

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 986**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2009** **PCT/CA2009/001483**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.04.2010** **WO10043050**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2009** **E 09820164 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018** **EP 2344161**

54 Título: **Combinaciones de una camptotecina liposomal soluble en agua con cetuximab o bevacizumab**

30 Prioridad:
16.10.2008 US 106109 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2019

73 Titular/es:
**CELATOR PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
200 Princeton South Corporate Center, Suite 180
Ewing, NJ 08628, US**

72 Inventor/es:
**TARDI, PAUL;
MAYER, LAWRENCE y
BERMUDES, DAVID**

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 704 986 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

Combinaciones de una camptotecina liposomal soluble en agua con cetuximab o bevacizumab

Campo Técnico

5 La invención se refiere a combinaciones de agentes antitumorales dirigidos que presentan efectos mejorados contra condiciones hiperproliferativas.

Antecedentes de la técnica

10 La progresión de muchas enfermedades mortales tales como cáncer, AIDS, enfermedades infecciosas, trastornos inmunes y trastornos cardiovasculares es influenciada por múltiples mecanismos moleculares. Debido a esta complejidad, lograr curas con un solo agente ha sido encontrado con éxito limitado. De este modo, las combinaciones de agentes se han usado a menudo para combatir la enfermedad, particularmente en el tratamiento de cánceres. Parece que hay una fuerte correlación entre el número de agentes administrados y las tasas de curación para cánceres tales como leucemia linfocítica aguda y cáncer colorrectal metastásico ((Frei, et al., Clin. Cancer Res. (1998) 4:2027-2037; Fisher, M. D., Clin Colorectal Cancer (2001) Aug;1(2):85-86). En particular, los agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, camptotecinas) en combinación con otros agentes antitumorales dirigidos, tales como aquellos que inhiben la angiogénesis o que dirigen/disminuyen una actividad de la proteína o lípido quinasa, han sido usados exitosamente en el tratamiento de cánceres en la clínica.

20 La camptotecina es un alcaloide a base de quinolona encontrado en la corteza del árbol chino camptoteca y en el árbol asiático nothapodytes. Muchos derivados de camptotecina incluyen derivados semisintéticos o sintéticos, tales como topotecán e irinotecán, tienen una capacidad única para inhibir la topoisomerasa I lo que los ha convertido en agentes de destrucción celular altamente activos. La topoisomerasa I es una enzima celular responsable del enrollado y desenrollado del ADN. Si el ADN no puede ser desenrollado, entonces la transcripción del mensaje del ADN no podrá ocurrir y la proteína no será sintetizada, resultando en la eventual muerte de la célula. Las células que se dividen a rápidas velocidades, tales como las células del cáncer, son particularmente sensibles a los derivados de camptotecina dado que su ADN está constantemente siendo desenrollado con el fin de ser replicado por células hijas. En el estado abierto, el ADN es vulnerable a la inserción de fármacos de camptotecina lo que ha sido demostrado resultar en el eventual rompimiento del ADN y la muerte celular.

30 Como se describe en este documento a continuación, las combinaciones terapéuticas y composiciones de la presente invención pueden también incluir la adición de unas fluoropirimidinas tales como fluorouracilo (5-FU) o floxuridina (FUDR). El 5-FU fue introducido en ensayos clínicos aproximadamente hace 40 años; no fue hasta principios de la década de 1990 que los ensayos que implicaban combinaciones de derivados de camptotecina con análogos de pirimidina fueron investigados (Furuta, T., et al., Gan To Kagaku Ryoho (1991) Mar;18(3):393-402). Prometedores mejoras en el tratamiento del cáncer fueron encontradas mediante la administración libre de cócteles de fármacos de un número de combinaciones de pirimidina/camptotecina (véase PCT publicaciones WO/0066125 y WO/00162235). Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 6,403,569 reivindica un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración de una cantidad de sinergia de un derivado de camptotecina, 5-FU, y leucovorina (un compuesto relacionado con la vitamina ácido fólico lo que es una práctica estándar de cuidado durante el tratamiento con 5-FU), siempre que haya al menos 200 mg/m² de leucovorina.

40 A pesar de las ventajas asociadas con el uso de cócteles de fármacos de pirimidina/camptotecina, existen diversos inconvenientes que limitan su uso terapéutico. Por ejemplo, la administración libre de cócteles de fármacos a menudo resulta en rápidas eliminaciones de uno o todos los fármacos antes de llegar al sitio del tumor. Por esta razón, en muchos fármacos han sido incorporados en vehículos de liberación diseñados para "protegerlos" de mecanismos que de otra manera resultarían en su eliminación del torrente sanguíneo. Es conocido que los liposomas tienen la capacidad de mejorar este efecto "protector" y de este modo, son capaces de prolongar la vida media de los agentes terapéuticos.

45 La encapsulación de fármacos en vehículos de liberación bien diseñados puede también resultar en farmacocinéticas coordinadas de fármacos encapsulados. Los inventores actuales han identificado formulaciones particulares de vehículos de liberación requeridas para acomodar una combinación de pirimidina y derivados de camptotecina. La publicación PCT WO03/028696, asignada a Celator Pharmaceuticals, describe composiciones y métodos de administración de relaciones molares no antagónicas de dos o más agentes biológicamente activos establemente asociados con vehículos de liberación tales como liposomas, de manera que las relaciones molares favorables sean mantenidas después de la administración a un sujeto. La publicación PCT WO2004/087115 describe realizaciones particulares de tales composiciones en la que los liposomas contienen al menos una camptotecina y al menos una fluoropirimidina. Una realización particular de estos agentes se describe y ha sido conocida como CPX-1. Esta realización particular ha tenido éxito en ensayos clínicos.

55 Kim et al., Clin. Cancer Res. (2006) 12(2):600-607 describe que Cetuximab® e irinotecán interaccionan sinérgicamente para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de carcinoma anaplásico ortotopico de tiroides en ratones desnudos y que tales combinaciones de agentes proporcionan un tratamiento mejorado para el cáncer colorrectal refractario a irinotecán.

Se ha encontrado ahora que complementando dichas composiciones liposomales como se describió anteriormente con agentes antitumorales dirigidos mejora sus efectos terapéuticos. Esto es sorprendente, dado que se pensaba que la presencia de estos agentes antitumorales dirigidos inhibiría la captación de liposomas de la vasculatura y de este modo, anularía parcialmente el efecto de la formulación liposomal.

5 Divulgación de la Invención

Las combinaciones y composiciones fundamentales de la presente invención son útiles para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas. Las enfermedades hiperproliferativas son generalmente cáncer y/o cualquier metástasis. Las combinaciones y composiciones fundamentales de la presente invención son particularmente útiles en el tratamiento de tumores colorrectales.

- 10 Las realizaciones de las combinaciones y composiciones fundamentales de la presente invención permiten la administración de cantidades efectivas de un agente antitumoral antiangiogénico dirigido junto con combinaciones de los fármacos fluoropirimidina/camptotecina usando vehículos liposomales que están establemente asociados con al menos una fluoropirimidina y una camptotecina soluble en agua en una proporción no antagonista. (En otras realizaciones, solamente la camptotecina liposomal y el agente antitumoral dirigido son usados). Las composiciones liposomales de
- 15 camptotecina/fluoropirimidina permiten que la camptotecina y fluoropirimidina sean liberados al sitio de la enfermedad de una manera coordinada, y asegurando así que estos agentes estarán presentes en el sitio de la enfermedad en una proporción deseada. Este resultado será alcanzado si los agentes son coencapsulados en liposomas, o están encapsulados por separado y administrados de tal forma que las proporciones deseadas sean mantenidas en el sitio de la enfermedad. Las farmacocinéticas (PK) de la composición están controladas por los mismos liposomas de tal forma
- 20 que la liberación coordinada sea alcanzada (siempre que la PK de los sistemas de liberación sean comparables).

De este modo, en un aspecto, la invención está dirigida a una combinación de

a) primeros liposomas establemente asociados con al menos una camptotecina soluble en agua; y

- b) un agente antitumoral anti angiogénico dirigido el cual es un compuesto que disminuye o inhibe la actividad de un receptor tirosina quinasa de la familia de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o que inhibe la actividad de un
- 25 receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o que se une al VEGF;

para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto. En realizaciones preferidas los liposomas están establemente asociados con una fluoropirimidina y con dicha camptotecina, en la que la relación molar de la camptotecina a la fluoropirimidina es no antagonista. En una de tales realizaciones, dichos primeros liposomas comprenden además una fluoropirimidina, en la que la relación molar de dicha camptotecina a dicha fluoropirimidina es no antagonista, y la

30 camptotecina y fluoropirimidina están establemente asociadas con dichos primeros liposomas. En otra realización, la combinación incluye además una fluoropirimidina establemente asociada con segundos liposomas, en la que la relación molar de dicha fluoropirimidina y dicha camptotecina soluble en agua es no antagonista, y la farmacocinética de dichos primeros y segundos liposomas están coordinados.

En otros aspectos, la invención está dirigida a una composición que comprende

- 35 (a) liposomas asociados con al menos una camptotecina soluble en agua; y

(b) un agente antitumoral anti angiogénico dirigido el cual es un compuesto que disminuye o inhibe la actividad de un receptor tirosina quinasa de la familia de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o que inhibe la actividad de un receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o que se une al VEGF;

para uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto.

- 40 Como se describe en este documento a continuación, en una realización preferida, el diseño de una apropiada combinación para incluir una camptotecina liposomal soluble en agua y una fluoropirimidina liposomal, la camptotecina soluble en agua y fluoropirimidina están presentes en una proporción no antagonista en un amplio intervalo de concentración. Los métodos y criterios para su determinación están descritos en detalle en el documento WO03/028696, *supra*. Las formulaciones liposomales apropiadas son diseñadas de manera que ellas incorporen establemente una
- 45 cantidad efectiva de una combinación de una fluoropirimidina/ camptotecina soluble en agua y permitan la liberación coordinada de ambos fármacos *in vivo*. Esto también se describe en el documento WO03/028696. Las formulaciones preferidas contienen al menos un lípido cargado negativamente, tal como fosfatidilglicerol, y contiene al menos un esteroide, tal como colesterol.

Breve descripción de los dibujos

- 50 La figura 1A es una gráfica de la eficacia de Cetuximab® (cuadrados), irinotecán (triángulos) o una combinación de Cetuximab® e irinotecán (círculos) cuando se administra a ratones con xenoinjertos de colon humano DLD-1.

La figura 1B es una gráfica de la eficacia de Cetuximab® (cuadrados), irinotecán liposomal (triángulos) o una combinación de Cetuximab® e irinotecán liposomal (círculos) cuando se administra a ratones con xenoinjertos de colon humano DLD-1.

5 La figura 2A es una gráfica de la eficacia de bevacizumab (cuadrados), CPX-1 (triángulos) o una combinación de bevacizumab y CPX-1 administrada concurrentemente (círculos) cuando se administra a ratones con xenoinjertos de colon humano LS174T.

La figura 2B es una gráfica de la eficacia de bevacizumab (cuadrados), CPX-1 (triángulos) o una combinación de bevacizumab y CPX-1 cuando dos inyecciones de bevacizumab son dadas antes de una dosis de CPX-1 (círculos) a ratones con xenoinjertos de colon humano LS174T.

10 Modos de realización de la invención

Como fue indicado anteriormente en este documento, la invención proporciona combinaciones y composiciones para uso en el tratamiento de un cáncer en el que un agente antitumoral anti angiogénico dirigido es administrado en combinación con liposomas establemente asociados con al menos una camptotecina soluble en agua, y en algunas realizaciones, en combinación adicional con liposomas establemente asociados con al menos una fluoropirimidina en una proporción no antagonista a la camptotecina.

15 En realizaciones en las que al menos una camptotecina soluble en agua y al menos una fluoropirimidina están "establemente asociadas" con liposomas, "establemente asociadas" significa que la relación de estos agentes que se van a administrar a un sujeto se mantiene en la sangre del sujeto por al menos una hora después de la administración. Esto en contraste a la administración de cocteles de fármacos libre en la que la proporción inevitablemente será alterada después de la administración. Por lo general, la proporción no variara en más de un 5 % durante este tiempo.

20 Por una proporción "no antagonista" se entiende que cuando esta proporción esta provista para células cancerosas relevantes a un cáncer en un sujeto en un ensayo *in vitro*, la combinación es no antagonista en un intervalo de concentración en el cual la fracción de células afectadas sea de 0.20-0.80 en al menos el 20% de este intervalo. En general, para camptotecinas y fluoropirimidinas, la relación molar apropiada es del orden 1:1.

25 Cuando las combinaciones de camptotecinas y fluoropirimidinas son empleadas, ellas pueden estar establemente asociadas con los mismos liposomas – esto es, coencapsuladas, o pueden estar establemente asociadas con liposomas preparados por separado, siempre que la farmacocinética sea controlada en una manera tal que la proporción se mantenga como se estableció anteriormente.

30 De este modo, en una realización, la combinación para uso en el tratamiento de un cáncer concierne a liposomas establemente asociados con una camptotecina soluble en agua los cuales también deben ser administrados a un sujeto con un agente antitumoral anti angiogénico dirigido. La camptotecina liposomal y el agente antitumoral dirigido pueden ser administrados en la misma composición, en composiciones separadas al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden. De este modo, la camptotecina liposomal puede ser administrada primero y el agente antitumoral dirigido de segundo o viceversa. Además, dosis múltiples de cada uno de ellos puede ser suministrada. De este modo, 35 la camptotecina liposomal puede ser administrada primero, el agente antitumoral dirigido de segundo, y después seguido de otra administración de camptotecina. Cualquiera de estos eventos de dosificación puede ser repetidos según sea necesario. El mismo número de eventos de dosificación para cada uno de los fármacos en la combinación no necesariamente debe ser el mismo.

40 Comentarios similares aplican a la administración de la combinación de camptotecina y fluoropirimidina establemente asociados con liposomas y otro agente antitumoral anti angiogénico dirigido. Por lo general, sin embargo, la composición establemente asociada de camptotecina/fluoropirimidina es coadministrada.

Aunque generalmente, solo una camptotecina única y una fluoropirimidina única se usan, también se pueden emplear mezclas de cada uno de estos elementos. En general, el uso de los términos tales como "un" y "una" puede indicar uno o más de uno.

45 Camptotecinas solubles en agua

40 Casi todas las camptotecinas de origen natural son poco solubles en agua; esta propiedad hace de ellas difíciles y en muchos casos, imposibles para formular y administrar. Como resultado, muchas camptotecinas comercializadas o en desarrollo han sido hechas solubles en agua. Las camptotecinas solubles en agua incluyen aquellos derivados de camptotecina que están cargados a pH fisiológico. Por ejemplo, la solubilidad en agua mejorada se ha logrado efectivamente a través de la adición de un grupo hidroxilo hidrófilo o un grupo nitró en las posiciones 9, 10 u 11 del anillo de la camptotecina A. Del mismo modo, la adición de un grupo dimetilaminometil cargado positivamente en la posición 9 ha demostrado la solubilidad en agua mejorada.

Los derivados de camptotecina solubles en agua han mostrado un amplio espectro de actividad contra tumores humanos. Debido a esto the United States Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado formulaciones de camptotecina solubles en agua de irinotecán, topotecán y lurtotecán para uso clínico en humanos. Se piensa que la actividad antitumoral demostrada con irinotecán se produce a través de su metabolito, SN-38.

- 5 Las "camptotecinas solubles en agua" en el contexto de la presente invención se refiere a derivados de camptotecina o formulaciones de las mismas que son suficientemente solubles en agua. Las camptotecinas solubles en agua incluyen, pero no están limitadas a, irinotecán, SN-38, topotecán, 9-aminocamptotecina, lurtotecán y profármacos, precursores, productos metabólicos de estos fármacos; así como sales hidrófilas derivadas de camptotecinas insolubles en agua tales como la sal sódica del compuesto original, camptotecina. Preferiblemente, la camptotecina soluble en agua para
10 uso en esta invención es irinotecán, topotecán, 9-aminocamptotecina o lurtotecán. Más preferiblemente, la camptotecina soluble en agua es irinotecán.

Agentes antitumorales antiangiogénicos dirigidos

- Los "agentes antitumorales antiangiogénicos dirigidos" en el contexto de la presente invención se refiere a compuestos que dirigen, disminuyen o inhiben la actividad de un receptor tirosina quinasa de la familia de factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4 como homo o heterodímeros) o a compuestos que inhiben la actividad de un
15 receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inhiben un receptor de VEGF o que se unen al VEGF, y son en particular aquellos compuestos, proteínas o anticuerpos monoclonales genéricamente y específicamente descritos en el documento WO 98/35958, por ejemplo, 1-(4-cloroanilino)-4-(4-piridilmetil) ftalazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, por ejemplo, el succinato, o en los documentos WO-00/09495, WO-
20 00/27820, WO-00/59509, WO-98/11223, WO-00/27819 y EP 0769947; aquellos descritos por Prewett, M., et al., en Cancer Research (1999) 59:5209-5218, por Yuan, F., et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:14765-14770, por Zhu, Z., et al., in Cancer Res. (1998) 58:3209-3214, y por Mordenti, J., et al., en Toxicologic Pathology (1999) 27:14-21; en los documentos WO 00/37502 y WO 94/10202; Angiostatin™, descrito por O'Reilly, M. S., et al., Cell (1994) 79:315-328; Endostatin™, descrito por O'Reilly, M. S., et al., Cell (1997) 88:277-285; amidas de ácido antranílico; ZD4190; ZD6474; SU5416; SU6668; o anticuerpos anti-VEGF o anticuerpos receptores anti-VEGF, por ejemplo, RhuMab.

Por anticuerpo se entienden anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de al menos 2 anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos tan largos que ellos exhiban la actividad biológica deseada. También se incluyen las formas de cadena única.

- Los agentes antitumorales antiangiogénicos dirigidos los cuales dirigen, disminuyen o inhiben la actividad del receptor de la familia del factor de crecimiento epidérmico son especialmente compuestos, proteínas o anticuerpos los cuales inhiben miembros de un receptor tirosina quinasa de la familia del factor de crecimiento epidérmico EGF, por ejemplo, receptor EGF, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 o unidos a EGF o ligandos relacionados a EGF, y son en particular aquellos compuestos, proteínas o anticuerpos monoclonales genérica y específicamente descritos en el documento WO
30 97/02266, por ejemplo, el compuesto del Ej. 39, o en los documentos EP 0564409, WO 99/03854, EP 0520722, EP 0566226, EP 0787722, EP 0837063, U.S. Pat. No. 5,747,498, WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 y, especialmente, WO 96/30347 (por ejemplo, el compuesto conocido como CP 358774), WO 96/33980 (por ejemplo, el compuesto ZD 1839) y WO 95/03283 (por ejemplo, el compuesto ZM105180); por ejemplo, trastuzumab (Herpetin®), Cetuximab®, Iressa®, OSI-774, CI-1033, EKB-569, GW-2016, E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 o E7.6.3.

- 40 El término inhibidor de ciclooxigenasa como se usa en este documento, incluye, pero no está limitado por ejemplo, celecoxib (Celebrex®), rofecoxib (Vioxx®), etoricoxib, valdecoxib o un ácido 5-alkil-2-arilaminofenilacético, por ejemplo, ácido 5-metil-2-(2'-cloro-6'-fluoroanilil) fenil acético.

- El término "bisfosfonatos" como se usa en este documento, incluye, pero no está limitado a, ácido etridónico, clodrócnico, tiludrócnico, pamidrócnico, alendrócnico, ibandrócnico, risedrócnico y zoledrócnico. El "ácido etridónico" puede ser administrado, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo, puede ser administrado bajo la marca registrada DIDRONEL™. El "ácido clodrócnico", por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la
45 marca registrada BONEFOS™. El "ácido tiludrócnico" puede ser administrado, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca registrada SKELID™. El "ácido pamidrócnico" puede ser administrado, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca registrada ARELIA™. El "ácido alendrócnico" puede ser administrado, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca registrada FOSAMAX™. El "ácido ibandrócnico" puede ser administrado, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca registrada BONDRANAT™. El "ácido risedrócnico" puede ser administrado, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca registrada ACTONEL™. El "ácido zoledrócnico" puede ser administrado, por ejemplo, en la forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca registrada ZOMETA™.

- 55 Determinación *in vitro* de sinergia de combinación de fármacos

En algunas realizaciones de la invención las camptotecinas y las fluoropirimidinas estarán encapsuladas en liposomas en proporciones (una composición denominada "CPX-1") sinérgicas o aditivas (esto es, no antagonista) y son para ser

administradas con un agente biológico La determinación de proporciones de camptotecinas y fluoropirimidinas que muestran la combinación de efectos sinérgicos o aditivos se pueden llevar a cabo usando diversos algoritmos, basándose en los tipos de datos experimentales como se describen en las publicaciones PCT WO 03/028696 y WO2004/087115 (*supra*).

5 Preparación de vehículos de liberación basados en lípidos para camptotecinas y fluoropirimidinas

Los portadores de lípidos para usar en esta invención son liposomas. Los liposomas se pueden preparar como se describe en liposomas: Diseño racional (A.S. Janoff, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY), o mediante técnicas adicionales conocidas por aquellos entendidos en el arte. Los liposomas apropiados para uso en esta invención incluyen grandes vesículas unilamelares (LUVs), vesículas multilamelares (MLVs), pequeñas vesículas unilamelares (SUVs) y liposomas de fusión interdigitantes.

Los liposomas para uso en esta invención se pueden preparar para ser "bajos en colesterol." Tales liposomas permiten la presencia de una cantidad de colesterol que es insuficiente para alterar significativamente las características de transición de fase del liposoma (por lo general menos de 20 % mol de colesterol). Los liposomas para uso en la presente invención pueden también contener lípidos terapéuticos, ejemplos de los cuales incluyen éter lípidos, ácido fosfatídico, fosfonatos, ceramida y análogos de ceramida, esfingosina y análogos de esfingosina y lípidos que contengan serina.

Los liposomas también se pueden preparar con conjugados hidrófilos de polímeros lípidos estabilizantes de superficie, tales como polietilenglicol-DSPE, para mejorar la longevidad de la circulación. La incorporación de lípidos cargados negativamente tales como fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilinositol (PI) también pueden ser adicionados a formulaciones de liposomas para incrementar la longevidad de la circulación del portador. Estos lípidos pueden ser empleados para reemplazar conjugados hidrófilos polímero lípido como agentes estabilizantes de superficie. Realizaciones preferidas de esta invención pueden hacer uso de liposomas bajos en colesterol que contengan PG o PI para prevenir agregación, aumentando así en la sangre el tiempo de residencia del portador.

Diversos métodos se pueden usar para encapsular agentes activos en liposomas. La "encapsulación," incluye asociaciones covalente o no covalente de un agente con el vehículo de liberación basado en lípidos. Por ejemplo, esto puede ser mediante interacción del agente con la capa o capas externas del liposoma o atrapamiento de un agente dentro del liposoma, siendo alcanzado el equilibrio entre diferentes porciones del liposoma. De este modo, la encapsulación de un agente puede ser mediante asociación del agente por interacción con la bicapa de los liposomas a través de la interacción covalente o no covalente con los componentes del lípido o atrapamiento en el interior acuoso del liposoma, o en equilibrio entre la fase acuosa interna y la bicapa.

La encapsulación de una combinación deseada puede ser llevada a cabo a través de la encapsulación en vehículos de liberación separados o dentro del mismo vehículo de liberación. Cuando la encapsulación se desea en liposomas separados, la composición de lípidos de cada liposoma puede ser bastante diferente para permitir una farmacocinética coordinada. Mediante alteración de la composición del vehículo, las velocidades de liberación de los fármacos encapsulados pueden ser igualadas para permitir que las proporciones deseadas de los fármacos sean liberadas en el sitio del tumor. Cuando dos o más fármacos son encapsulados en liposomas separados, se debe aceptar fácilmente que las proporciones camptotecinas solubles en agua a fluoropirimidinas que han sido determinados sobre una base específica del paciente para proporcionar una actividad terapéutica óptima, deberían ser generados para pacientes individuales combinando las cantidades apropiadas de cada fármaco encapsulado en liposomas previo a la administración. Alternativamente, dos o más agentes pueden ser encapsulados dentro del mismo liposoma.

Administración de composiciones fundamentales de la invención *In vivo*

Como se mencionó anteriormente, las composiciones para uso en el tratamiento del cáncer según la presente invención pueden ser administradas a animales de sangre caliente, incluyendo humanos, así como especies aviares domésticas. Para el tratamiento de enfermedades humanas, un médico calificado determinará como las composiciones fundamentales de la presente invención deberán ser usadas con respecto a dosis, horarios y vías de administración usando protocolos establecidos. Tales aplicaciones pueden también usar un aumento de la dosis en caso de que los agentes encapsulados en las composiciones liposomales presenten una toxicidad reducida para los tejidos sanos del sujeto.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas para uso según con la presente invención han de ser administradas por vía parenteral, esto es, por vía intraarterial, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular. Más preferiblemente, las composiciones farmacéuticas han de ser administradas por vía intravenosa o intraperitoneal mediante inyección en bolo. Sin embargo, cualquier método efectivo de administración puede ser usado, incluyendo procedimientos endoscópicos.

Las composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención son preparadas según técnicas estándar y pueden comprender agua, agua estandarizada, solución salina al 0.9%, glicina al 0.3%, dextrosa al 5% y similares, incluyendo glicoproteínas para mejorar la estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, y similares. Estas

composiciones pueden ser esterilizadas por técnicas de esterilización convencional y bien conocidas. Las soluciones acuosas resultantes pueden ser envasadas para su uso o filtradas bajo condiciones asépticas y liofilizadas, la preparación liofilizada siendo combinada con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables como se requiera para aproximar condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y agentes reguladores, agentes de ajuste de tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, y similares. Adicionalmente, la suspensión liposomal puede incluir agentes protectores de lípidos los cuales protegen los lípidos contra los radicales libres y el daño peroxidativo de lípidos en el almacenamiento. Los inactivadores de radicales libres lipofílicos, tales como alfatocoferol y agentes quelantes solubles en agua específicos al hierro, tales como ferrioxamina, son apropiados. La leucovorina también puede ser administrada con composiciones fundamentales de la invención a través de técnicas estándar para mejorar la vida útil de las fluoropirimidinas administradas.

Además de las composiciones farmacéuticas, formulaciones apropiadas para uso veterinario se pueden preparar y administrar de una manera apropiada para el sujeto. Los sujetos veterinarios preferidos incluyen especies de mamíferos, por ejemplo, primates no humanos, perros, gatos, ganado, caballos, ovejas y aves domesticadas. Los sujetos pueden también incluir animales de laboratorios, por ejemplo, en particular, ratas, conejos, ratones y cobayas.

Los siguientes ejemplos son ofrecidos para ilustrar, pero no limitar, la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Cetuximab® mejora la actividad de irinotecán, así como el irinotecán liposomal, en el modelo de xenoinjerto de colon humano DLD-1

Este ejemplo compara la eficiencia de comprender ya sea camptotecina libre o liposomal y un inhibidor del receptor de factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, Cetuximab®) comparado a los agentes individuales. Las eficacias de irinotecán libre y Cetuximab® libre fueron comparadas con la combinación de los dos y, del mismo modo, las eficacias de irinotecán liposomal y Cetuximab® fueron comparados con la combinación de estos dos agentes.

En resumen, con el fin de realizar estudios de tumores en ratones, los animales son inoculados subcutáneamente con aproximadamente 2×10^6 células tumorales a las cuales luego se les permitió crecer hasta un tamaño suficiente antes de ser tratadas. Esto se realiza usando los métodos descritos anteriormente en la publicación PCT WO03/028696 (*supra*).

Tanto el irinotecán libre como el Cetuximab® fueron administrados a ratones hembra desnudas Foxnl en dosis de 100 mg/kg o 1 mg/ratón, respectivamente en un esquema de dosis múltiples como se muestra en las flechas de la figura 1A. Cetuximab® fue dosificado en un esquema Q3Dx7 e irinotecán en un esquema Q7Dx3. Los resultados muestran que la combinación de ambos agentes libres es significativamente mayor comparada a la de cualquiera de los agentes solos.

El irinotecán también se cargó activamente en liposomas DSPC/DSPG/Chol (70:20:10 relación molar). Las películas de lípidos fueron preparadas disolviendo DSPC a 50 mg/ml, colesterol a 50 mg/ml en cloroformo, y DSPG a 25 mg/ml en cloroformo/metanol/agua (50/10/1). Los lípidos fueron luego combinados y, después se eliminó el solvente, las películas lipídicas resultantes fueron hidratadas con una solución consistente de Cu(gluconato)₂ 100 mM, trietanolamina (TEA) 220 mM, a pH 7.4 y 70 °C. Los MLVs resultantes fueron extruidos a 70°C para generar LUVs. El diámetro medio de los liposomas resultantes fue determinado por análisis QELS (dispersión de luz cuasielástica) de aproximadamente 100 nm +/- 20 nm. Posteriormente, los liposomas fueron intercambiados en una solución reguladora de sacarosa 300 mM, Hepes 20 mM, EDTA (SHE) 30 mM, a pH 7.4 usando una columna manual de flujo tangencial y luego en NaCl 150 mM, Hepes (HBS) 20 mM, pH 7.4, removiendo de este modo cualquier Cu(gluconato)₂ no encapsulado. Después de cargar y posteriormente enfriar a temperatura ambiente, las muestras fueron intercambiadas en solución salina (inyección de cloruro de sodio, USP; pH 5.5, Baxter) mediante diálisis de flujo tangencial para remover el EDTA o el (los) fármaco(s) no encapsulado(s). El grado de la carga de irinotecán fue medida usando la absorbancia a 370 nm contra una curva estándar. Una proporción fármaco a lípido en cada punto de tiempo fue generada usando un recuento de centelleo líquido para determinar las concentraciones de lípidos (¹⁴C-CHE).

Tanto el irinotecán liposomal como Cetuximab® libre fueron administrados a ratones hembra desnudas Foxnl en dosis de 100 mg/kg o 1 mg/ratón, respectivamente en un esquema de dosis múltiples como se muestra por las flechas de la figura 1B. Cetuximab® fue dosificado en un esquema Q3Dx7 y el irinotecán liposomal en un esquema Q7Dx3. Los resultados de la figura 1B muestran que el irinotecán liposomal presenta mayor actividad que Cetuximab® solo y que la combinación de ambos de estos agentes es significativamente mayor comparada a la de ya sea el irinotecán liposomal o el Cetuximab® libre solos.

Ejemplo 2:

La combinación de CPX-1 y Avastin® es aditiva contra el modelo de xenoinjerto de colon humano LS174T

Con el fin de establecer si una eficiencia mejorada es observada en combinaciones de agentes biológicos con dos composiciones liposomales de fármacos comparados con cualquiera de estos agentes solos, las eficacias de los liposomas de carga dual en combinación con el agente biológico, Avastin®, fueron también comparados a los efectos de Avastin® solo, así como los liposomas de carga dual solos. Avastin® es a un anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Los presentes inventores han mostrado previamente que el efecto de combinaciones de camptotecinas y fluoropirimidinas son dependientes de la proporción y que las eficacias mejoradas de combinación de estas clases de fármacos pueden ocurrir cuando una proporción de los agentes que da al menos un efecto aditivo se mantiene. En particular, una combinación de la camptotecina, irinotecán, y la fluoropirimidina, FUDR, fue previamente mostrado en exhibir un fuerte grado de sinergia cuando los dos agentes están presentes en una proporción de fármaco 1:1. Estos dos fármacos se pueden cargar conjuntamente en liposomas los cuales mantienen la proporción después de la administración *in vivo* (una formulación denominada "CPX-1"), liberando así los fármacos en correcta proporción 1:1 al sitio del tumor. En este documento los inventores determinan si la eficiencia mejorada de CPX-1 ocurre en la presencia de Avastin® (también denominada bevacizumab).

El irinotecán también se cargó activamente en liposomas DSPC/DSPG/Chol (relación molar 70:20:10) que contenían FUDR atrapada pasivamente. Las películas de lípidos fueron preparadas disolviendo DSPC a 50 mg/ml, colesterol a 50 mg/ml en cloroformo, y DSPG a 25 mg/ml en cloroformo/metanol/agua (50/10/1). Los lípidos fueron luego combinados y, después de la eliminación del solvente, las películas lipídicas resultantes fueron hidratadas con una solución consistente de Cu(gluconato)₂ 100 mM, trietanolamina (TEA) 220 mM, pH 7.4 que contiene aproximadamente 25 mg/ml de FUDR (con cantidades trazas de ³H-FUDR) a 70°C. Las MLVs resultantes fueron extruidos a 70°C para generar LUVs. El diámetro promedio de los liposomas resultantes fue determinado por análisis QELS (dispersión de luz cuasielástica) de aproximadamente 100 nm +/- 20 nm. Posteriormente, los liposomas fueron intercambiados en una solución reguladora sacarosa 300 mM, Hepes 20 mM, EDTA (SHE) 30 mM, pH 7.4 usando una columna manual de flujo tangencial y luego en NaCl 150 mM, Hepes (HBS) 20 mM, pH 7.4, para así remover cualquier FUDR y Cu(gluconato)₂ no encapsulado.

El irinotecán fue adicionado a estos liposomas de tal manera que la relación molar de FUDR a irinotecán sería 1:1. La carga de irinotecán en los liposomas con una proporción inicial irinotecán a lípido de 0.1:1 fue facilitada mediante incubación de las muestras a 50 °C, durante 10 minutos. Después de la carga y luego del enfriamiento a temperatura ambiente, las muestras fueron intercambiadas en solución salina (inyección de cloruro de sodio al 0.9%, USP; pH 5.5, Baxter), mediante diálisis de flujo tangencial para eliminar EDTA o fármaco(s) sin encapsular. El grado de la carga de irinotecán fue medida usando la absorbancia a 370 nm contra una curva estándar. Una proporción de fármaco a lípido en cada punto de tiempo fue generada usando un recuento por centelleo de líquidos para determinar las concentraciones de lípidos (¹⁴C-CHE) y las concentraciones FUDR (³H-FUDR).

Ya sea CPX-1 o Avastin® libre fue administrado a ratones hembra desnudas Foxnl en dosis detalladas en las figuras 2A y 2B, en un horario de dosificación Q7Dx3. Los resultados en la figura 2A muestran que CPX-1 tiene mayor actividad que bevacizumab libre y que la combinación de ambas de estas formulaciones se mejora en comparación con la de ya sea de CPX-1 o bevacizumab solos.

Este experimento también fue repetido usando ratones que recibieron pretratamiento con bevacizumab (Avastin®). Estos ratones recibieron dos inyecciones de bevacizumab antes de una inyección única de CPX-1. Como se observa en la figura 2B, los ratones que fueron pretratados y recibieron bevacizumab en combinación con CPX-1 mostraron dramáticos mejoramientos en la reducción del tumor.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de
 - (a) primeros liposomas establemente asociados con al menos una camptotecina soluble en agua; y
 - (b) un agente antitumoral anti angiogénico dirigido el cual es un compuesto que disminuye o inhibe la actividad de un receptor tirosina quinasa de la familia de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o que inhibe la actividad de un receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o que se une al VEGFpara uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto.
2. Una combinación para uso según la reivindicación 1, en la que el agente anti angiogénico es un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
3. Una combinación para uso según la reivindicación 2, en la que el agente anti angiogénico es un anticuerpo el cual une a VEGF o inhibe un receptor de VEGF (VEGF-R).
4. Una combinación para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en la que la camptotecina soluble en agua es irinotecán, topotecán, 9-aminocamptotecina o lurtotecán
5. Una combinación para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en la que los dichos primeros liposomas además comprenden una fluoropirimidina, en la que la relación molar de dicha camptotecina a dicha fluoropirimidina es no antagonista, y dichas camptotecina y fluoropirimidina están establemente asociadas con dichos primeros liposomas.
6. Una combinación para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en la que dicha combinación además incluye una fluoropirimidina establemente asociada con segundos liposomas, en la que la relación molar de dicha fluoropirimidina y dicha camptotecina soluble en agua es no antagonista, y la farmacocinética de dichos primer y segundo liposomas son coordinadas.
7. Una combinación para uso según las reivindicaciones 5 o 6, en la que el agente fluoropirimidina es floxuridina, fluorouracilo o UFT (tegafur/uracilo).
8. Una composición que comprende
 - (a) liposomas asociados con al menos una camptotecina soluble en agua; y
 - (b) un agente antitumoral anti angiogénico dirigido el cual es un compuesto que disminuye o inhibe la actividad de un receptor tirosina quinasa de la familia de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o que inhibe la actividad de un receptor tirosina quinasa del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o que se une al VEGF;para uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto.
9. Una composición para uso según la reivindicación 8, cuya composición además comprende liposomas asociados con al menos un agente fluoropirimidina, en la que la relación molar de dicha camptotecina y dicha fluoropirimidina es no antagonista, dichas camptotecina y fluoropirimidina están establemente asociadas con dichos liposomas, y la farmacocinética de los liposomas son coordinadas.
10. Una composición para uso según la reivindicación 9, en la que dicha camptotecina y fluoropirimidina están coencapsuladas.
11. A composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 10, en la que el agente anti angiogénico es un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
12. Una composición para uso según la reivindicación 11, en la que el agente anti angiogénico es un anticuerpo el cual se une a VEGF o inhibe un receptor de VEGF (VEGF-R).
13. A composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 12, en la que la camptotecina soluble en agua es irinotecán, topotecán, 9-aminocamptotecina o lurtotecán.
14. Una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 - 13, en la que el agente fluoropirimidina es floxuridina, fluorouracilo o UFT (tegafur/uracilo).
15. Una combinación o composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 14, en la que dichos liposomas comprenden diestearoil fosfatidilcolina (DSPC) o diaraquidoil fosfatidilcolina (DAPC) y diestearoil fosfatidilglicerol (DSPG) o dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG) y menos del 20% mol de colesterol.

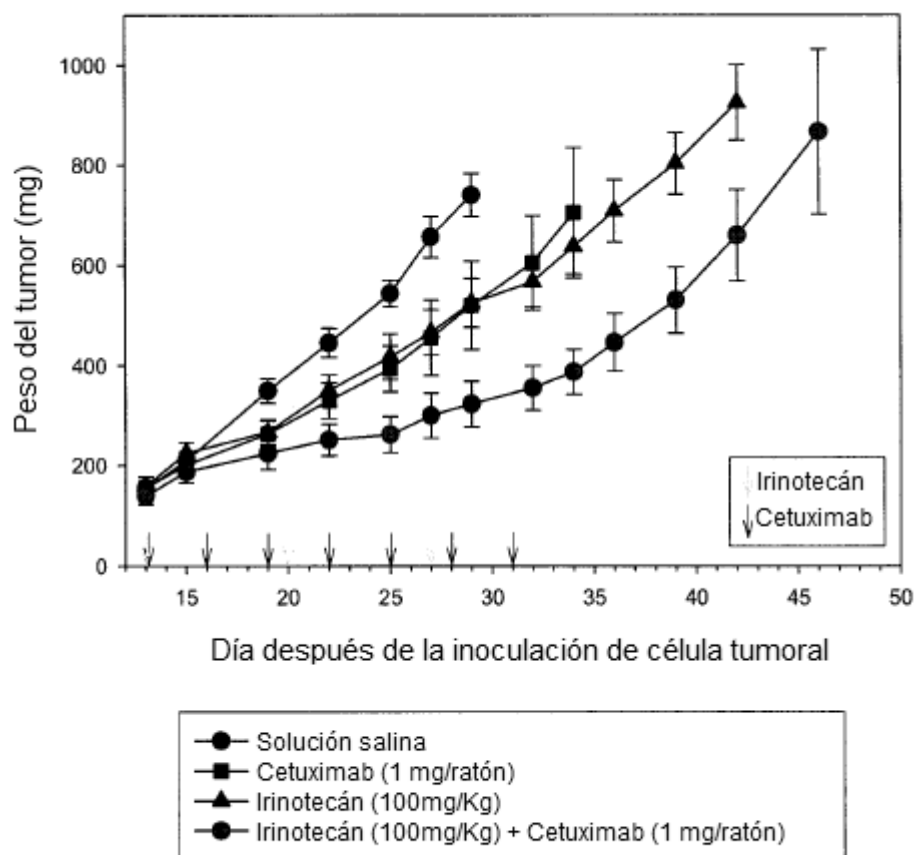


Figura 1A

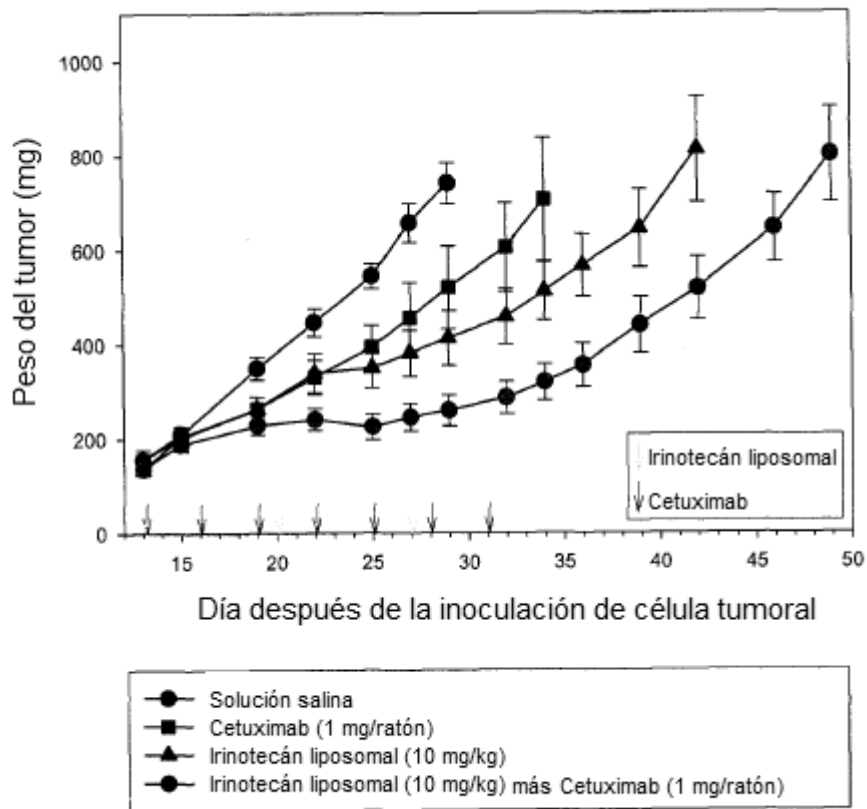
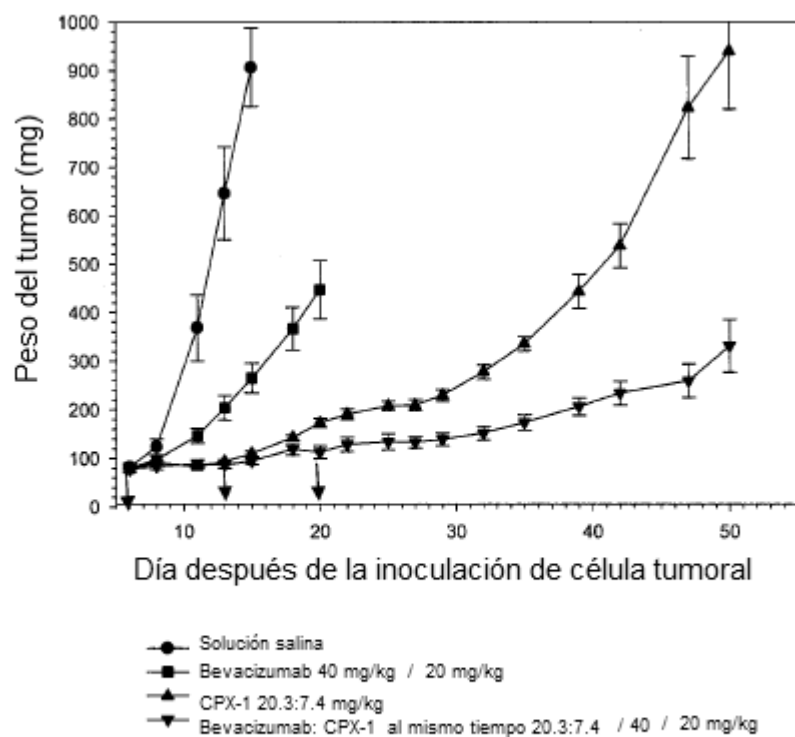


Figura 1B

**Figura 2A**

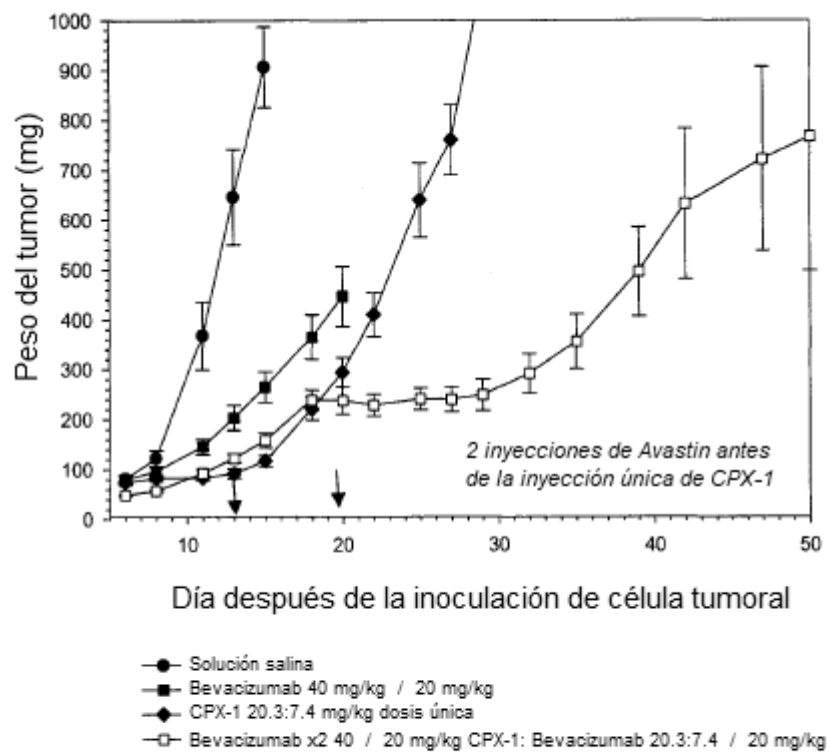


Figura 2B