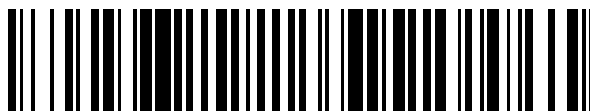


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 400**

51 Int. Cl.:

A61K 47/10 (2007.01)

A61K 47/42 (2007.01)

A61K 47/44 (2007.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2011 PCT/US2011/023112**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011 WO11097149**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2011 E 11702566 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2531173**

54 Título: **Composiciones que contienen un taxano o un taxoide y una proteína**

30 Prioridad:

03.02.2010 US 301006 P

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

28.02.2019

73 Titular/es:

**ONCBIOMUNE, INC. (100.0%)
17050 Medical Center Drive, Physicians Plaza II,
4th Floor,
Baton Rouge, Louisiana 70816, US**

72 Inventor/es:

**HEAD, JONATHAN, F. y
ELLIOTT, ROBERT, L.**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 702 400 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que contienen un taxano o un taxoide y una proteína.

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden taxanos o taxoides y una metal-transferrina, útiles para el tratamiento del cáncer.

10 Estado de la técnica

Los taxanos son una familia de compuestos que incluye paclitaxel, un producto natural citotóxico, y docetaxel, un derivado semisintético, dos compuestos muy utilizados en el tratamiento del cáncer, E. Baloglu y D. G. I. Kingston, J. Nat. Prod. 62: 1448-1472 (1999). Los taxanos son venenos mitóticos del huso que inhiben la despolimerización de tubulina, lo cual produce la muerte celular. Si bien docetaxel y paclitaxel son agentes útiles en el tratamiento del cáncer, su actividad antitumoral es limitada debido a su toxicidad no específica para las células normales. Estas asociaciones fuera de la diana pueden causar complicaciones que van desde inflamación hasta muerte del paciente.

Debido a la insolubilidad particular de los taxanos, ha sido difícil formular las formas farmacéuticas. Por ejemplo, TAXOL® (Bristol-Myers Squibb) utiliza una formulación que contiene paclitaxel disuelto en Cremophor® EL (un aceite de ricino polietoxilado) y etanol, como agente de administración. No obstante, a Cremophor® EL se le ha llamado agente limitativo de la dosis debido a sus toxicidades. En particular, el vehículo de Cremophor® EL puede tener efectos colaterales graves, incluidas reacciones severas de hipersensibilidad. ABRAXANE® (Abraxis BioScience, LLC) utiliza una forma nanoparticulada de paclitaxel unido a albúmina de sangre humana, eliminando de este modo el Cremophor® EL. No obstante, si bien dichas nanopartículas pueden unirse a e internalizar células tumorales mediante los receptores de la superficie de células endoteliales gp60, no están específicamente dirigidas a las células tumorales.

Un planteamiento común para dirigir compuestos terapéuticos específicamente hacia células cancerosas es conjugar agentes antineoplásicos a anticuerpos o fragmentos funcionales. No obstante, la terapia de anticuerpos puede resultar en niveles significativos de asociación celular no específica. La proteína transportadora del hierro en el suero, transferrina (Tf), se ha investigado como un vehículo de fármaco potencial. La conjugación de antineoplásicos a Tf permite el direccionamiento específico a células cancerosas, puesto que el receptor de transferrina (TfR) se expresa en forma excesiva en una amplia gama de tipos de cáncer (Cazzola et al., Blood. 1990; 75(10):1903-19; Reizenstein, Med Oncol Tumor Pharmacother. 1991; 8(4):229-33). El direccionamiento específico de fármacos a células cancerosas con Tf puede ayudar a mitigar la toxicidad no específica asociada con tratamientos de quimioterapia y radioterapia (Saul et al., J Control Release. 2006; 114(3):277-87; Kreitman, Aaps J. 2006; 8(3):E532-51). Se han descrito conjugados Tf de citotoxinas, incluidas metotrexato (MTX), artemisinina y toxina de difteria (DT), además de conjugados Tf con nuevas cargas tales como fármacos encapsulados en forma de liposomas y ARNip (Lim y Shen, Pharm Res. 2004; 21(11): 1985-92; Lai et al., Life Sci. 2005; 76(11): 1267-79; Johnson et al., J Biol Chem. 1988; 263(3): 1295-300; Hu-Lieskovan et al., Cancer Res. 2005; 65(19): 8984-92; Tros et al., J Drug Target. 2006; 14(8):527-35; Maruyama et al., J Control Release. 2004; 98(2):195-207; Chin et al., J Control Release. 2006; 112(2):199-207).

Varios agentes quimioterapéuticos se pueden unir a transferrina mediante residuos lisina disponibles usando una reacción de glutaraldehído para formar un grupo de enlace químico. El glutaraldehído se puede usar para activar el agente quimioterapéutico o bien cuando el agente y la transferrina están juntos en disolución, o se puede activar el agente quimioterapéutico y luego mezclar en disolución con la transferrina. Se ha unido paclitaxel mediante reacción de glutaraldehído a transferrina; véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. núm. 6.825.166 y 7.417.023; y la solicitud de patente de EE. UU. núm. 20090181048. Una composición dirigida a células de carcinoma de mama que comprende paclitaxel unido mediante una reacción de glutaraldehído a la superficie de una transferrina humana que previamente formaba complejo con galio o indio ha sido descrita por Head Jonathan F et al: "Gallium loaded transferrin as a specific carrier of paclitaxel into breast carcinoma cells", PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 42, 1 de marzo de 2001 (2001-03-01), página 375.

No obstante, dichos enlaces de glutaraldehído no pueden inhibir ni prevenir la liberación del agente quimioterapéutico tras la captación celular.

60 Objeto de la invención

El alcance de la invención se define con las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento hace referencia a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

Se describen en este documento nuevas composiciones que comprenden una proteína, como albúmina o

transferrina, y un taxano o taxoide que no utiliza un grupo de enlace entre el taxano y la proteína. Las composiciones, a pesar de la falta de un grupo de enlace entre el taxano y la proteína, son cromatográficamente estables. Dichas composiciones han demostrado órdenes de magnitud de mayor actividad en la inhibición de la proliferación celular, por ejemplo, con respecto a conjugados de taxano-transferrina unidos por glutaraldehído. Además, dichas composiciones pueden estar sustancialmente libres de tensioactivos no iónicos, como Cremophor EL, y son útiles en el tratamiento del cáncer, como cáncer de mama.

En un aspecto, la presente descripción da a conocer métodos para preparar una composición, que comprende combinar (A) una primera disolución que comprende una proteína; y (B) una segunda disolución que comprende (i) un taxano o un taxoide; (ii) un tensioactivo no iónico; y (iii) un alcohol, para proporcionar una tercera disolución acuosa; ajustar el pH de la tercera disolución acuosa entre aproximadamente 7,9 y aproximadamente 8,3; y purificar la tercera disolución acuosa con el pH ajustado para eliminar solutos que tienen un peso molecular de menos de 10.000 Da.

En otro aspecto, la presente descripción da a conocer composiciones preparadas de acuerdo con el aspecto precedente.

En otro aspecto, la presente descripción da a conocer composiciones que comprenden (i) una proteína; (ii) un taxano o un taxoide; y (iii) un diluyente farmacéuticamente aceptable, en donde el taxano o el taxoide o bien (a) se une con la proteína mediante un enlace directo entre el taxano o el taxoide y la proteína; o (b) forma un complejo con la proteína.

En otro aspecto, la presente descripción da a conocer métodos para tratar un cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con o preparada de acuerdo con los aspectos precedentes de la descripción.

Los aspectos anteriores de la descripción no son de conformidad con la invención.

La invención se refiere a una composición que consiste esencialmente en (i) una proteína; (ii) un taxano o un taxoide; y (iii) un diluyente farmacéuticamente aceptable, en donde el taxano o taxoide está unido con la proteína mediante un enlace directo entre el taxano o taxoide y la proteína, en donde el taxano o taxoide es paclitaxel o docetaxel; en donde la proteína es una metal-transferrina; y en donde la metal-transferrina es galio-transferrina, hierro-transferrina, indio-transferrina, zinc-transferrina, manganeso-transferrina, platino-transferrina, o una mezcla de estos.

La invención también se refiere a la composición anterior para uso en un método para tratar un cáncer en un paciente que necesita dicho tratamiento, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición.

Finalmente, la invención también se refiere a un método para preparar la composición anterior, en donde dicho método comprende:

combinar (A) una primera disolución acuosa que comprende una proteína; y (B) una segunda disolución que comprende (i) un taxano o un taxoide; (ii) un tensioactivo no iónico; y (iii) un alcohol, para proveer una tercera disolución acuosa; ajustar el pH de la tercera disolución acuosa entre 7,9 y 8,3; y purificar la tercera disolución con pH ajustado para eliminar solutos que tienen un peso molecular inferior a 10.000 Da; en donde el taxano o el taxoide es paclitaxel o docetaxel; en donde la proteína es metal-transferrina; y en donde la metal-transferrina es galio-transferrina, hierro-transferrina, indio-transferrina, zinc-transferrina, manganeso-transferrina, platino-transferrina, o una mezcla de estos.

Descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico de lecturas espectrofotométricas para fracciones de PGT de una cromatografía en columna y actividad inhibidora de diluciones 1:10.000 de fracciones para células TOV-112d en cultivo celular.

La Figura 2 es un gráfico de la inhibición de células MCF-7, TOV-112D, NCI/Adr-Res, SW480 y NCI-H1650 por PGT del Ejemplo 1 en cultivo celular.

La Figura 3 es un gráfico de la inhibición de células MCF-7, OVCAR-8, NCI/Adr-Res y NCI-H1650 por paclitaxel-albúmina del Ejemplo 4 en cultivo celular. El Ejemplo 4 no es de acuerdo con la invención.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, las composiciones de la invención se pueden preparar combinando primero (A) una primera disolución acuosa que comprende una metal-transferrina; y (B) una segunda disolución que comprende (i) un taxano o un taxoide; (ii) un tensioactivo no iónico; y (iii) un alcohol, para proporcionar una tercera disolución acuosa. La metal-transferrina es galio-transferrina, hierro-transferrina, indio-transferrina, zinc-transferrina, manganeso-transferrina, platino-transferrina, o una mezcla de estos. El taxano o el taxoide es paclitaxel o docetaxel.

La primera disolución acuosa es en general una disolución acuosa y contiene la proteína en una concentración entre aproximadamente $8,5 \times 10^{-5}$ M y $8,5 \times 10^{-4}$ M; o entre aproximadamente $1,5 \times 10^{-4}$ M y $5,5 \times 10^{-4}$ M. La segunda disolución puede contener el taxano o el taxoide en una concentración entre aproximadamente $9,0 \times 10^{-4}$ M y $9,0 \times 10^{-3}$ M; o entre aproximadamente $2,0 \times 10^{-3}$ M y $6,0 \times 10^{-3}$ M; y el tensioactivo no iónico en una concentración entre aproximadamente 25 v/v % y 75 v/v % o entre aproximadamente 40 v/v % y 60 v/v %.

La primera y segunda disoluciones se pueden combinar añadiendo la segunda disolución a la primera disolución, en ciertas realizaciones por adición gota a gota. La temperatura de las disoluciones se puede mantener a una temperatura entre aproximadamente 27 °C y 35 °C; o aproximadamente 29 °C y 33 °C mientras que las disoluciones están siendo combinadas.

El término "proteína", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a compuestos orgánicos elaborados de aminoácidos dispuestos en una cadena lineal y, preferiblemente plegados en forma globular o fibrosa (es decir, una conformación estable). Los aminoácidos en una proteína están unidos por los enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácidos adyacentes. La secuencia de aminoácidos en una proteína se puede definir, por ejemplo, por la secuencia de un gen. En general, el código genético especifica 20 aminoácidos estándar; no obstante, las proteínas pueden contener otros aminoácidos tales como selenocisteína y pirrolisina.

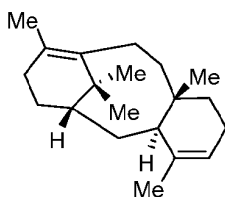
Los residuos en una proteína pueden estar químicamente modificados por modificación post-traducción, lo cual altera las propiedades físico-químicas, el plegado, la estabilidad, la actividad y, en última instancia, la función de una proteína. En determinadas realizaciones, una proteína contiene por lo menos 30 residuos de aminoácidos.

Las proteínas adecuadas para uso en la presente descripción incluyen albúmina, transferrina, metal-transferrina, prolactina o un factor de crecimiento epidérmico tal como el factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF), el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), anfirregulina (AR), epirregulina (EPR), epigen, betacelulina (BTC), neurregulina 1 (NRG1), neurregulina 2 (NRG2), neurregulina 3 (NRG3) y neurregulina 4 (NRG4). La proteína de la invención es metal-transferrina.

Tal como se emplea en la presente memoria, "metal-transferrina" significa transferrina que tiene un metal capaz de unirse a los sitios de unión del metal. La transferrina es una glucoproteína (peso molecular de aproximadamente 80 kDa) que se une firme y reversiblemente al hierro y contiene dos sitios de unión de gran afinidad al hierro Fe (III), entre ellos, transferrina humana, transferrina bovina y serotransferrina, lactotransferrina, ovotransferrina y melanotransferrina; incluidas sus variantes y derivados, como variantes de transferrina genética o químicamente modificadas. La transferrina utilizada en esta invención puede provenir de cualquier fuente disponible familiar para los expertos en la técnica, como, entre otros, transferrina derivada de plasma y transferrinas recombinantes tales como transferrina humana recombinante (p. ej., CellPrime rTransferrin AF y CellPrime rTransferrin AF-S (Millipore Corporation, Billerica, MA); Optiferrin™ (InVitria, Fort Collins, CO)).

Las metal-transferrinas se pueden preparar poniendo en contacto apo-transferrina con una sal o complejo de coordinación de metal que comprende un ion metálico capaz de unirse a los sitios de unión al metal en la transferrina. Los ejemplos de metales capaces de unirse a los sitios de unión al metal en la transferrina incluyen, aunque sin limitarse a ello, hierro, galio, indio, manganeso y platino. Las sales y complejos de coordinación de metales incluyen, aunque sin limitarse a ello, sales o complejos de coordinación de Fe(II), Fe(III), Ga(III), In(III), Mn(II), Mn(III) y Pt(II), tales como, entre otros, cisplatino (cis-diaminadicloroplatino (II)), PtCl₂, acetato de platino (II), acetilacetato de platino (II) (Pt(acac)₂), FeCl₃, FeBr₃, Fe(NO₃)₃, Fe₂(SO₄)₃, MnCl₂, MnBr₂, MnCO₃, MnSO₄, GaCl₃, GaBr₃, GaI₃, Ga(NO₃)₃, Ga(ClO₄)₃, Ga₂(SO₄)₃, InCl₃, InBr₃, InI₃, In(NO₃)₃, In(ClO₄)₃ e In₂(SO₄)₃. En una realización, la metal-transferrina es galio-transferrina, y la sal o el complejo de coordinación de sal es nitrato de galio. En una realización la metal-transferrina es platino-transferrina, y la sal o el complejo de coordinación de sal es cisplatino. En una realización, la metal-transferrina es hierro-transferrina, y la sal o el complejo de coordinación de metal es FeCl₃.

La metal-transferrina de la invención es galio-transferrina, hierro-transferrina, indio-transferrina, zinc-transferrina, manganeso-transferrina, platino-transferrina, o una mezcla de estos. El término "taxano o taxoide", tal como se emplea en la presente memoria, significa compuestos que contienen diterpeno producidos por las plantas del género Taxus (p. ej., tejos, entre ellos, Taxus baccata, Taxus brevifolia, Taxus canadensis, Taxus chinensis, Taxus cuspidata, Taxus floridana, Taxus globosa, Taxus sumatrana, Taxus wallichiana), y sus formas sintéticas y semi-sintéticas. Los taxanos o los taxoides de la invención son paclitaxel y docetaxel. En general, dichos compuestos pueden bloquear el crecimiento de las células, deteniendo la mitosis al interferir con los microtúbulos. El término "diterpeno", tal como se emplea en la presente memoria, significa compuestos químicos que tienen un esqueleto de carbono derivado de unidades de isopreno (es decir, un esqueleto de carbonos C₂₀). Los ejemplos de diterpenos incluyen, aunque sin limitarse a ello, taxadieno,



El taxol es paclitaxel, docetaxel, o mezclas de estos. En otra realización, el taxol es paclitaxel. En otra realización, el taxol es docetaxel.

5 La expresión "tensoactivo no iónico", tal como se emplea en la presente memoria, significa una sustancia que reduce la tensión superficial del medio en el que se disuelve, y/o la tensión interfacial con otras fases y, por consiguiente, se adsorbe positivamente en líquido/vapor y/o en otras interfaces. Los ejemplos de tensoactivos no iónicos incluyen, entre otros, alquil poli(etileno óxido)s etoxilado, alquilfenol poli(etileno óxido)s, copolímeros de poli(etileno óxido) y poli(propileno óxido) (p. ej., poloxámeros tales como los productos BASF PLURONIC®), alquil poliglucósidos (p. ej., octil glucósido o decil maltósido), alcoholes grasos (p. ej., alcohol cetílico, alcohol oleílico) y polisorbatos. Otros ejemplos de tensoactivos no iónicos incluyen, entre otros, 8-metil-1-nonanol propoxilato-*bloque*-etoxilato, ALKANOL® 6112, alcohol alílico 1,2-butoxilato-*bloque*-etoxilato, Brij® 30, Brij® 52, Brij® 72, Brij® 78, Brij® 92V, Brij® 93, Brij® 97, Brij® 98, Brij® 010, Brij® S100, Brij® S10, Brij® 58, IGEPAL® CA-210, IGEPAL® CA-520, IGEPAL® CA-720, IGEPAL® CO-210, IGEPAL® CO 520, IGEPAL® CO-630, IGEPAL® CO-890, IGEPAL® DM-970, MERPOL® A, MERPOL® DA, MERPOL® HCS, MERPOL® OJ, MERPOL® SE, MERPOL® SH, polietileno-*bloque*-poli(etilenglicol), polioxietileno tridecil éter, polioxietileno sorbitán tetraoleato, polioxietileno sorbitol hexaoleato, sorbitán monopalmitato, TWEEN® 20, TWEEN® 40, TWEEN® 60, TWEEN® 85, Tergitol® NP-9, Triton® N-101, Triton® SP-135, Triton® X-100, Triton® X-114, Triton® X-405, Triton® X-100, Zonyl® FS-300, Zonyl® FSA, Zonyl® FSE, Zonyl® FSJ, Zonyl® FSK, Zonyl® FSN, Zonyl® FSN-100, Zonyl® FSO, Zonyl® FSO-100, Cremophor® A25, Cremophor® A6 y Cremophor® EL. En una realización, el tensoactivo no iónico comprende aceite de ricino etoxilado, como Cremophor® EL.

25 El término "alcohol", tal como se emplea en la presente memoria, significa un compuesto de la fórmula $R(-OH)_n$, en donde R es un grupo alquilo C₁₋₁₀, y n es 1, 2 o 3. Cuando n es 1, los ejemplos de alcoholes incluyen, aunque sin limitarse a ello, metanol, etanol, butanol, propanol, hexanol, octanol y decanol. Cuando n es 2, los ejemplos de alcoholes incluyen, entre otros, etilenglicol y propilenglicol. Cuando n es 3, los ejemplos de alcoholes incluyen, entre otros, glicerol.

30 El término "alquilo", tal como se emplea en la presente memoria, significa un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene entre 1 y 10 átomos de carbono, a menos que se especifique otra cosa. Los ejemplos representativos de alquilo incluyen, aunque sin limitarse a ello, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo y n-decilo. En determinadas realizaciones, el alcohol es metanol, etanol, isopropanol o n-propanol. En otra realización, el alcohol es metanol o etanol. En otra realización, el alcohol es etanol.

40 Luego el pH de la tercera disolución acuosa se ajusta entre 7,9 y 8,3. Esto se puede lograr añadiendo una base. En una realización, la base es una base de hidróxido. Los ejemplos de bases de hidróxido adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a ello, hidróxido sódico, hidróxido de potasio, hidróxido de litio, hidróxido de rubidio, hidróxido de cesio, hidróxido de calcio, hidróxido de estroncio, hidróxido de bario, o mezclas de estos. En otra realización, la base de hidróxido es hidróxido de sodio. La temperatura de la tercera disolución acuosa se puede mantener a una temperatura entre aproximadamente 27 °C y 35 °C; o aproximadamente 29 °C y 33 °C mientras que el pH está siendo ajustado.

45 Finalmente, la tercera disolución acuosa con el pH ajustado se purifica para eliminar solutos que tienen un peso molecular inferior a 10.000 Da. Dicha purificación puede ser de acuerdo con cualquiera de los métodos familiares para el experto en la técnica. Por ejemplo, en una realización, la tercera disolución con pH ajustado se purifica por diálisis contra una disolución tampón usando una membrana de diálisis que tiene un valor de corte del peso de 10.000 Da. La disolución tampón puede comprender cualquier tampón adecuado para administración a un paciente, como, de manera no taxativa, disoluciones salinas balanceadas fisiológicas estériles que tienen un pH fisiológico y una concentración de sal. Dichas disoluciones pueden incluir iones tales como sodio, potasio, calcio, magnesio y cloruro, y componentes adicionales tales como glucosa. Los ejemplos de disoluciones salinas balanceadas fisiológicas incluyen disolución de Alsever, disolución salina balanceada de Earle (EBSS), disolución salina balanceada de Gey (GBSS), disolución salina balanceada de Hank (HBSS), disolución salina tamponada con fosfato (Dulbecco's) (PBS), disolución salina balanceada de Puck, disolución salina balanceada de Ringer (RBSS), disolución salina balanceada de Simm (SBSS), disolución salina tamponada con TRIS (TBS) y disolución salina balanceada de Tyrode (TBSS). En una realización, la disolución tampón es disolución salina balanceada de Hank. La diálisis se puede repetir múltiples veces. En una realización, la diálisis se puede repetir por lo menos dos veces, reemplazando la disolución de diálisis externa con disolución fresca.

60

Opcionalmente, la tercera disolución con pH ajustado se puede esterilizar por filtración para proveer una composición esterilizada por filtración de la invención. En una realización, la disolución se puede pasar por un filtro que tiene un diámetro de poro promedio de aproximadamente 0,2 micrómetros a aproximadamente 0,5 micrómetros. Por ejemplo, la disolución se puede esterilizar pasando por un filtro de 0,45 micrómetros. En otro ejemplo, la disolución se puede esterilizar pasando por un filtro de 0,22 micrómetros.

Además, y opcionalmente, la tercera disolución acuosa con el pH ajustado, la tercera disolución con pH ajustado purificada o la composición esterilizada pueden a su vez purificarse por cromatografía de exclusión de tamaño de acuerdo con métodos conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, la disolución o composición puede además purificarse por cromatografía en columna usando una fase de cromatografía de exclusión de tamaño adecuada, como Sephadex (un gel de dextrano reticulado, p. ej., G-10 Sephadex), y usando un diluyente farmacéuticamente aceptable como eluyente para la columna. El eluyente puede ser cualquiera de las disoluciones salinas balanceadas fisiológicas estériles anteriormente mencionadas. En un ejemplo, el eluyente es PBS. Según sea necesario, cualquier disolución eluida de la columna se puede esterilizar con filtro como se describió previamente.

En determinadas realizaciones, una primera disolución acuosa comprende una metal-transferrina; y una segunda disolución comprende paclitaxel; un tensioactivo no iónico; y un alcohol. En determinadas realizaciones, una primera disolución acuosa comprende una metal-transferrina; y una segunda disolución comprende paclitaxel; un tensioactivo no iónico; y etanol. En ciertas otras realizaciones, una primera disolución acuosa comprende una metal-transferrina; y una segunda disolución comprende paclitaxel; Cremophor® EL; y etanol. En ciertas otras realizaciones, una primera disolución acuosa comprende una galio-transferrina; y una segunda disolución comprende paclitaxel; Cremophor® EL; y etanol.

Otro aspecto da a conocer una composición preparada de acuerdo con los métodos precedentes y cualquiera de sus realizaciones. Sin desear estar influenciados por ninguna teoría de estructura u operación, la composición precedente consiste esencialmente en una metal-transferrina, un taxano o un taxoide, y un diluyente farmacéuticamente aceptable, en donde el taxano o el taxoide se une con la proteína mediante un enlace directo entre el taxano o el taxoide y la proteína. El taxano o taxoide se une con una proteína mediante un enlace directo entre el taxano o taxoide y la proteína. La metal-transferrina es galio-transferrina, hierro-transferrina, indio-transferrina, zinc-transferrina, manganeso-transferrina, platino-transferrina, o una mezcla de estos. En una realización particular, la metal-transferrina es galio-transferrina.

En cualquiera de las realizaciones precedentes, el taxano o el taxoide es paclitaxel o docetaxel. En otra realización, el taxano o el taxoide es paclitaxel. En otra realización, el taxano o el taxoide es docetaxel.

En cualquiera de las realizaciones precedentes, el taxano o el taxoide se une a la metal-transferrina a través de un enlace directo entre el taxano o el taxoide.

Métodos de uso

En otro aspecto, la presente descripción da a conocer métodos para tratar un cáncer en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición preparada o como se describió anteriormente.

En una realización, el cáncer que se está tratando es un sarcoma, un linfoma, una leucemia, un melanoma, un mieloma múltiple, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de cerebro, cáncer ginecológico, tumores sólidos pediátricos, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon o cáncer de pulmón. En otra realización, el cáncer que se está tratando es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon o cáncer de pulmón. En otra realización, el cáncer que se está tratando es cáncer de mama. En otra realización, el cáncer que se está tratando es cáncer de ovario. En otra realización, el cáncer que se está tratando es cáncer de colon. En otra realización, el cáncer que se está tratando es cáncer de pulmón.

Tal como se emplean en esta memoria, los términos "tratamiento" y "tratar" significan (i) prevenir la enfermedad; por ejemplo, prevenir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad, afección o trastorno pero que aún no experimenta ni exhibe la patología o la sintomatología de la enfermedad; (ii) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que experimenta o exhibe la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno; (iii) mitigar el estado de enfermedad mencionado, por ejemplo, mitigar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que experimenta o exhibe la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, revertir o mejorar la patología y/o sintomatología) tal como disminuyendo la gravedad de la enfermedad; o (iv) produciendo el efecto biológico mencionado.

Tal como se emplea en la presente memoria, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que produce la respuesta biológica o medicinal que busca un investigador,

veterinario, médico u otro profesional de la medicina en un tejido, sistema, animal, individuo o ser humano, lo que incluye uno o más de los siguientes: (1) prevenir la enfermedad; por ejemplo, prevenir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que pueda estar predispuesto a la enfermedad, afección o trastorno pero que todavía no experimente ni exhiba la patología o sintomatología de la enfermedad; (2) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibiendo una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que experimenta o exhibe la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno; y (3) mitigar la enfermedad; por ejemplo, mitigar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que experimenta o exhibe la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, revertir la patología y/o sintomatología) como reducir la gravedad de la enfermedad.

Tal como se emplean en la presente memoria, los términos "individuo" o "paciente", utilizados de manera intercambiable, hacen referencia a cualquier animal, incluidos mamíferos, preferiblemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, cerdos, bovinos, ovejas, caballos o primates, y lo más preferiblemente seres humanos.

Tal como se emplea en la presente memoria, un sujeto "que lo necesita" se refiere a un sujeto que presenta el trastorno o la enfermedad que se ha de tratar, o que está predispuesto a contraer la enfermedad o el trastorno.

Ejemplos

Ejemplo 1 Preparación de una composición de Paclitaxel-Galio-Transferrina (PGT)

Se preparó galio-transferrina (Ga-tf) para uso en la preparación de Paclitaxel-Galio-Transferrina (PGT). Ga-tf se preparó disolviendo 500 mg de transferrina humana (Sigma Aldrich; St. Louis, MO) en 9,0 ml de tampón de ácido acético (ácido acético 20 mM que contenía NaCl 150 mM, pH 3,5). A la disolución que contenía transferrina se le añadió 1,0 ml de una disolución que contenía 38,6 mg de nitrato de galio en 5,0 ml de tampón de ácido acético. Se elevó lentamente el pH hasta 7,4 usando NaHCO_3 1M.

La disolución final se incubó durante dos días a 4 °C. Después de la incubación, la disolución se dializó, valor de corte m.w. de 10.000) contra 500 ml de disolución salina balanceada de Hank (HBSS) durante la noche, dos veces. La mezcla se esterilizó filtrando (filtro de 0,45 micrómetros) y se conservó a 4 °C.

Se usaron las siguientes etapas para combinar paclitaxel con Ga-tf. La temperatura de todos los compuestos se mantuvo a 31 °C durante toda la reacción. Primero, se dispusieron 4 ml de Cremophor EL (Sigma Aldrich; St. Louis, MO) en un tubo centrífugo de vidrio. Luego se añadieron 25 mg de Paclitaxel de *Taxus yannanensis* (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) a CremophorEL. Se utilizaron cuatro milímetros de etanol para lavar el paclitaxel de la ampolla. El tubo centrífugo se dispuso en una placa caliente de agitación y la temperatura se mantuvo a 31°C. En un tubo centrífugo separado se mezclaron 1,75 ml de tampón de fosfato y 2,25 ml de Ga-tf (de arriba). La mezcla de paclitaxel-alcohol-Cremophor EL se añadió luego gota a gota a la mezcla de Ga-tf mientras se mantenía en la placa de agitación. Después de añadir paclitaxel-alcohol-Cremophor EL, se añadió NaOH gota a gota para llevar el pH de la mezcla entre 7,9 y 8,3. El compuesto se agitó durante la noche y luego se dializó (valor de corte m.w. de 10.000) durante la noche en HBSS, dos veces. El compuesto final se esterilizó por filtración (filtro de 0,45 micrómetros) y se conservó a 4°C.

Método para cromatografía en columna:

Se empleó cromatografía de exclusión de tamaño para separar el paclitaxel no unido del Paclitaxel-Galio-Transferrina (PGT). Se separó la parte superior de una pipeta serológica de 10 ml y se usó como una columna. Se empujó una pequeña pelota de lana de vidrio hacia el fondo de la columna. La columna se conectó a un soporte con aro y se lavó con 20 ml de disolución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS), pH 7,4. Se añadieron 5 g de G-10 Sephadex seco (valor de corte de peso molecular de 700) a 10 ml de PBS y se dejó expandir durante la noche a temperatura ambiente. Después de la expansión completa, se extrajeron las partículas finas por aspiración. Después se añadieron 2,25 ml de PBS a Sephadex expandido para formar una lechada al 75%. La lechada se añadió a la columna y se dejó empaquetar por gravedad. La columna se lavó con 20 ml de PBS. Se añadió 1 ml de PGT a la columna y se inició la recolección de las fracciones. Se añadió continuamente PBS a la columna y se recogieron 20 fracciones de 1 ml. Se realizó el análisis espectral de las fracciones de cromatografía de exclusión de tamaño en un espectrofotómetro Beckman DU-6 UVVisible. Se efectuó la absorción de luz a 230 nm para paclitaxel y 280 nm para cada proteína transferrina en cada fracción. Los resultados de la separación cromatográfica se exponen en la Figura 1.

Ejemplo 2 Citotoxicidad de PGT en cultivo celular

Se obtuvieron líneas de células cancerosas humanas de American Type Culture Collection (Rockville, MD); la línea de células NCI/Adr-Res provino del National Cancer Institute (Bethesda, MD). Las líneas de células cancerosas se mantuvieron en alfa-MEM enriquecido con 10% suero de ternero fetal, glutamina 1 mM y 0,05 mg/ml gentamicina (Life Technologies, Inc., Frederick, MD) en 5% CO_2 a 37 °C. Las células se eliminaron del matraz de cultivo celular o de la placa por digestión de tripsina-EDTA (0,05% tripsina y EDTA 0,53 mM EDTA).

Se midió el crecimiento celular con un ensayo de incorporación de ^3H -timidina. Las células cancerosas se dispusieron en placas en cada pocillo de una placa de cultivo celular de 96 pocillos como se observa en la Tabla 2 (p. ej., las células MCF-7 se dispusieron en placas a 3000 células/pocillo) y se incubaron durante la noche. El medio de cultivo se reemplazó con medio que contenía concentraciones en aumento de fármacos basados en transferrina, y las células se incubaron con estos fármacos durante 3 días. Luego se añadió ^3H -timidina (0,1 uCi/pocillo) a cada pocillo durante las últimas 16 horas de incubación. Las células se eliminaron de la placa por digestión de tripsina-EDTA y se cosecharon en un filtro de fibra de vidrio (Skatron basic96 Harvester, Shatron Inc., Sterling, VA). La radiactividad incorporada en el ADN celular se determinó por recuento de centelleo líquido (LS 6500, Beckman Co., Fullerton, CA). La proliferación celular se cuantificó por incorporación de ^3H -timidina y se expresó como porcentaje del control no tratado. Los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces en forma independiente.

La Tabla 1 ilustra la inhibición de células MCF-7 usando varias metal-transferrinas conjugadas a un taxano mediante una reacción de glutaraldehído, no de acuerdo con la invención. En contraste, la Tabla 2 expone la inhibición de distintas líneas de células cancerosas usando la composición de PGT anteriormente descrita. En particular, se puede observar que para células de cáncer de mama MCF-7, la composición de PGT del taxano o taxoide exhibe un valor CI_{50} de $4,5 \times 10^{-13}$ M mientras que el paclitaxel conjugado a galio-transferrina (Ga-tf) mediante una reacción de glutaraldehído presenta un valor CI_{50} de $3,8 \times 10^{-11}$ M.

Tabla 1 (no de acuerdo con la invención).

Inhibición de células MCF-7 por agentes quimioterapéuticos basados en transferrina

Metal - Transferrina CI_{50} de fármacos unidos por una reacción de glutaraldehído a la superficie de la transferrina (M)

	Ningún fármaco	Daunorrubicina	Doxorrubicina	Paclitaxel
Fe-tf	-----	$2,2 \times 10^{-7}$	$6,8 \times 10^{-9}$	$5,4 \times 10^{-11}$
Ga-tf	$3,4 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-10}$	$3,8 \times 10^{-11}$
In-tf	$2,7 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^{-8}$	-----	$2,0 \times 10^{-10}$

Tabla 2. Inhibición de líneas celulares por PGT

	Línea celular	Células/Pocillo	CI_{50}	CI_{90}
MCF-7	Cáncer de mama	3000	$3,6 \times 10^{-18}$ (n = 16)	$5,8 \times 10^{-12}$ (n = 16)
TOV-112D	Cáncer de ovario	3000	$7,5 \times 10^{-16}$ (n = 5)	$2,1 \times 10^{-14}$ (n = 5)
NCI/Adr-Res	Cáncer de ovario	3000	$6,8 \times 10^{-9}$ (n = 3)	$5,1 \times 10^{-8}$ (n = 3)
SW480	Cáncer de colon	1500	$1,6 \times 10^{-13}$ (n = 5)	$9,9 \times 10^{-9}$ (n = 5)
NCI-H1650	Cáncer de pulmón	3000	$7,3 \times 10^{-16}$ (n = 3)	$2,5 \times 10^{-11}$ (n = 3)

Ejemplo 3 Reversión con transferrina cargada de hierro:

Se preparó transferrina cargada con hierro (Fe-tf) para experimentos competitivos con PGT. Se preparó Fe-tf disolviendo 500 mg de transferrina humana (Sigma Aldrich; St. Louis, MO) en 9,0 ml de tampón de ácido acético (ácido acético 20 mM que contenía NaCl 150 mM, pH 3,5). A la disolución que contenía transferrina se le añadió 1,0 ml de una disolución que contenía 30,0 mg de cloruro férrico en 10,0 ml de tampón de ácido acético. Se elevó lentamente el pH hasta 7,4 usando NaHCO_3 1 M. La disolución final se incubó durante dos días a 4 °C. Después de incubar la disolución se dializó (valor de corte m.w. de 10.000) contra 500 ml de disolución salina balanceada de Hank (HBSS) durante la noche, dos veces. La mezcla se esterilizó por filtración (filtro de 0,45 micrómetros) y se conservó a 4 °C.

Se extrajeron células de cáncer de mama MCF-7 humanas de un matraz de cultivo celular por digestión con tripsina-EDTA (0,05% tripsina y EDTA 0,53 mM). Las células cancerosas (células MCF-7 a 3000 células/pocillo) se dispusieron en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Se reemplazó el medio de cultivo que contenía concentraciones en aumento de PGT o PGT con Fe-tf añadido a 10 y 100 veces la concentración de PGT. Las células se incubaron con estos fármacos durante 3 días. Se midió el crecimiento celular con un ensayo de incorporación de ^3H -timidina. Después de añadir ^3H -timidina (0,1 uCi/pocillo) a cada pocillo durante las últimas 16 horas de incubación, las células se extrajeron de la placa por digestión de tripsina-EDTA y se cosecharon en un filtro de fibra de vidrio (Skatron basic96 Harvester, Shatron Inc., Sterling, VA). La radiactividad incorporada al ADN celular se determinó por recuento de centelleo líquido (LS 6500, Beckman Co., Fullerton, CA). La proliferación celular se cuantificó por incorporación de ^3H -timidina y se expresó como porcentaje del control no tratado. Los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces en forma independiente.

Tabla 3. Inhibición competitiva del receptor de transferrina con Paclitaxel-Galio-Transferrina (PGT) y Hierro-Transferrina (Fe-Tf) en la línea celular de cáncer de mama MCF-7

	CI_{50}
PGT	$7,20 \times 10^{-16}$ M
PGT y 10X FeTf	$2,07 \times 10^{-15}$ M
PGT y 100X FeTf	$5,88 \times 10^{-14}$ M

Ejemplo 4 (no de acuerdo con la invención) Paclitaxel-Albúmina

5 Se preparó una composición de paclitaxel-albúmina añadiendo primero 4 ml de Cremophor EL a un tubo centrífugo de fondo redondo de 50 ml y calentando el tubo hasta 31°C en un baño de agua. Se añadieron 25 mg de paclitaxel al tubo centrífugo de Cremophor EL lavando el paclitaxel con 4 ml de etanol al 95 % usando múltiples lavados con una pipeta de 1 ml. Se añadió una varilla agitadora (tamaño de una pulga) y la disolución se agitó a 31 °C hasta 10 mezclarse (aproximadamente 45-60 minutos). Después de que el paclitaxel se había disuelto en el Cremophor EL, se mezclaron 3,66 ml de tampón de fosfato 0,01 M a 7,4 pH, y 0,34 ml de albúmina (85 mg de albúmina en disolución al 25%) en otro tubo centrífugo de fondo redondo y se añadió una varilla agitadora (tamaño de una pulga). La mezcla de albúmina se calentó hasta 31°C. La mezcla de albúmina calentada se añadió gota a gota a la mezcla de paclitaxel, asegurando que cada adición se convirtiera en disolución antes de añadir la gota siguiente. Esto se hizo en un periodo de por lo menos una hora. Se dejó agitar la mezcla de paclitaxel-albúmina durante aproximadamente 15 10 minutos para asegurar que todo se mezclara (la disolución estará un poco turbia). Se vertió paclitaxel-albúmina en un vaso de precipitación pequeño con una varilla agitadora y se ensayó el pH. Luego se añadió NaOH 0,5 M gota a gota para llevar el pH de 7,3 a entre 7, 9 y 8,3, el vaso se cubrió con parafina y se agitó durante la noche. La mezcla de paclitaxel-albúmina se introdujo con pipeta en tubos de diálisis con valor de corte 10.000 m.w., los tubos de diálisis se dispusieron en 500 ml de tampón de fosfato, y se agitó durante la noche en el refrigerador, proporcionando una disolución de paclitaxel-albúmina clara sin precipitante. La diálisis se repitió dos veces en 20 25 tampón de fosfato, 24 horas cada vez a 4°C en el refrigerador. Los tubos de diálisis se desligaron suavemente con pinzas, la disolución de paclitaxel-albúmina se introdujo con pipeta en una jeringa y se esterilizó por filtración para dar 24 ml de disolución de paclitaxel-albúmina.

Ejemplo 5 (no de acuerdo con la invención) Citotoxicidad de paclitaxel-albúmina en cultivo celular

25 La composición de paclitaxel-albúmina del Ejemplo 4 se ensayó para inhibición de las líneas celulares de acuerdo con los métodos del Ejemplo 2. A continuación en la Tabla 4 se expone un resumen de los resultados, y se ilustran en la Figura 3.

30 Tabla 4. Inhibición de líneas celulares con paclitaxel-albúmina

Línea celular	Células/Pocillo	CI50	CI90	
MCF-7	Cáncer de mama	3000	4,0 x 10 ⁻¹² (n = 6)	2,1 x 10 ⁻⁰⁹ (n = 6)
OVCAR-8	Cáncer de ovario	3000	3,1 x 10 ⁻¹⁰ (n = 8)	2,3 x 10 ⁻⁰⁸ (n = 8)
NCI/Adr-Res	Cáncer de ovario	3000	4,5 x 10 ⁻⁰⁶ (n = 6)	6,9 x 10 ⁻⁰⁵ (n = 6)
35 NCI-H1650	Cáncer de pulmón	3000	1,2 x 10 ⁻¹¹ (n = 6)	2,2 x 10 ⁻⁰⁷ (n = 6)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que consiste esencialmente en (i) una proteína; (ii) un taxano o un taxoide; y (iii) un diluyente farmacéuticamente aceptable, en donde el taxano o el taxoide está unido con la proteína mediante un enlace directo entre el taxano o taxoide y la proteína;
- 10 en donde el taxano o el taxoide es paclitaxel o docetaxel;
en donde la proteína es una metal-transferrina; y
en donde la metal-transferrina es galio-transferrina, hierro-transferrina, indio-transferrina, zinc-transferrina, manganeso-transferrina, platino-transferrina, o una mezcla de estos.
- 15 2. Composición según la reivindicación 1, en donde la metal-transferrina es galio-transferrina.
3. Composición según la reivindicación 1 o 2 para uso en un método para tratar un cáncer en un paciente que necesita dicho tratamiento, proporcionando al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición.
- 20 4. Composición para uso según la reivindicación 3, en donde el cáncer es un sarcoma, un linfoma, una leucemia, un melanoma, un mieloma múltiple, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de cerebro, cáncer ginecológico, tumores sólidos pediátricos, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon o cáncer de pulmón.
- 25 5. Composición para uso según la reivindicación 4, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon o cáncer de pulmón.
- 30 6. Método para preparar una composición según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho método comprende:
combinar (A) una primera disolución acuosa que comprende una proteína; y (B) una segunda disolución que comprende (i) un taxano o un taxoide; (ii) un tensioactivo no iónico; y (iii) un alcohol, para proveer una tercera disolución acuosa;
- 35 ajustar el pH de la tercera disolución acuosa entre 7,9 y 8,3; y purificar la tercera disolución acuosa con el pH ajustado para eliminar solutos que tienen un peso molecular inferior a 10.000 Da;
en donde el taxano o el taxoide es paclitaxel o docetaxel;
en donde la proteína es una metal-transferrina; y
en donde la metal-transferrina es galio-transferrina, hierro-transferrina, indio-transferrina, zinc-transferrina, manganeso-transferrina, platino-transferrina, o una mezcla de estos.

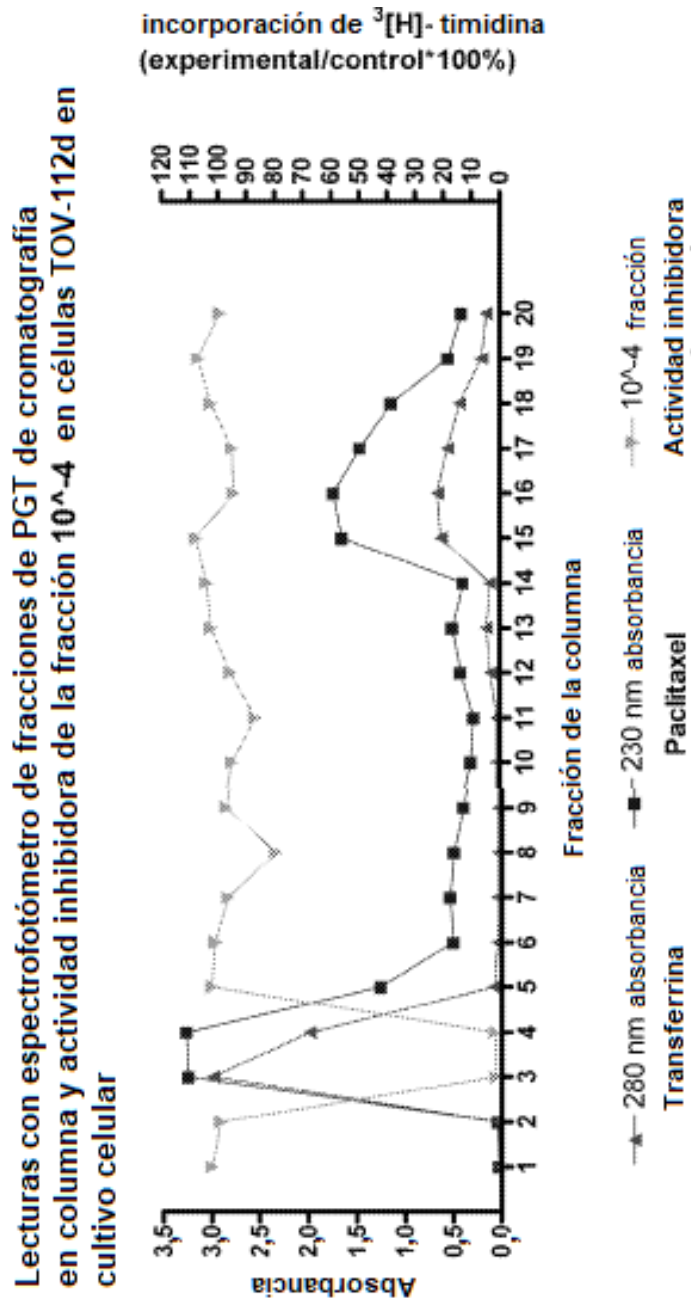


FIGURA 1

Inhibición con PGT de diversas líneas celulares neoplásicas

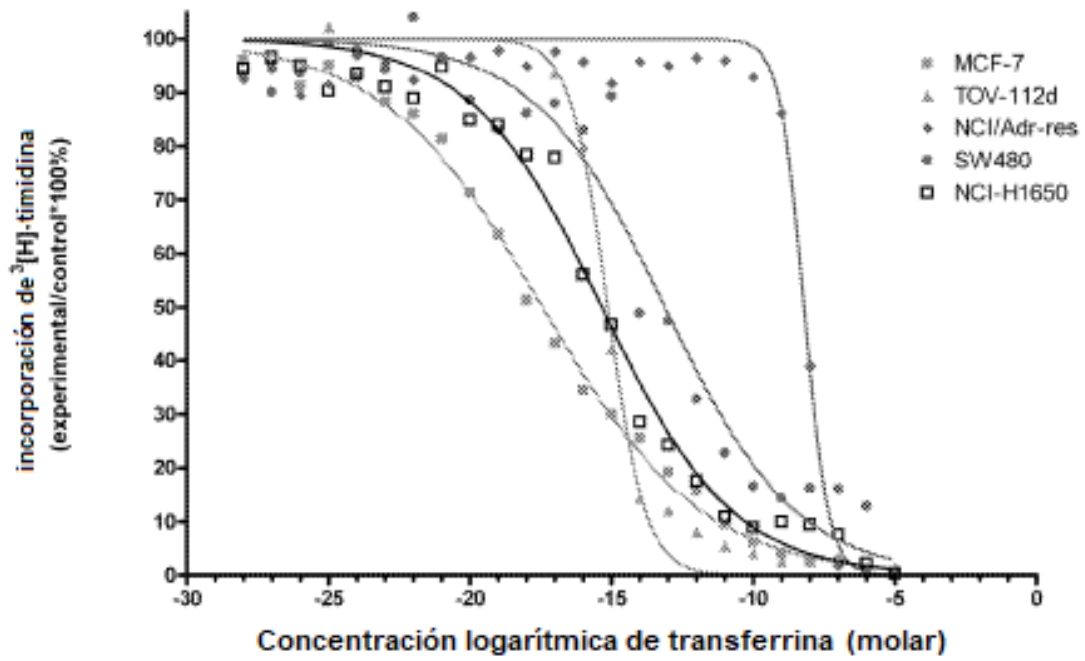


FIGURA 2

Inhibición con paclitaxel-albúmina de diversas líneas celulares neoplásicas

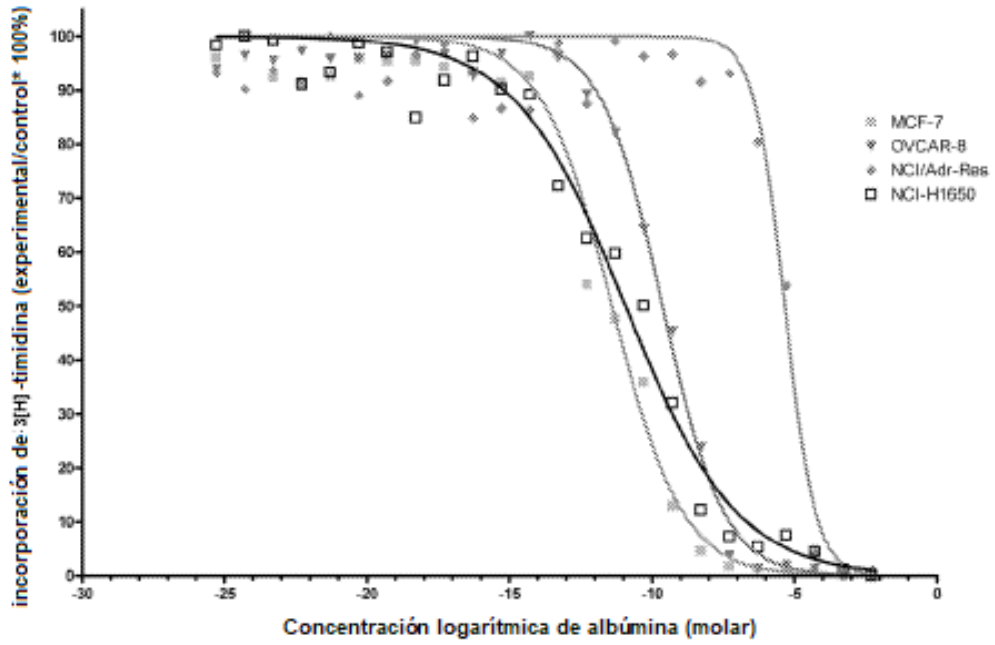


FIGURA 3