturados. Otras
50 sustancias grasas que pueden usarse incluyen aminas grasas C₁₆ a C₂₂, proteínas aciladas grasas, péptidos acilados grasos, PEG acilado graso y derivados. Estas sustancias grasas se incorporan con los componentes formadores de liposomas anteriormente mencionados y mejoran la estabilidad física y apariencia del producto.

55 El disolvente hidrófilo se usa como un plastificante del componente formador de liposomas y un adyuvante para preparar una fusión uniforme. Los ejemplos de disolventes hidrófilos incluyen pero sin restricción propilenglicol, glicerol, polietilenglicol que tiene un peso molecular que varía entre 300 y 8000, etanol y mezclas de los mismos. La fusión resultante puede describirse como un gel de proliposoma plástico anhidrido. Este gel de proliposoma plástico anhidrido contiene todos los ingredientes de fase lipídica y puede prepararse y almacenarse previamente en grandes cantidades. Es un material semisólido con una consistencia homogénea.

60 B. Formación de las vesículas lipídicas multilamelares

65 Se preparan ingredientes hidrófilos tales como potenciadores de la penetración, conservantes y similares, por separado como una solución acuosa, que forma la fase continua de una emulsión. Esto se añade a la fusión de fase lipídica, previamente calentada hasta la temperatura de fusión apropiada que puede variar de 40 °C a 80 °C, y se mezcla vigorosamente por cualquier técnica dada que permita la consecución del tamaño del producto deseado. Los

ejemplos de técnicas de mezclado incluyen agitación vorticial o mezclado con propulsor. En este estadio, también es posible incorporar (disolver) agentes biológicamente activos sólidos que quedarán inmovilizados dentro de las bicapas lipídicas.

5 Este procedimiento es adecuado para la preparación de diversas cantidades de producto liposómico tópico. Si se
usa mezclado por agitación vorticial como la agitación, pueden prepararse hasta aproximadamente 20 g del
producto. Si se usa un mezclador por propulsor a escala de laboratorio, pueden prepararse hasta aproximadamente
10 2 kg a 10 kg del producto. Este procedimiento de formulación puede adaptarse también para fabricación a gran
escala. Por lo tanto, la técnica de mezclado por propulsor puede aumentarse de escala directamente aumentando
geométricamente el tamaño del recipiente y el diámetro del mezclador por propulsor. Sin embargo, a medida que
aumenta el tamaño del recipiente, la instalación preferida sería un mezclador de combinación, es decir, un
mezclador de alta intensidad con mezclador por propulsor y un agitador de superficie raspada. La fase acuosa
puede bombearse del tanque A al tanque B que contiene el gel de proliposoma plástico anhídrido o la fase acuosa
puede mezclarse con la emulsión antes de añadir al tanque B a la temperatura requerida y mezclar. Este
15 procedimiento es adecuado para la producción de cualquier producto liposómico tópico a una gran escala.

Pueden prepararse composiciones liposómicas con las vesículas lipídicas multilamelares de la presente invención
usando aditivos farmacéuticos apropiados. Por ejemplo, puede requerirse añadir agentes que aumenten la
viscosidad a la preparación liposómica final. La adición de otros compuestos farmacéuticamente aceptables está
dentro del ámbito del experto en la materia.
20

C. Características del producto de vesículas lipídicas multilamelares final

Se muestra en la FIGURA 3 una representación esquemática de una vesícula lipídica multilamelar preparada de
acuerdo con el proceso descrito anteriormente. La vesícula lipídica multilamelar, generalmente designada por el
número de referencia 2, está hecha de una serie de bicapas lipídicas separadas 4, 6 y 8 que definen una serie de
compartimentos de solución acuosa periféricos 3 y 5. La bicapa lipídica más pequeña 7 define en su centro un
compartimento de núcleo central 9. Aunque solamente se muestran 6 bicapas lipídicas, debería apreciarse que la
figura está simplificada y es esquemática y de hecho están presentes muchas más de 6 bicapas lipídicas.
25
30

La FIGURA 4 es una ampliación de la vesícula de la FIGURA 3 que muestra en más detalle el compartimento de
núcleo central y partes de algunas de las bicapas lipídicas. El compartimento de núcleo central 9 está ocupado por
una emulsión acuosa compuesta de agua 10 como fase continua y gotas lipófilas o partículas sólidas finas 11 como
fase dispersa. Las gotas lipófilas o partículas sólidas finas están rodeadas de una capa de moléculas tensioactivas
12, las partes hidrófilas 13 de cada molécula tensioactiva que se extienden a la fase acuosa y las partes hidrófobas
que están en la superficie de las gotas oleosas.
35

Alrededor del compartimento de núcleo está la bicapa lipídica más interna 15. La bicapa lipídica está compuesta de
dos capas de moléculas lipídicas 16. Cada molécula lipídica 16 en una capa está orientada sustancialmente de
forma paralela a bicapas lipídicas adyacentes, y dos capas que forman una bicapa tienen los extremos polares 17 de
sus moléculas expuestos a la fase acuosa y los extremos no polares 18 adyacentes entre sí. Entre la bicapa lipídica
más interna 15 y la siguiente bicapa lipídica más interna 19 hay un compartimento periférico 20 que está lleno de
agua o de la emulsión acuosa. Como se muestra, pueden estar presentes partículas o gotas lipófilas rodeadas de
tensioactivo 11 en el compartimento periférico 20.
40
45

Rodeando el compartimento periférico 20 está la siguiente bicapa lipídica más interna 19, que a su vez está rodeada
por un compartimento periférico adicional y una bicapa lipídica adicional.

Se apreciará que estará presente principio biológicamente activo, por ejemplo, interferón alfa-2b, y el componente de
L-metionina en el agua de la emulsión acuosa en el compartimento del núcleo central 9 y en los compartimentos
periféricos 20. Pueden estar presentes principios biológicamente activos que son lipófilos, tales como potenciadores
de la consistencia o potenciadores de la captación, en la fase dispersa de la emulsión en el compartimento central 9
y en los compartimentos periféricos 20. También pueden estar presentes en el interior de las bicapas lipídicas como
se muestra en 21. El principio biológicamente activo puede constituir las gotas lipófilas 21, o el principio
biológicamente activo puede disolverse en un disolvente lipófilo que forma gotas 21. Por lo tanto la invención permite
la aplicación tópica de principios biológicamente activos que son solubles en agua o insolubles en agua.
50
55

La composición se forma preferentemente en condiciones en las que al menos aproximadamente el 30 por ciento en
peso, y preferentemente entre aproximadamente 40 y 70 por ciento en peso de estos componentes acuosos está
presente en forma inmovilizada en liposomas, a diferencia de portarse en la fase a granel extraventricular de la
composición. Estos niveles de inmovilización pueden conseguirse por diversas estrategias conocidas, por ejemplo,
formando los liposomas por un método de evaporación de fase inversa y/o encapsulando el material de fase acuosa
a una alta concentración de lípidos formadores de liposomas, minimizando de este modo la cantidad de fase acuosa
a granel.
60
65

La FIGURA 1 es una imagen escaneada, ampliada 440X de vesículas preparadas para su uso como una loción tópica. Este producto presentó la consistencia de una loción o crema semisólida. La inspección de la imagen escaneada revela estructuras multilamelares con distribución de tamaño uniforme. Estas han presentado estabilidad física durante periodos de tiempo prolongados de más de un año.

Para demostrar la diferencia en las propiedades observadas en la población de liposomas producida de acuerdo con el método preferido de la presente invención, se realizaron ensayos comparativos entre dos composiciones de liposomas preparadas a partir de los mismos ingredientes pero usando en un caso el método de evaporación de disolvente y en el otro caso el método de gel de proliposoma plástico anhídrido preferido. La FIGURA 2A es una imagen escaneada de la población de liposomas preparada usando el método de gel de proliposoma anhídrido ("fusión") y la FIGURA 2B es una imagen escaneada de la población de liposomas preparada usando el método de evaporación de disolvente. Como puede verse, la población de liposomas obtenida usando el método de gel de proliposoma plástico anhídrido tiene una distribución de tamaños de liposomas que es sustancialmente más uniforme que la obtenida usando el método de evaporación de disolvente. Además, se forman cantidades mínimas de liposomas agregados o fusionados cuando se usa el método de gel de proliposoma plástico anhídrido, mientras que pueden observarse agregados mayores en la población de liposomas obtenidos usando el método de evaporación de disolvente.

En algunas realizaciones de la invención, la sustancia lipófila es un potenciador de la consistencia lipófila semisólido/sólido u oleoso que puede encapsularse en liposomas. Como potenciadores de la consistencia lipófilos semisólidos o sólidos se mencionan alcoholes grasos, ceras, ésteres de ácidos grasos de alcoholes grasos, ésteres de glicéridos, vaselina blanca y mezclas de los mismos. Son ejemplos de aceites que se han encapsulado con éxito en liposomas tetracaprilato/caprato de pentaeritritol, tetraisostearato de pentaeritritol, octanoato de cetearilo y aceite de colza, aceite de jojoba, aceite de cacahuete, aceite de salvado de arroz, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de nuez, aceite de aguacate, bálsamo de Perú, aceite de clavo y eugenol. También se han incorporado con éxito extractos vegetales basados en aceite en liposomas. Los ingredientes potenciadores de la consistencia lipófilos sólidos/semisólidos pueden seleccionarse de ceras, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, estearato de glicerilo, vaselina o combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de potenciadores de la consistencia preferidos incluyen cera de abejas, tribehenato de glicerilo, estearato de glicerilo, heptanoato de estearilo, palmitato de estearilo, alcohol cetílico, alcohol estearílico, miristato de miristilo, erucato de behenilo y palmitato de cetilo.

La viscosidad de una composición de vesículas de acuerdo con la invención y que contiene un potenciador de la consistencia es mayor que la viscosidad de vesículas correspondientes que no incluyen un potenciador de la consistencia pero son en lo demás idénticos. Variando la cantidad de potenciador de la consistencia es posible conseguir prácticamente cualquier viscosidad requerida, desde un líquido relativamente móvil, a una "loción", a "cremosa" o "crema espesa". La determinación de cantidades de potenciador de consistencia para conseguir una viscosidad particular de la composición puede determinarse por experimentos rutinarios.

El tensioactivo usado para recubrir la gota oleosa o los ingredientes potenciadores de la consistencia lipófilos sólidos/semisólidos es importante para la encapsulación exitosa de un núcleo lipófilo en vesículas lipídicas multilamelares. Se exploraron aproximadamente 30 tipos diferentes de tensioactivos y se descubrió que los emulsionantes catiónicos primarios proporcionaban los resultados más aceptables. El tensioactivo más preferido es cloruro de benzalconio. También pueden usarse tensioactivos no iónicos o anfotéricos, tales como emulsionantes derivados de forma natural: glicéridos de almendra PEG-60, dietanolamina de aceite de aguacate, aceite de jojoba etoxilado (ácido de Jojoba PEG-40 y alcohol de Jojoba PEG-40); derivados de polioxietileno, sorbitán monooleato de polioxietileno (20), sorbitán monoestearato de polioxietileno (20); derivados de lanolina: policol 20 (Laneth 20), policol 40 (Laneth 40); ésteres de fosfato neutro; PPG-fosfato de cetiléter, DEA oleth-3 fosfato. También es posible usar tensioactivos aniónicos tales como acilglutamatos: TEA-glutamato de cocoilo, glutamato de lauroilo sódico, glutamato de sebo hidrogenado sódico y glutamato de cocoilo sódico. Es deseable que el tensioactivo tenga una concentración micelar crítica (CMC) alta.

Cuando se prepara la emulsión de sustancia lipófila en agua, los ingredientes hidrófilos y tensioactivos se incorporan todos en el agua. Una vez que se ha preparado la fase acuosa de la emulsión, se añade el aceite y/o los ingredientes lipófilos sólidos/semisólidos al agua en un homogeneizador durante un periodo de tiempo que varía de 5 a 30 minutos para obtener un tamaño de gotas relativamente pequeño. El tamaño de gotas preferido varía de 0,1 μm a 1 μm , más preferentemente por debajo de aproximadamente 0,5 μm . La fusión de fase lipídica se calienta después y se añade a la emulsión de sustancia lipófila en agua y se mezcla vigorosamente agitando vorticialmente o mezclando por propulsor dependiendo del tamaño del producto.

El procedimiento de formulación descrito anteriormente puede adoptarse fácilmente para fabricación a gran escala. El enfoque de mezcla por propulsor puede aumentarse de escala directamente aumentando geoméricamente el tamaño del recipiente y el diámetro del mezclador por propulsor. Sin embargo, a medida que aumenta el tamaño del recipiente, una instalación preferida podría ser un mezclador de combinación tal como un mezclador de alta intensidad con mezclador por propulsor y un agitador de superficie raspada. En una operación a gran escala, la

emulsión de sustancia lipófila en agua puede bombearse de un primer tanque a un segundo tanque que contiene el gel de proliposoma plástico anhídrido a temperatura requerida y mezclarse.

5 Con la vesícula lipídica multilamelar de la presente invención, pueden suministrarse gotas de aceite que contienen compuestos biológicamente activos lipófilos solubilizados o extractos de plantas oleosas mediante encapsulación en liposomas. Además, la posibilidad de encapsulamiento multicompartimento proporciona liberación de fármaco durante periodos de tiempo prolongados. Además, la encapsulación de potenciadores de la consistencia sólidos/semisólidos lipófilos en el compartimiento de núcleo lipófilo central proporciona viscosidad potenciada a la composición de liposomas final. En este caso, la adición de agentes que aumentan la viscosidad en la preparación de liposomas final puede evitarse.

10 En general, la preparación de vesículas lipídicas multilamelares con un componente de núcleo de emulsión central proporciona una composición liposómica uniforme, físicamente estable. La composición tiene una viscosidad que es adecuada para administración tópica y puede fabricarse fácilmente a gran escala.

15 D. Formulación de cremas de IFN-alfa-2b ejemplar para su uso intravaginal

20 La Tabla 1 proporciona los componentes en una composición de bicapa lipídica ejemplar formada de acuerdo con la invención, en la que la cantidad de cada componente se expresa en unidades de mg/g de composición final, y se proporciona tanto en intervalos como en cantidades ejemplares (paréntesis). La composición resultante se denomina en los estudios posteriores "Formulación Q25C", y se forma como se detalla a continuación.

Tabla 1

Componente	Cantidad mg/g
Principio activo	
Sustancia Farmacológica Interferón alfa-2b	0,01-5 (0,808)
Excipientes y agentes protectores	
Solución de Cloruro de Benzalconio 50 %	1 - 10 (2)
Hidroxitolueno Butilado	0,1 - 0,5 (0,102)
Alcohol Cetílico	2 - 40 (20,514)
Colesterol	2 - 40 (20)
Edetato Disódico Dihidrato	0,1 - 0,5 (0,103)
Monoestearato de Glicerol 40-55, Tipo 1	5 - 50 (30,771)
Glicina	0,1 - 5 (1)
L-Metionina	0,1 - 5 (1,126)
Metilparabeno	0,1- 5 (1,538)
Aceite de Oliva, Súper Refinado	10 - 70 (51,285)
Aceite de Ricino PEG-40, Hidrogenado	10 - 70 (51,285)
Fosfato sódico, Dibásico, Heptahidrato	1 - 2 (1,670)
Fosfato sódico, Monobásico, anhídrido	0,25 - 1 (0,480)
Phospholipon 90H	60 - 200 (100)
Propilenglicol	30 - 100 (69,95)
Propilparabeno	0,1 - 1 (0,513)
Agua Purificada	C.S. hasta 1000 (646,846)

25 Descripción del proceso de fabricación para Q25C

Etapa 1. Preparación de microemulsión de aceite en agua: aceite de oliva, monoestearato de glicerol 40-55 tipo I, alcohol cetílico e hidroxitolueno butilado se funden entre sí a 75 °C ± 5 °C. El componente acuoso de la emulsión que incluye agua purificada, aceite de ricino PEG-40 hidrogenado, solución de cloruro de benzalconio al 50 %,

metilparabeno, propilparabeno, L-metionina, edetato disódico dihidrato y fosfatos se calientan juntos en un recipiente de acero inoxidable a $75\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ mientras se agita hasta que se disuelven los ingredientes. El componente de aceite ($75\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) se añade después al componente acuoso ($75\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) gradualmente, mientras se mezcla para formar una emulsión gruesa. La emulsión gruesa se homogeneiza después procesando a través de un microfluidificador hasta que se forma una emulsión homogénea. Esta microemulsión se enfría hasta $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $12\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Etapa 2: preparación de la fase lipídica: la fase lipídica se prepara fundiendo Phospholipon 90H, colesterol e hidroxitolueno butilado con propilenglicol en una mezcladora MMU 10 calentando hasta aproximadamente 80 - $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ mientras se mezcla a una velocidad baja. El mezclado y calentamiento de los ingredientes de fase lipídica se continúa hasta que se forma una fusión clara que después se enfría hasta aproximadamente $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Etapa 3: preparación de la fase acuosa: la cantidad requerida de solución de reserva de IFN alfa-2b se añade y se mezcla suavemente con una mezcla de L-metionina, glicina y agua purificada.

Etapa 4: formulación de producto: la fase acuosa que contiene interferón alfa-2b (de la etapa 3) se añade al sistema A (de la etapa 1) en un tanque de mezclado con cubierta de acero inoxidable. Esta mezcla se mantiene entre $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ mientras que la mezcla se mezcla suavemente y se purga con gas nitrógeno. La mezcla enfriada de sistema A-fase acuosa se añade rápidamente a la fase lipídica que se está mezclando a alta velocidad en el mezclador MMU10. El mezclado continúa durante 10-15 minutos mientras que la temperatura de la mezcla se mantiene a aproximadamente 57 - $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. El producto a granel formado de este modo se mezcla lentamente y se enfría hasta $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un mezclador MMU 10. El producto se transfiere del mezclador MMU 10 a un recipiente de almacenamiento de acero inoxidable de 10 l y se purga con gas nitrógeno. El producto a granel se usa después para rellenar tubos de polipropileno de 1 g usando un rellenedor Unipac 100. Los tubos se purgan con nitrógeno y después se carga la cantidad requerida de producto en los tubos, que se sellan térmicamente. Los tubos cargados de Crema de Interferón alfa-2b se almacenan a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

II. Estudios preclínicos y clínicos sobre la eficacia contra LIEB

A. Base del estudio

En la actualidad, no hay ninguna terapia inmediata disponible para mujeres con VPH que presentan LIEB. Se sabe que el interferón es activo contra una diversidad de lesiones inducidas por VPH, particularmente lesiones cutáneas, tales como verrugas genitales. Una terapia que podría tratar infecciones por VPH del cuello uterino de estadio temprano proporcionaría un beneficio significativo a y el bienestar físico y emocional de muchas mujeres jóvenes.

B. Sumario de estudios preclínicos con Q25C

Se realizaron estudios toxicológicos realizados en apoyo de la presente invención de acuerdo con los requisitos de la "Buena Práctica de Laboratorio para Estudios de Laboratorio No Clínicos" y los Principios de OCDE para la Buena Práctica de Laboratorio. Se llevaron a cabo los siguientes tres tipos de estudios de toxicología:

Sensibilización cutánea de crema de interferón alfa-2b tópica en cobayas (método de Buehler).

Estudio de irritación dérmica de dosis repetida de crema de interferón alfa-2b Biphasix tópica en conejos.

Estudio de irrigación vaginal de crema de interferón alfa-2b en conejos.

Aparte de los 3 estudios de toxicología mencionados anteriormente debería tenerse en cuenta lo siguiente para el perfil de toxicología para la composición de IFN-alfa-2b de la invención: la sustancia farmacológica activa, interferón alfa-2b, está ampliamente considerada una terapia farmacológica segura como se comercializa en todo el mundo por el proveedor de sustancias farmacológicas de Helix, Schering Plough (Intron A[®]).

Schering Plough ya ha completado un perfil de toxicología exhaustivo con interferón alfa-2b en múltiples especies.

El propietario de la patente realizó el ensayo clínico descrito en el presente documento de modo que la administración diaria y total de interferón alfa-2b a pacientes no excedía los límites de seguridad publicados.

Los componentes que componen la composición son todos ingredientes reconocidos, de calidad.

El perfil preclínico ha incluido dos formulaciones de Crema de Interferón alfa-2b designadas "Formulación Q25C" cuya composición y método de preparación se han descrito anteriormente.

B1. Estudios de sensibilización cutánea

Se realizó un estudio exploratorio de 10 días en el que se aplicó formulación Q25C dos veces al día a sitios en piel afeitada del aspecto dorsal de conejos Albinos de Nueva Zelanda a una concentración de 2 MUI de interferón alfa-2b

por gramo de crema (1x la concentración clínica propuesta). Los sitios de ensayo se limpiaron entre aplicaciones usando la técnica de gasa húmeda descrita anteriormente para eliminar cualquier crema residual de aplicaciones previas. Los controles de estudio incluyeron un control negativo (solución salina) y un control de vehículo (idéntico en su composición a la formulación Q25C, menos interferón alfa-2b reemplazado con agua purificada adicional).

5 La aparición de sitios cutáneos se clasificó y se puntuó con respecto a signos de eritema y edema diariamente usando el sistema de puntuación de Draize convencional. Además, se observó a los animales diariamente con respecto a cualquier signo de toxicidad sistémica. No se realizó ninguna evaluación de necropsia al final del estudio.

10 Durante el transcurso de este estudio exploratorio, los hallazgos para eritema fueron en general buenos (puntuaciones de Draize para rojez de generalmente 2), y solamente se observó edema muy ligero o ligero (puntuación de 1-2). Más notablemente, solo fueron evidentes en un animal fisuras cutáneas presentes en superficies intactas. No se observó ningún signo de toxicidad sistémica.

15 C. Estudios de irritación vaginal

Se administró formulación Q25A por vía intravaginal diariamente durante 5 días consecutivos/semana durante 6 semanas a concentraciones de 2 MUI y 20 MUI de interferón alfa-2b por gramo de crema (1x y 10x la concentración clínica propuesta). Los controles de estudio incluyeron un control negativo (solución salina) y un control negativo menos interferón (alfa-2b reemplazado con Agua Purificada adicional).

La apariencia de la apertura vaginal y el perineo se clasificó con respecto a signos de eritema, edema y descarga vaginal diaria. Además los animales se observaron diariamente con respecto a cualquier signo de toxicidad sistémica, y se sacrificaron al final del estudio para determinar cualquier signo de patología general.

25 Los conejos no mostraron ninguna prueba de toxicidad sistémica o irritación vaginal basándose en observaciones en vida de la apertura vaginal y el perineo durante el estudio. En la necropsia, no se observó ningún hallazgo patológico general en tejidos/órganos (incluyendo vagina). Basándose en la clasificación de histopatología, la crema se clasificó como un irritante mínimo.

30 Se observaron hiperplasia epitelial vaginal de mínima a leve, metaplasia y vacuolación grande del epitelio o la lámina propia en varios animales a los que se administró crema de control de vehículo y en 1 animal de control de solución salina. La hiperplasia y metaplasia pueden representar respuestas epiteliales adaptativas de mínimas a leves a la administración diaria repetida de la crema del vehículo durante la duración del estudio de 6 semanas. No hubo ninguna necrosis epitelial vaginal, erosión o ulceración presente en ningún animal.

Conclusiones de los estudios toxicológicos hasta la fecha

40 Los estudios anteriores apoyan la conclusión de que la composición de la presente invención, como se realiza en la formulación Q25C, no es sensibilizante, y en el peor de los casos, es un irritante de leve a moderado durante un periodo transitorio inicialmente y, en lo sucesivo, solamente levemente irritante, si lo es en absoluto, durante el periodo de 30 días estudiado.

45 D. Estudios clínicos

La composición de la presente invención, como se realiza en la formulación Q25C, se ensayó con respecto a eficacia clínica y efectos secundarios en el tratamiento de LIEB con estado de VPH (Lesión Intraepitelial Escamosa de Grado Bajo con estado de virus de papiloma humano), en el que "intraepitelial" significa que solamente están presentes células anómalas en la capa superficial del cuello uterino. El objetivo del estudio fue determinar la eficacia y seguridad de la aplicación de Crema de Interferón alfa-2b tópica Q25C en comparación con un segundo estudio realizado como una población de control para describir la historia natural de la progresión o regresión de la enfermedad. La metodología y el estudio clínico, el número de estudios objeto, y los criterios de valoración clínicos se presentan en la Tabla 2, y los criterios para evaluación, en la Tabla 3.

55 Tabla 2: resumen de ensayos clínicos: crema de interferón alfa de dosis baja para el tratamiento de LIEB con estado de VPH confirmado citológicamente

Producto investigado:	IFN002: crema de interferón alfa 2b tópica HPV001: sin tratamiento
Título de los estudios:	• Número de Protocolo: IFN 002 - Un estudio abierto de Crema de Interferón alfa-2b tópica para el tratamiento de LIEB con estado de VPH confirmada citológicamente (Fase II)
	• Número de Protocolo: HPV001 - Un estudio prospectivo de 3 meses de mujeres que presentan LIEB con estado VPH+ confirmada - un estudio sin intervención

ES 2 617 063 T3

Investigadores:	Investigadores Principales: <ul style="list-style-type: none"> • IFN002: Prof. Dr. med. Achim Schneider, Alemania • HPV001: Dr. med. Gerd Böhmer, Alemania 		
Centro o centros de estudio:	<ul style="list-style-type: none"> • IFN002: 3 centros en Alemania • HPV001: 1 centro en Alemania 		
Objetivos:	<ul style="list-style-type: none"> • IFN 002: determinar la eficacia y seguridad de la aplicación de Crema de Interferón alfa-2b tópica • HPV001: describir la historia natural de la progresión o regresión de enfermedad 		
Metodología:	<ul style="list-style-type: none"> • IFN 002: estudio prospectivo, abierto, con 6 semanas de tratamiento y un periodo de observación de seguimiento de 6 semanas • HPV001: estudio de cohorte individual prospectivo con un periodo de observación de 12 semanas 		
Número total de sujetos (planeados y analizados):		IFN002 (tratamiento)	HPV001 (control)
	Planeados para PP	20	20
	Admitidos/Explorados	78	38
	Análisis de seguridad	20	21
	Análisis de ITT	20	21
	Análisis de PP	15	19
Diagnóstico y principales criterios para inclusión:	Ambos estudios: mujeres que presentan <u>LIEB</u> con estado VPH+ confirmada citológicamente		
Tipo y duración del tratamiento:	<ul style="list-style-type: none"> • IFN 002: Crema de Interferón alfa-2b tópica durante 6 semanas • HPV001: sin tratamiento 		
Criterios para evaluación:	<p>Eficacia: Criterio de valoración primario:</p> <ul style="list-style-type: none"> • IFN002: tasa de respuesta de PAP, definida como la proporción de pacientes con resolución de un frotis de Pap anómalo durante 12 semanas después del inicio del periodo de tratamiento (es decir semana 2 o 4 o 6 o 12 = visita V04, V05, V06 y V07) en la población de Intención de Tratar (ITT) • HPV001: proporción de pacientes con resolución de un frotis de Pap anómalo al final del periodo de observación de 12 semanas. <p>Criterios de valoración secundarios:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Igual que el criterio de valoración primario para la población por protocolo (PP), sin embargo • La proporción de pacientes con reversión de Estado VPH+ a negativo (evaluación cualitativa) durante 12 semanas después del inicio del periodo de observación (ITT y PP) • Proporción de pacientes con reducción cuantitativa de carga viral de VPH durante 12 semanas después del inicio del periodo de observación (ITT) <p>Seguridad:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Acontecimientos adversos • Ensayos de seguridad de laboratorio • Parámetros vitales 		

Tabla 3

Métodos estadísticos:	<p>Parámetros de eficacia: el análisis estadístico inferente de los parámetros de eficacia fue puramente exploratorio, usando $\alpha = 0,05$ para cada ensayo llevado a cabo sin ajuste α para ensayos múltiples. La diferencia en las tasas de respuesta entre ambos grupos se determinó con el ensayo de Chi^2.</p> <p>Parámetros de seguridad: todos los análisis fueron de naturaleza descriptiva. Los parámetros de laboratorio se analizaron por medio del ensayo de Mann-Whitney-U asintótico (diferencias entre grupos) y el ensayo de Wilcoxon asintótico para muestras dependientes (diferencias dentro del grupo). Todos los AA se codificaron de acuerdo con MedDRA y se enumeraron completamente y por separado por grupos de estudio. Se realizó análisis relacionado con AA y relacionado con pacientes.</p>
Resultados de eficacia principales:	<ul style="list-style-type: none"> • Criterio de valoración primario (ITT): 8 de 20 pacientes (40,00 %) en el grupo de tratamiento respondieron en comparación con 3 de 21 pacientes (14,29 %) en el grupo de control. Sin embargo, los resultados de frotis de Pap de dos pacientes del grupo de tratamiento empeoraron después de una respuesta de PAP preliminar en visitas tempranas. Por lo tanto, si se considera la respuesta de PAP después del periodo de observación de 12 semanas solamente, 6 de 20 pacientes (30,00 %) del grupo de tratamiento respondieron. • Respuesta de PAP en la población por protocolo (PP): en el grupo de tratamiento 7 de 15 pacientes (46,67 %) respondieron en comparación con 3 de 19 pacientes (15,79 %) en el grupo de control. Si se considera la respuesta de PAP después del periodo de observación de 12 semanas solamente, 6 de 15 pacientes (40,00 %) del grupo de tratamiento respondieron. • Proporción de pacientes con resolución de estado VPH+ (ITT y PP) durante periodo de tratamiento de 12 semanas, es decir pacientes con aparición de VPH- al menos una vez después de V03 = inicio del tratamiento. <p>ITT: en el grupo de tratamiento, 3 de 20 pacientes (15,00 %) respondieron a VPH a diferencia de 2 de 21 pacientes (9,52 %) en el grupo de control. Comentario: el estado de VPH de un paciente del grupo de tratamiento empeoró en V06, pero fue negativo de nuevo en la visita V07. PP: en el grupo de tratamiento 2 de 15 pacientes (13,33 %) respondieron a VPH y 2 de 19 pacientes (10,53 %) en el grupo control.</p>
Resultados de eficacia adicionales	<ul style="list-style-type: none"> • Respuesta de Pap de una población estratificada de pacientes que entran en el estudio como PAP IIID solamente (es decir, según "El Sistema de Clasificación de Bethesda" de citología de LIEB). Un análisis de subgrupo de los pacientes que presentaban PAP IIIId reveló una diferencia significativa entre grupos de tratamiento. 6 de los 14 pacientes con PAP IIIId de la población de ITT del estudio IFN002 respondieron en comparación con ausencia de respuesta en los 14 pacientes de PAP IIIId de la población de PP. • Diagnóstico colposcópico. El diagnóstico colposcópico fue estadísticamente significativamente mejor en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control en el momento de la observación final individual. En el estudio IFN 002, 12 pacientes (60 %) mejoraron hacia "normal" o "atípico". Por comparación, en el estudio sin intervención, solamente 2 pacientes (9,52 %) mejoraron en el momento de observación final individual
Resultados de seguridad principales:	<ul style="list-style-type: none"> • Acontecimientos adversos: se documentaron 36 AA. 34 AA en el grupo de tratamiento: 7 de estos aparecen antes del inicio del tratamiento. Dos AAS se observaron en 1 paciente del grupo de control. Los análisis de AA se basaron en los 27 AA del grupo de tratamiento que se iniciaron después del inicio de tratamiento ("AA emergentes en tratamiento"); estos 27 AA aparecieron en 14 de 20 pacientes (70,00 %) del grupo de tratamiento. De acuerdo con los términos primarios de MedDRA 3 AA vinieron de la categoría "Metrorragia" y 4 de la categoría "Cefalea"; todas las otras clases de AA aparecieron solamente una vez o dos veces. 5 AAS en 3 pacientes todos sin ninguna relación causal relacionada con el tratamiento aparecieron con la medicación del estudio (grupo de tratamiento: embarazo antes de inicio del tratamiento en 1 paciente, accidente durante natación con conmoción cerebral y compresión de la columna vertebral en 1 paciente; grupo de control: embarazo con aborto en 1 paciente). No hubo ninguna muerte y ningún otro AA significativo.
	<ul style="list-style-type: none"> • Laboratorio: <u>orina</u>: no se observó ningún cambio significativo a lo largo del tiempo con respecto a los valores de pH de la orina. En un centro, algunos parámetros de orina se determinaron cuantitativamente: aunque hubo un claro aumento de los eritrocitos medios, los pre-post cambios fueron pequeños y no significativos para este y los otros parámetros. En algunos pacientes se encontraron leucocitos, nitrato, proteína, urobilinógeno, bilirrubina y/o sangre determinados de forma cualitativa en orina. Sangre: se encontraron diferencias significativas entre grupos con respecto a hematocrito, MCV, MCHC, trombocitos y basófilos al inicio y al final del estudio, no, sin embargo, con respecto a los pre-post cambios medios. Parece haber una tendencia a un aumento de leucocitos (sin embargo, no significativa), linfocitos [Gpt/l] (significativo), monocitos [Gpt/l] (significativo) y basófilos [Gpt/l] (significativo) en los pacientes del grupo de tratamiento. Se encontraron diferencias entre grupos significativas con respecto a creatinina, ASAT y fosfatasa alcalina (PA) al inicio y al final del estudio, no, sin embargo, con respecto a los pre-post cambios

	<p>medios. Hubo una reducción media significativa con respecto a bilirrubina en ambos grupos, y un aumento medio significativo con respecto a ALAT en el grupo de control. Para todos los parámetros de laboratorio abordados en el CRF, se requirió la evaluación del investigador (normal, si está fuera del intervalo normal: clínicamente relevante o clínicamente irrelevante). Se documentó relevancia clínica solamente en un número escaso de casos.</p> <ul style="list-style-type: none"> Examen físico y signos vitales: solamente en un caso del grupo de tratamiento se observó algún hallazgo patológico en la visita V06 (angina). Dentro de cada grupo de estudio, los signos vitales permanecieron casi constantes durante el ensayo dentro de los límites de la fluctuación normal y los errores de medición. Hubo una diferencia significativa entre grupos (ensayos U) con respecto a la presión sanguínea diastólica y frecuencia cardíaca en la visita V01 con valores mayores en el grupo de tratamiento, pero sin diferencias significativas con respecto a las pre-post diferencias.
Conclusiones:	<p>En general la rama de tratamiento tiene una tasa de respuesta mayor que el grupo de comparación no tratado. No se cumple la significación estadística usando $\alpha = 0,05$ para el criterio de valoración primario si se compara directamente. Sin embargo, el tamaño de muestras pequeño y el hecho de que los estudios se realizaron por separado e independientemente con programas de examen colposcópico ligeramente diferentes hacen este tipo de comparación difícil.</p> <p>Un análisis de subgrupos de los pacientes que presentaban PAP IIIId reveló una diferencia significativa entre grupos de tratamiento. 6 de los 14 pacientes de PAP IIIId de la población de ITT del estudio IFN002 respondieron en comparación con ausencia de respuesta en los 14 pacientes con PAP IIIId de la población de PP.</p>
	<p>El diagnóstico colposcópico fue estadísticamente significativamente mejor en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control en el momento de la observación final individual. En el estudio IFN 002, 12 pacientes (60 %) mejoraron hacia "normal" o "atípico". Por comparación, en el estudio sin intervención, solamente 2 pacientes (9,52 %) mejoraron en el momento de observación final individual.</p> <p>Ninguno de los AAS estuvo relacionado con el fármaco del estudio y no se produjo ningún otro AA significativo. El tratamiento muestra un perfil de seguridad excelente.</p> <p>Un posible beneficio clínico y la falta de acontecimientos adversos significativos relacionados con el fármaco, son indicaciones positivas para el fármaco ensayado.</p>

Parámetros de eficacia: el análisis estadístico inferencial de los parámetros de eficacia fue puramente exploratorio, usando $\alpha = 0,05$ para cada ensayo llevado a cabo sin ajuste de α para múltiples ensayos. La diferencia en las tasas de respuesta entre ambos grupos se determinó con el ensayo de Chi^2 .

5 El principal resultado de estudio se basó en la tasa de respuesta de Pap en una comparación entre las dos poblaciones de estudio. Se consideró que se producía normalización del frotis de Pap si el frotis de Pap del paciente mejoraba hasta el grupo II o mejor desde cualquiera de los grupos de frotis de Pap IIW a IIID según el sistema de "Clasificación de Múnich" o Europeo común de citología de LIEB.

10 Parámetros de seguridad: todos los análisis fueron de naturaleza descriptiva. Los parámetros de laboratorio se analizaron por medio del ensayo de Mann-Whitney-U asintótico (diferencias entre grupos) y el ensayo de Wilcoxon asintótico para muestras dependientes (diferencias dentro de grupos). Todos los AA se codificaron de acuerdo con MedDRA y se enumeraron completamente y por separado por grupos de estudio. Se realizó un análisis relacionado con AA y relacionado con pacientes. Criterio de valoración primario (ITT): 8 de 20 pacientes (40,00 %) en el grupo de tratamiento respondieron en comparación con 3 de 21 pacientes (14,29 %) en el grupo de control. Sin embargo, los resultados de frotis de Pap de dos pacientes del grupo de tratamiento empeoraron después de una respuesta de PAP preliminar en visitas tempranas. Por lo tanto, si se considera la respuesta de PAP después del periodo de observación de 12 semanas solamente (según la definición en el grupo de control), 6 de 20 pacientes (30,00 %) del grupo de tratamiento respondieron.

20 Respuesta de PAP en la población por protocolo (PP): en el grupo de tratamiento 7 de 15 pacientes (46,67 %) respondieron en comparación con 3 de 19 pacientes (15,79 %) en el grupo de control. Si se considera la respuesta de PAP después del periodo de observación de 12 semanas solamente

25

- Acontecimientos adversos: se documentaron 36 AA. 34 AA en el grupo de tratamiento: 7 de estos comienzan antes del inicio del tratamiento. Se observaron dos AAS en 1 paciente del grupo de control. Los análisis de AA se basaron en los 27 AA del grupo de tratamiento que comenzaron después del inicio del tratamiento ("AA emergentes con tratamiento"); estos 27 AA aparecieron en 14 de 20 pacientes (70,00 %) del grupo de tratamiento. De acuerdo con los términos primarios de MedDRA 3 AA vinieron de la categoría "Metrorragia" y 4 de la categoría "Cefalea"; todas las otras clases de AA aparecieron solamente una vez o dos veces. 5 AAS en 3 pacientes todos sin relación causal relacionada con el tratamiento aparecieron con medicación del estudio (grupo de tratamiento: embarazo antes del inicio del tratamiento en 1 paciente, accidente durante natación con conmoción del cerebro y compresión de la columna vertebral en 1 paciente; grupo de control: embarazo con aborto en 1 paciente). No hubo ninguna muerte y ningún otro AA significativo.

30

35

5 • Laboratorio: orina: no se observó ningún cambio significativo a lo largo del tiempo con respecto a los valores de pH de la orina. En un centro, algunos parámetros de orina se determinaron cuantitativamente: aunque hubo un claro aumento de los eritrocitos medios, los pre-post cambios fueron pequeños y no significativos para este y los otros parámetros. En algunos pacientes se encontraron en orina leucocitos, nitrato, proteína, urobilinógeno, bilirrubina y/o sangre determinados de forma cualitativa. Sangre: se descubrieron diferencias significativas entre grupos con respecto a hematocrito, MCV, MCHC, trombocitos y basófilos al inicio y al final del estudio, no, sin embargo, con respecto a los pre-post cambios medios. Parece haber una tendencia a un aumento de leucocitos (sin embargo, no significativo), linfocitos [Gpt/l] (significativo), monocitos [Gpt/l] (significativo) y basófilos [Gpt/l] (significativo) en los pacientes del grupo de tratamiento. Se encontraron diferencias significativas entre grupos con respecto a creatinina, ASAT y fosfatasa alcalina (PA) al inicio y al final del estudio, no, sin embargo, con respecto a los pre-post cambios medios. Hubo una reducción media significativa con respecto a bilirrubina en ambos grupos, y un aumento medio significativo con respecto a ALAT en el grupo de control. Para todos los parámetros de laboratorio abordados en el CRF, se requirió la evaluación del investigador (normal, si está fuera del intervalo normal: clínicamente relevante o clínicamente irrelevante). Se documentó relevancia clínica en un número muy escaso de casos solamente.

20 • Examen físico y signos vitales: solamente en un caso del grupo de tratamiento se observó un hallazgo patológico en la visita V06 (angina). Dentro de cada grupo de estudio, los signos vitales permanecieron casi constantes durante el ensayo dentro de los límites de la fluctuación normal y los errores de medición. Hubo una diferencia significativa entre grupos (ensayos U) con respecto a la presión sanguínea diastólica y la frecuencia cardiaca en la visita V01 con mayores valores en el grupo de tratamiento, pero sin diferencias significativas con respecto a las pre-post diferencias.

25 En general la rama de tratamiento tiene una mayor tasa de respuesta que el grupo de comparación no tratado. No se cumple la significación estadística usando $\alpha = 0,05$ para el criterio de valoración primario si se compara directamente. Sin embargo, el tamaño de muestra pequeño y el hecho de que los estudios se realizaron por separado e independientemente con programas de examinación colposcópica ligeramente diferentes hacen este tipo de comparación difícil.

30 Resultados de eficacia adicionales: un análisis de subgrupo de los pacientes que presentaban PAP IIIId reveló una diferencia significativa entre grupos de tratamiento. 6 de los 14 pacientes de PAP IIIId de la población de ITT del estudio IFN002 respondieron en comparación con ausencia de respuesta en los 14 pacientes de PAP IIIId de la población de PP.

35 Más allá del parámetro de tasa de respuesta de PAP, el diagnóstico colposcópico fue estadísticamente significativamente mejor en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control en el momento de observación final individual. En el estudio IFN 002, 12 pacientes (60 %) mejoraron hacia "normal" o "atípico". En comparación, en el estudio sin intervención, solamente 2 pacientes (9,52 %) mejoraron en el momento de la observación final individual.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vesícula lipídica bifásica para su uso en el tratamiento de displasia de cuello uterino por suministro intravaginal, que comprende una suspensión de vesículas de bicapa lipídica que en su interior tienen, una emulsión de aceite en agua, interferón α -2b humano y L-metionina, teniendo la composición una actividad específica de interferón alfa-2b de entre aproximadamente 1 y 10 MUI (millones de unidades internacionales) por gramo de composición, y entre 0,01 y 0,5 por ciento en peso de L-metionina.
- 10 2. La composición para uso de la reivindicación 1, que está en una forma de crema.
3. La composición para uso de la reivindicación 1, que tiene una actividad específica de interferón alfa 2b de entre 1 y 3 MUI de interferón alfa 2b humano por gramo de composición.
- 15 4. La composición para uso de la reivindicación 3, que contiene entre 0,01 y 0,5 por ciento en peso de L-metionina.
5. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que al menos 30 % del interferón alfa-2b y L-metionina en la composición están presentes en la emulsión de aceite en agua inmovilizada.
- 20 6. La composición para uso de la reivindicación 1, por la que la suspensión para administrar por vía intravaginal al sujeto, a una dosis entre 1 y 20 millones de unidades internacionales (MUI) de interferón alfa-2b y dicha administración se va a repetir al menos 3 días/semana, durante un periodo de al menos 4 semanas.
- 25 7. La composición para uso de la reivindicación 6, que tiene una actividad específica entre 1 y 3 MUI de interferón alfa humano 2b por gramo de composición.
8. La composición para uso de la reivindicación 6, que está en forma de crema, y va a administrarse a una dosis de entre 3 y 7 g por administración.
- 30 9. La composición para uso de la reivindicación 6, que contiene entre 0,01 y 0,5 por ciento en peso de L-metionina.
10. La composición para uso de la reivindicación 6, en la que al menos 30 % del interferón alfa 2b y L-metionina en la composición para administrar están presentes en la emulsión de aceite en agua inmovilizada.
- 35 11. La composición para uso de la reivindicación 6, en la que dicha administración va a repetirse al menos 3 días/semana, durante un periodo de al menos 6 semanas.
12. Un método para preparar una composición de vesícula bifásica que comprende una vesícula lipídica multilamelar que comprende:
 - 40 (a) proporcionar una fase de emulsión acuosa que comprende agua y un tensioactivo, e interferón alfa 2b humano y de 0,01 a 0,5 por ciento en peso de L-metionina incorporada en la emulsión, en el que la fase acuosa comprende además un antioxidante adicional, un agente quelante y/o un estabilizante proteico; y
 - 45 (b) mezclar la fase de emulsión acuosa con una fase dispersa que comprende un aceite y potenciador de la consistencia de modo que la fase dispersa se disperse en la fase de emulsión acuosa; en el que la composición tiene una actividad de interferón alfa-2b humano de entre aproximadamente 1 y 10 MUI por gramo de composición.
- 50 13. El método de la reivindicación 12, en el que dicha fase dispersa está constituida por gotas de aceite que tienen un tamaño inferior a 1 μ m.
14. El método de la reivindicación 12 o reivindicación 13, en el que dicha vesícula multilamelar comprende colesterol.

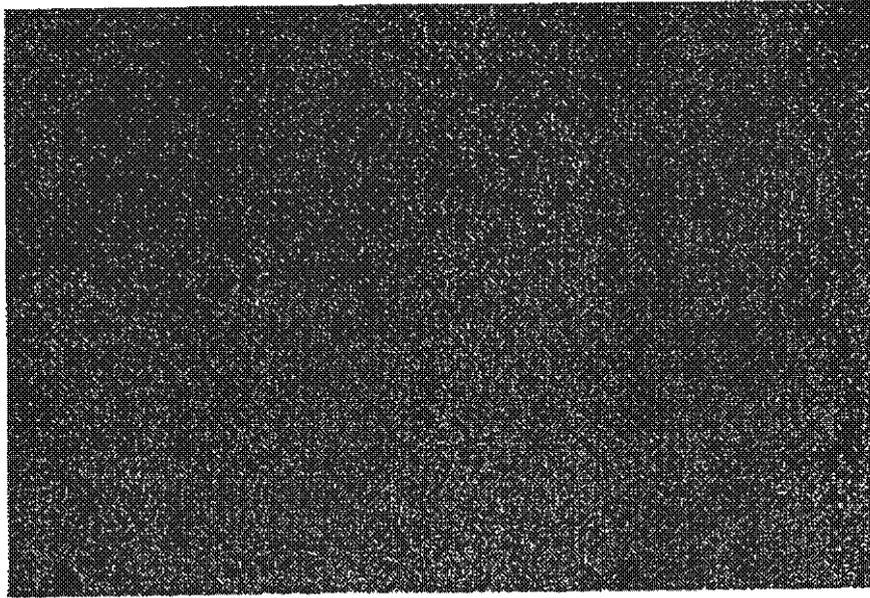


Fig. 1

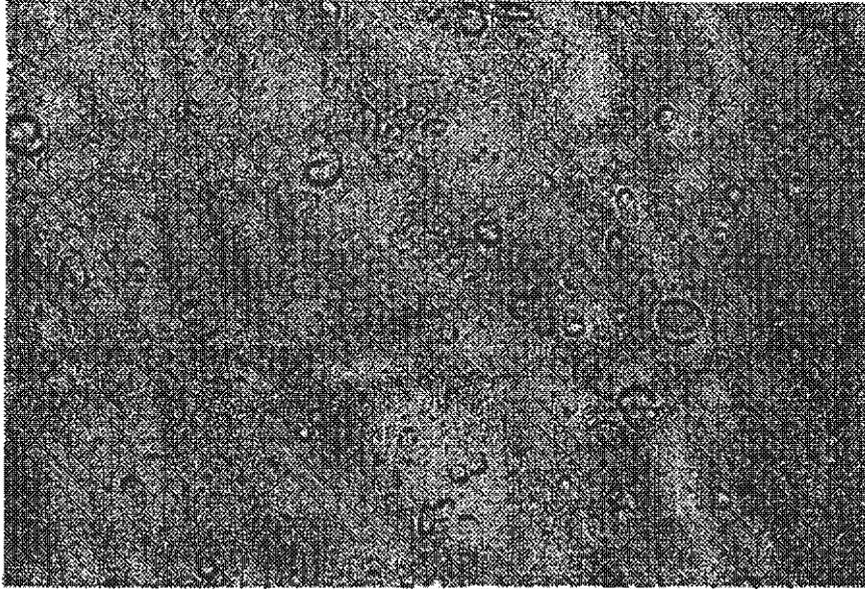


Fig. 2A

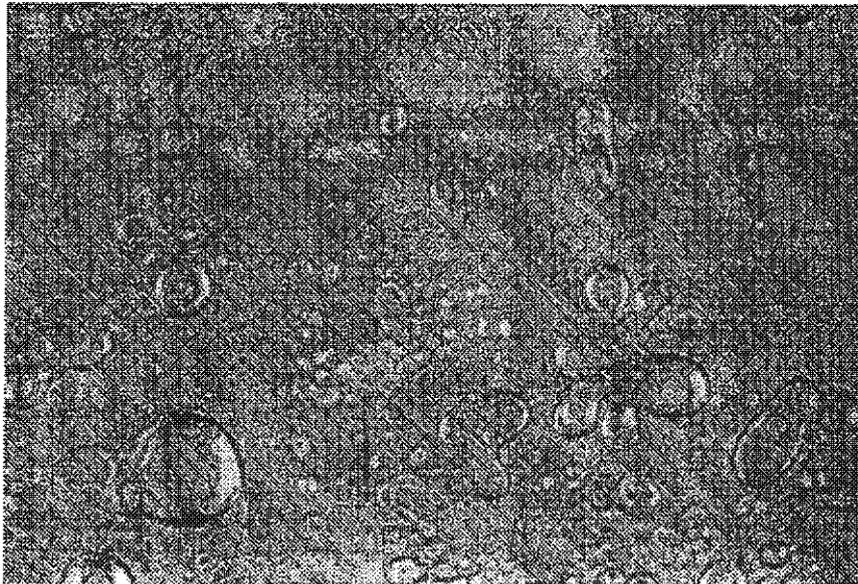


Fig. 2B

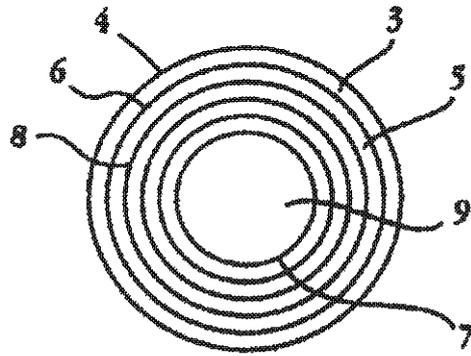


Fig. 3

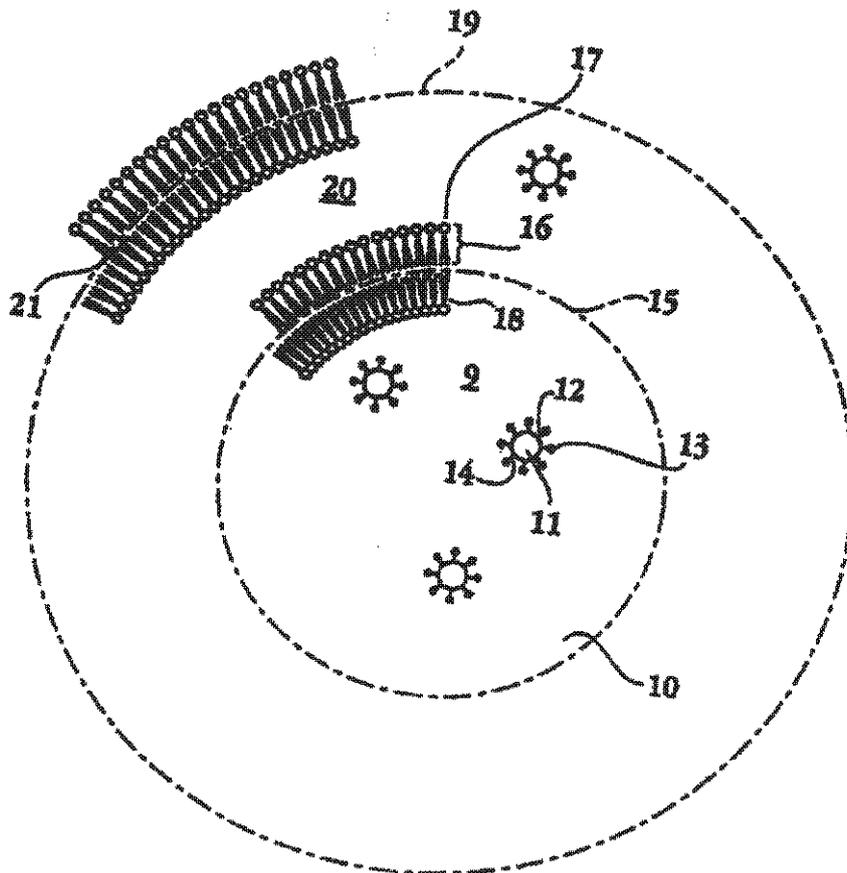


Fig. 4