

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 405**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2013 PCT/US2013/071096**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14081887**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2013 E 13814676 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2922529**

54 Título: **Método mejorado para la preparación de vincristina encapsulada en liposomas para uso terapéutico**

30 Prioridad:

20.11.2012 US 201261728378 P

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

11.11.2019

73 Titular/es:

**SPECTRUM PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
157 Technology Drive
Irvine, CA 92618, US y
ARBUTUS BIOPHARMA CORPORATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MONTE, WILLIAM, T.;
BARBOSA, CHRISTOPHER, JAMES y
WEBER, THOMAS, PHILIP**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 730 405 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

Método mejorado para la preparación de vincristina encapsulada en liposomas para uso terapéutico

Antecedentes

5 Los liposomas son nanopartículas bien establecidas que pueden potenciar la eficacia de fármacos terapéuticamente activos al mejorar la distribución plasmática y la farmacocinética de los fármacos sobre formas no encapsuladas (p. ej., Weinstein, *Liposomes: From Biophysics to Therapeutics*, (Ostro, M. J., ed.), Marcel Dekker, Inc., N.Y., pp. 277-338, (1987). Por ejemplo, una inyección de liposomas de sulfato de vincristina (VSLI, por sus siglas en inglés) es una formulación liposómica del agente terapéutico anticanceroso sulfato de vincristina encapsulado en liposomas de esfingomielina-colesterol que proporciona mayor eficacia que la inyección de sulfato de vincristina USP (VSI, por sus siglas en inglés) estándar. Los estudios clínicos han mostrado que la VSLI facilita la intensificación de la dosis al prolongar significativamente la semivida circulatoria de vincristina en comparación con vincristina no encapsulada. El liposoma proporciona el mecanismo para la liberación de fármaco retardada y el tamaño del liposoma permite que el fármaco se acumule en tejidos cancerosos mediante extravasación (Webb *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol* 42:461-470, 1998; Shan *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol* 158:245- 255, 2006). Estas características se traducen en un beneficio clínico mejorado sobre la VSI estándar.

El documento WO0059473 [A] (Inex Pharmaceuticals Corp [CA], *et al.*) describe métodos mejorados para reconstituir eficazmente vincristina encapsulada en liposomas para inyección intravenosa (VSLI) con riesgo reducido de errores operativos y contaminación. Se reconstituye una primera solución que comprende sulfato de vincristina junto con una segunda solución que comprende liposomas de esfingomielina/colesterol a un pH bajo. El pH se eleva y a continuación la solución reconstitutiva se calienta en un baño de agua para producir una solución que comprende vincristina encapsulada en liposomas reconstituida.

Normalmente, la encapsulación de sulfato de vincristina en liposomas de esfingomielina/colesterol se consigue al usar un pH intraliposómico ácido (p. ej., pH de 4) y un medio exterior a un pH neutro (p. ej., pH de 7). Este gradiente de pH permite que la vincristina débilmente básica se difunda en el interior del liposoma con alta eficacia (Cullis *et al.*, *Trends in Biotech* 9: 268-272, 1991; Boman *et al.*, *Bioch Biophys Acta*, 1152:253-258, 1993). Para que la vincristina se acumule en el interior del liposoma con el gradiente de pH transmembranario, la membrana liposómica se debe volver temporalmente permeable al volumen estérico de la vincristina. Así, a diferencia de fármacos neutros o aniónicos que a menudo se pueden encapsular pasivamente en liposomas, la temperatura del liposoma de esfingomielina/colesterol se debe incrementar a fin de que el gradiente de pH transmembranario funcione con la vincristina. La bicapa liposómica, que es una orientación de moléculas de esfingomielina y colesterol entrelazadas, requiere un patrón de calor transitorio único para crear estados de transición con alteración termotrópica. Estos estados de transición disminuyen esencialmente la unión intermolecular débil entre los lípidos membranarios, creando huecos en lípidos entrelazados, y permiten que la bicapa liposómica sea temporalmente permeable. El procedimiento de encapsulación se aprovecha del autorreensamblaje espontáneo de los lípidos de esfingomielina-colesterol que se produce al enfriar de nuevo hasta temperatura ambiente, lo que restaura la integridad de la membrana.

Este perfil de calentamiento para la encapsulación de fármacos se debe equilibrar con la inestabilidad química de la vincristina a la exposición al calor (Vendrig *et al.*, *Internatl. J. of Pharmaceutics* 50:189-196, 1989; Sethi *et al.*, *Cancer Res.* 45:5386-5389, 1985). La vincristina es térmicamente lábil y se degrada fácilmente hasta N-desformilvincristina en presencia de temperaturas elevadas. Esta hidrólisis de formamida de la vincristina es una ruta de degradación muy conocida y afecta a la vida útil con estabilidad de la inyección de sulfato de vincristina (VLSI). Por ejemplo, las soluciones para VLSI no se pueden termoesterilizar debido a esta termolabilidad y se deben almacenar y transportar a temperatura refrigerada para conseguir una estabilidad prolongada.

Según esto, en la actualidad, la inyección de liposomas de sulfato de vincristina (VSLI) se prepara a partir de los componentes individuales en una farmacia según las directrices proporcionados en la etiqueta aprobada por la FDA (www.accessdata.fda.gov; ID de Referencia: 3172211, 2012). Estas directrices incluyen un procedimiento de calentamiento que requiere el uso de un baño de agua a fin de alcanzar una encapsulación suficiente de vincristina en los liposomas de esfingomielina/colesterol y mantener la pureza química de la vincristina. Las excelentes propiedades de termotransferencia del agua permiten más de 95% de encapsulación de vincristina sin degradación química apreciable del fármaco.

Puesto que VSLI es un fármaco inyectable, la fabricación de los componentes y la preparación en la farmacia están estrictamente regulados para mantener la esterilidad. Según esto, el uso de un baño de agua abierto durante la preparación de VSLI requiere recursos, planificación o equipo (p. ej., anillo de flotación) adicionales, incluyendo una campana aséptica o habitación "limpia" a fin de mantener un ambiente aséptico. En algunas farmacias, la reconstitución de VSLI no se puede realizar debido a las restricciones sobre el mantenimiento de un ambiente estéril.

Según esto, sigue habiendo una necesidad de métodos mejorados para preparar VSLI que se puedan llevar a cabo eficazmente y reproduciblemente sin los recursos y el equipo adicionales requeridos actualmente.

Compendio de la invención

- La presente invención se basa, al menos en parte, en el desarrollo de un método para preparar VSLI que evite la necesidad de usar un baño de agua calentada durante el procedimiento de encapsulación. Así, la invención proporcionar métodos reproducibles eficaces para preparar VSLI que se pueden usar ampliamente con facilidad inesperada y riesgo reducido de contaminación.
- La invención presenta un método para preparar una composición líquida farmacéuticamente aceptable que comprende vincristina encapsulada en liposomas que está libre de productos de degradación sustanciales, comprendiendo el método las etapas de (a) reconstituir en un vial individual (i) una primera solución que comprende sulfato de vincristina en una concentración de 1 mg/ml a 5 mg/ml, en donde la primera solución tiene un pH de 3,5 a 5,5; y (ii) una segunda solución que comprende liposomas de esfingomielina/colesterol a un pH bajo; (b) elevar el pH de la solución reconstitutiva en el vial individual hasta un pH de 7,0 a 7,5; (c) calentar el vial individual que comprende la solución reconstitutiva en un termobloque seco equilibrado a 75°C durante al menos de 13 a 18 minutos, en donde dicho termobloque comprende uno o más orificios 1-5% mayores que la longitud o el diámetro medios del vial individual para producir una solución que comprende vincristina encapsulada en liposomas reconstituida; (d) equilibrar la solución reconstituida hasta temperatura ambiente, según se define en la reivindicación 1.
- La administración posterior al paciente implicará (e) diluir un volumen de la solución reconstituida que comprende una dosis de vincristina encapsulada en liposomas para el paciente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,4 mg/m² con un diluyente farmacéutico adecuado para la administración intravenosa, para producir la composición líquida farmacéuticamente aceptable; y (f) administrar la composición líquida farmacéuticamente aceptable al paciente, en donde la solución reconstituida que comprende vincristina encapsulada en liposomas comprende (i) menos de aproximadamente 2,5% de vincristina libre; y (ii) menos de aproximadamente 1,5% de N-desformilvincristina.
- En algunas realizaciones, la primera solución que comprende sulfato de vincristina tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 4,7. En una realización, la primera solución comprende además manitol en una concentración de aproximadamente 100-200 mg/ml.
- En algunas realizaciones, el pH de la segunda solución que comprende los liposomas es aproximadamente 4,0. En una realización, la segunda solución comprende además un tampón de citrato.
- En algunas realizaciones, el pH de la solución reconstitutiva se eleva mediante la adición de una tercera solución que comprende un tampón a un pH de aproximadamente 9,0. En una realización, la tercera solución comprende tampón de fosfato sódico.
- En algunas realizaciones, la solución reconstitutiva comprende una relación de concentraciones de aproximadamente 0,1/1,0 a aproximadamente 0,2/2,0 de sulfato de vincristina con respecto a lípido.
- En algunas realizaciones, la concentración de sulfato de vincristina en la solución reconstituida es aproximadamente de 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de sulfato de vincristina en la solución reconstituida está en de aproximadamente 0,15 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml. En una realización, la concentración de sulfato de vincristina en la solución reconstituida es aproximadamente 0,16 mg/ml.
- En una realización, la primera solución comprende sulfato de vincristina USP (5 mg/5 ml), que es equivalente a 4,5 mg/5 ml de base libre de vincristina, y 500 mg/5 ml de manitol, la segunda solución comprende liposomas de esfingomielina/colesterol que consisten en 73,5 mg/ml de esfingomielina, 29,5 mg/ml de colesterol, 33,6 mg/ml de ácido cítrico, 35,4 mg/ml de citrato sódico y la tercera solución comprende 355 mg/25 ml de fosfato sódico dibásico y 225 mg/25 ml de cloruro sódico.
- En algunas realizaciones, la relación de esfingomielina a colesterol en el liposoma está entre aproximadamente 75/25% en moles/mol de esfingomielina/colesterol a 30/50% mol/mol de esfingomielina/colesterol. En algunas realizaciones, los liposomas comprenden aproximadamente 70/30% mol/mol de esfingomielina/colesterol a 40/45% mol/mol de esfingomielina/colesterol. En una realización, los liposomas comprenden aproximadamente 55/45% mol/mol de esfingomielina/colesterol. En otra realización, los liposomas comprenden aproximadamente 60/40% mol/mol de esfingomielina/colesterol.
- En algunas realizaciones, los liposomas tienen un intervalo de tamaños de aproximadamente 0,05-0,5 micras. En algunas realizaciones, los liposomas tienen un diámetro medio de aproximadamente 50-200 nm. En una realización, los liposomas tienen un diámetro medio de aproximadamente 90-125 nm.
- En algunas realizaciones, la solución reconstitutiva tiene un volumen de entre aproximadamente 20-50 ml. En algunas realizaciones, la solución reconstitutiva tiene un volumen de entre 30-35 ml.
- En algunas realizaciones, el termobloque se equilibra hasta 75±2°C durante aproximadamente 15 minutos antes de la inserción del vial que contiene la solución reconstitutiva. En algunas realizaciones, la solución reconstitutiva se calienta durante aproximadamente 13-15 minutos dentro del orificio calibrado de un Dri-block equilibrado a 75±2°C.

En una realización, la solución reconstitutiva se calienta durante 14 minutos \pm 30 segundos dentro del orificio calibrado de un Dri-block equilibrado a $75\pm 2^\circ\text{C}$.

5 En algunas realizaciones, los orificios del termobloque son menos de aproximadamente 3% mayores que la longitud o el diámetro medios del vial individual que contiene la solución reconstitutiva. En algunas realizaciones, el vial individual que contiene la solución reconstitutiva tiene un diámetro entre aproximadamente 35,8 y aproximadamente 37,3 mm, y los orificios calibrados del termobloque son cilíndricos con un diámetro entre 37,2 y 37,8 mm de diámetro.

En algunas realizaciones, la solución reconstituida se equilibra hasta temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 30 minutos.

10 En algunas realizaciones, el volumen de la solución reconstituida que comprende una dosis de vincristina encapsulada en liposomas para el paciente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente $2,4 \text{ mg/m}^2$ se diluye con diluyentes farmacéuticos estándar adecuados para la administración intravenosa, para producir la composición líquida farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el volumen de la dosis calculada del paciente se retira de un recipiente de infusión y se reemplaza por el volumen calculado de la solución de VSLI reconstituida.

15 La composición líquida farmacéuticamente aceptable que comprende vincristina encapsulada en liposomas se puede administrar al paciente en no más de 24 horas después de la reconstitución.

Normalmente, la VSLI producida según los métodos de la invención se administra a un paciente que tiene cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es linfoma, leucemia, mieloma, cáncer cerebral o neuroblastoma.

20 La composición líquida farmacéuticamente aceptable que comprende vincristina encapsulada en liposomas se puede administrar mediante infusión intravenosa a lo largo de un período de aproximadamente 30 a 60 minutos. La composición líquida farmacéuticamente aceptable que comprende vincristina encapsulada en liposomas se puede administrar mediante infusión intravenosa una vez cada 7-28 días. La composición líquida farmacéuticamente aceptable que comprende vincristina encapsulada en liposomas se puede administrar mediante infusión intravenosa una vez cada 7 días.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 es una gráfica que representa el perfil de calentamiento interno de una solución reconstituida que contiene sulfato de vincristina y liposomas de esfingomielina/colesterol usando un bloque seco y un baño de agua.

Descripción detallada

30 La presente invención vence las deficiencias asociadas con el uso de un baño de agua durante los métodos actualmente usados para preparar VLSI. Sorprendentemente, se descubrió que el uso de un termobloque con una inserción de diseño personalizado diseñada para ajustarse al recipiente usado para reconstituir la VSLI proporciona el perfil térmico necesario para alcanzar la encapsulación uniforme de vincristina sin degradación significativa.

35 Además, la capacidad mejorada de los métodos para preparar VSLI descritos en la presente memoria para demostrar una liberación paramétrica es significativa. Puesto que la estabilidad de VSLI garantiza la preparación "justo a tiempo", el procedimiento de reconstitución debe ser muy eficaz y reproducible por el farmacéutico. El farmacéutico necesita saber (es decir, paramétricamente) que la encapsulación se ha alcanzado por el procedimiento termoinducido debido a que proporciona "un sistema de liberación que dé la seguridad de que un producto es de la calidad pretendida basándose en la revisión de la información recogida durante el procedimiento de reconstitución y en el cumplimiento de requisitos específicos de prácticas adecuadas de fabricación relacionados con la liberación paramétrica" (Anexo 17 guía EU).

40 El procedimiento de termobloque de la presente invención proporciona un procedimiento conveniente y compatible para alcanzar la reconstitución de VSLI con más de 95% de eficacia de encapsulación. Puesto que implica menos etapas, se disminuye la probabilidad de errores operativos. El procedimiento es globalmente más directo, tarda menos tiempo, usa menos recursos y es conveniente para un manejo habitual en la farmacia. Adicionalmente, la persona que prepare la VSLI no necesita ocuparse de la contaminación microbiana potencial procedente de microbios que crecen en el baño de agua o el vapor de agua procedente del baño de agua calentado.

Definiciones

A menos que se apunte específicamente otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen las definiciones estándar entendidas comúnmente por un experto en la técnica de la ciencia terapéutica y farmacéutica.

50 La forma singular "un" "uno(a)" y "el/la" incluyen la referencia plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

Los términos “comprender” y “que comprende” se usan en el sentido abierto inclusivo, que significa que se pueden incluir elementos adicionales.

Se entiende que el término “aproximadamente”, particularmente con referencia a una cantidad o un número dados, abarca desviaciones de más o menos cinco por ciento.

- 5 Una composición o un recipiente “estéril”, según se usa en la presente memoria, está libre de microbios viables según se determina usando la prueba de esterilidad de la USP. (Véase “The United States Pharmacopeial Convention”: 2008).

10 Se entenderá que “liposoma” “vesícula” y “vesícula liposómica” indican estructuras que tienen membranas que contienen lípidos que encierran un interior acuoso. Las estructuras pueden tener una o más membranas lipídicas a menos que se indique otra cosa, aunque generalmente los liposomas tendrán solamente una membrana. Estos liposomas de una sola capa se denominan en la presente memoria “unilaminares”. Los liposomas de múltiples capas se denominan en la presente memoria “multilaminares”.

15 Un agente terapéutico “estándar” o un agente terapéutico “libre” se refiere a un agente terapéutico que no está encapsulado en liposomas. Habitualmente, se supone que un fármaco es “estándar o “libre” a menos que se especifique otra cosa. Sin embargo, un alcaloide de vinca estándar en forma libre puede estar presente en combinación con otros reactivos, tales como otros compuestos quimioterapéuticos, un portador farmacéutico o agentes complejantes, es decir, según se usa en la presente memoria, el término solo excluye específicamente formulaciones lipídicas de los alcaloides de las vincas.

20 La expresión “justo a tiempo” se refiere a la combinación de los componentes separados de un producto farmacológico (p. ej., VSLI) poco (p. ej., en 24 horas o menos) antes de la administración al paciente a fin de mantener la calidad de producto farmacológico (p. ej., minimizar la degradación).

25 “Aporte sistémico”, según se usa en la presente memoria, se refiere a un aporte que conduce a una amplia biodistribución de un compuesto dentro de un organismo. El aporte sistémico significa que una cantidad, preferiblemente terapéuticamente, útil de un compuesto se expone a la mayoría de las partes del cuerpo. Obtener una amplia biodistribución requiere generalmente una vía de introducción tal que el compuesto no se degrade o depure rápidamente (tal como mediante órganos de primer paso (hígado, pulmón, etc.) o mediante unión celular inespecífica rápida) antes de alcanzar una zona enferma. El aporte sistémico de alcaloides de las vincas encapsulados en liposomas se obtiene preferiblemente mediante aporte intravenoso.

30 La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de fármaco (p. ej., VSLI) eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno (p. ej., cáncer) en un mamífero, por ejemplo, dando como resultado una enfermedad estable, la remisión parcial o la remisión completa del estado canceroso.

35 Una “enfermedad estable”, según se usa en la presente memoria, se refiere a un estado en el que la administración del fármaco (p. ej., VSLI) provoca el cese del crecimiento o la extensión de un tumor o un cáncer según se mide por medios clínicos, radiológicos y/o biológicos estándar, aunque no haya regresión o disminución en el tamaño o la extensión del cáncer.

40 Una “respuesta parcial” o “remisión parcial” se refiere a la mejora de un estado canceroso, según se mide por medios clínicos, radiológicos y/o biológicos estándar, en respuesta a un tratamiento. Normalmente, una “respuesta parcial” significa que el tamaño de un tumor o el nivel de un marcador sanguíneo indicador de cáncer ha disminuido desde un nivel de referencia (p. ej., 20%, 30%, 40% o 50%) en respuesta al tratamiento. Por ejemplo, para el tratamiento de cánceres hematológicos, las respuestas se valoran basándose en los criterios de grupos de trabajo internacionales (criterios International Working Group (IWS); BD Cheson *et al*, J Clin Oncol 15:4642-4649).

Una “respuesta completa” o “remisión completa” significa que el estado canceroso, según se mide mediante, por ejemplo, el tamaño del tumor y/o los niveles de marcadores del cáncer, es indetectable después del tratamiento.

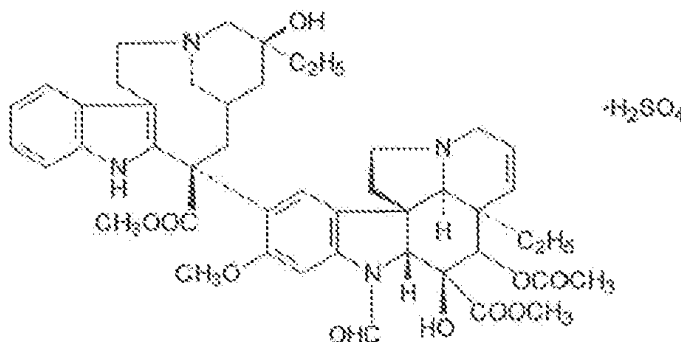
45 “Toxicidad neurológica” incluye síntomas de neuropatía, tales como hipoestesia, hiperestesia, parestesia, hiporreflexia, arreflexia, neuralgia, dolor mandibular, disminución del sentido vibratorio, neuropatía craneal, íleo, sensación de quemazón, artralgia, mialgia, espasmos musculares, debilidad y/o hipotensión ortostática tanto antes como durante el tratamiento. Se puede producir hipotensión ortostática. Se determina que una toxicidad neurológica es de Grado 1 a Grado 3 basándose en el National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) versión 4.03 (<http://ctep.cancer.gov/reporting/etc.html>).

50 Sulfato de vincristina

El sulfato de vincristina es un miembro de una familia de alcaloides de las vincas aislado originalmente de la planta vinca rosa (*Catharanthus roseus*). El sulfato de vincristina tiene actividad anticancerosa específica del ciclo celular. El alcaloide de vinca se une a tubulina, alterando la polimerización de tubulina conduciendo a detención de la metafase, inhibición de la mitosis celular y muerte celular. Como un agente específico del ciclo celular, su respuesta terapéutica es avanzada por la encapsulación liposómica que mantiene niveles de fármaco prolongados. Se ha mostrado que la

exposición prolongada de las células a vincristina (y otros fármacos específicos para el ciclo celular) potencia la citotoxicidad in vitro del fármaco (Bfarris *et al.*, JNCI 84; 1816-1826, 1992; Georgiadis *et al.*, Clin Cancer Res 3:449-454, 1997; Jackson and Bender, Cancer Res 39:4346-4349, 1979).

- 5 El sulfato de vincristina se aísla comúnmente como una sal de sulfato 1:1. Es un polvo cristalino higroscópico de blanco a ligeramente amarillento que es soluble en agua. Tiene un peso molecular de 923,04 (forma de sal) / 824,98 (forma de base) y una fórmula molecular de $C_{46}H_{56}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$. El nombre químico para el sulfato de vincristina es 22-oxovincalécoblastina y tiene la siguiente estructura química:



- 10 El sulfato de vincristina se prescribe como inyección USP de sulfato de vincristina (p. ej., como una solución de 1 mg/ml) y se conoce como sulfato de leurocristina, Kyocristine, vincosid, vincex, oncovin, Vincasar PFS®, está disponible comercialmente de cualquiera de un número de fuentes.

Liposomas

- 15 El componente portador liposómico de la presente invención está comprendido por una inyección de liposomas de esfingomielina y colesterol (SCLI). La relación de esfingomielina a colesterol presente en el liposoma puede variar, pero generalmente está en el intervalo de 75/25% en moles/mol de esfingomielina/colesterol a 30/50% en moles de esfingomielina/colesterol. En una realización, la composición liposómica comprende aproximadamente 70/30% mol/mol de esfingomielina/colesterol a 40/45% mol/mol de esfingomielina/colesterol. En otra realización, las composiciones liposómicas comprenden aproximadamente 55/45% mol/mol de esfingomielina/colesterol. En otra realización más, las composiciones liposómicas comprenden aproximadamente 60/40% mol/mol de esfingomielina/colesterol.

En ciertas realizaciones, pueden estar presentes lípidos adicionales en las formulaciones, por ejemplo, para prevenir la oxidación de lípidos o para unir ligandos a la superficie de los liposomas. Generalmente, la inclusión de otros lípidos dará como resultado una disminución en la relación de esfingomielina/colesterol.

- 25 Los liposomas de esfingomielina/colesterol usados en la presente invención pueden ser multilaminares o unilaminares. Métodos adecuados para preparar los liposomas incluyen, pero no se limitan a, ultrasonidos, extrusión, alta presión/homogeneización, microfluidización, diálisis con detergentes, fusión inducida por calcio de vesículas liposómicas pequeñas, evaporación en películas delgadas y métodos de infusión de éter, todos los cuales son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, está disponible una variedad de métodos para preparar liposomas como los descritos en, p. ej., Szoka, *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9:467 (1980), las Pat. EE. UU. N° 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028, 4.946.787, 5.543.152, 6.723.338, WO 91/17424, Deamer y Bangham, Biochim. Biophys. Acta, 443:629 634 (1976); Fraley, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348 3352 (1979); Hope, *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 812:55 65 (1985); Mayer, *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 858:161 168 (1986); Williams, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:242 246 (1988), el texto Liposomes, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1983, Capítulo 1, y Hope, *et al.*, Chem. Phys. Lip., 40:89 (1986).

- 35 Después de la preparación de los liposomas, los liposomas se pueden dimensionar para alcanzar el intervalo de tamaño de partícula deseado usando métodos bien conocidos en la técnica (p. ej., véase el documento US 6.723.338). Normalmente, los liposomas que se pueden usar en las preparaciones de VSLI descritas en la presente memoria tienen un intervalo de tamaño de aproximadamente 0,05-0,5 micras (50-500 nm), 0,2-0,4 micras (200-400 nm), aproximadamente 0,1-0,4 micras (100-400 nm), aproximadamente 0,05-0,2 (50-200 nm) o aproximadamente 0,5 (500 nm) a aproximadamente 0,15 micras (150 nm). En ciertas realizaciones, los liposomas tiene un tamaño de partícula que tiene un diámetro de partícula medio de aproximadamente 50 nm, aproximadamente 60 nm, aproximadamente 70 nm, aproximadamente 80 nm, aproximadamente 90 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 105 nm, aproximadamente 110 nm, aproximadamente 115 nm, aproximadamente 120 nm, aproximadamente 130 nm, aproximadamente 140 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 160 nm, 170 nm, aproximadamente 180 nm, aproximadamente 190 nm o aproximadamente 200 nm. En una realización, el tamaño de partícula medio está entre 40 45 90 y 125 nm con el tamaño de partícula medio preferido aproximadamente 107,5 nm, donde 25% de la distribución

del tamaño de partícula no es menor de 70nm y donde 90% de la distribución tiene un tamaño de partícula de no más de 170 nm.

5 Los liposomas de esfingomielina/colesterol funcionan como el componente liposómico usado en las preparaciones de VSLI descritas en la presente y se fabrican de modo que el interior del liposoma tenga un pH bajo. Durante el procedimiento de reconstitución, la VSI, que tiene un pH bajo, y la SPLI, que tiene un pH bajo, se diluyen en un tampón de un pH superior, con lo que el pH final de la solución de VSLI externa es pH aproximadamente fisiológicamente neutro. El resultado es la creación de un gradiente de pH a través de la membrana lipídica en el que el pH es inferior en el núcleo interior de los liposomas que en la solución circundante exterior. Estos gradientes se alcanzan según métodos conocidos (p. ej., el documento US 6.723.338). Por ejemplo, los gradientes se pueden alcanzar al formular los liposomas en presencia de un tampón con un pH entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6, un pH entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, y a continuación transferir posteriormente los liposomas a un pH superior, por ejemplo, de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5. En una realización, los liposomas tienen un pH interior de aproximadamente 4,0. Se puede usar cualquier número de tampones de dilución, tales como fosfato sódico. En una realización, el tampón tiene un pH de 8-10, preferiblemente 9,0, de modo que la solución liposómica externa diluida final cuando esté mezclada con VSI y SPLI tenga un pH neutro fisiológico.

Antes del uso en la preparación de VSLI según los métodos descritos en la presente, los liposomas de SPLI se pueden almacenar en condiciones refrigeradas durante períodos sustanciales antes de la encapsulación del fármaco y la reconstitución de VSLI para la administración a un paciente. Alternativamente, los liposomas se pueden deshidratar, almacenar y a continuación rehidratar antes del uso según métodos bien conocidos (Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. 5.077.056 o 5.736.155).

Preparación de VSLI

La VSLI se prepara con técnicas asépticas estrictas, por ejemplo, en una cabina de seguridad biológica o mediante procedimientos de seguridad en farmacia establecidos para la preparación de formulaciones inyectables estériles y fármacos peligrosos. Se deben seguir estrictamente procedimientos para el manejo y la eliminación de fármacos anticancerosos (Alerta NIOSH: Preventing occupational exposure to antineoplastic and other hazardous drugs in healthcare settings. 2004. Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE.UU., Servicio de Salud Pública, Centros para el control y la prevención de enfermedades, Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional, DHHS (NIOSH) Publicación N° 2004-16; Manual técnico OSHA, TED 1-0,15A, Sección VI: Capítulo 2. Controlling Occupational Exposure to Hazardous Drugs. OSHA, 1999; American Society of Health-System Pharmacists. ASHP guidelines on handling hazardous drugs. Am J Health-Syst Pharm. (2006) 63:1172-1193; Polovich M, White JM, Kelleher LO (eds.) 2005. Chemotherapy and biotherapy guidelines and recommendations for practice (2ª ed.) Pittsburgh, PA: Oncology Nursing Society)

El procedimiento para preparar una VSLI reconstituida comprende las siguientes etapas generales:

- 35 • Se prepara una solución reconstitutiva al mezclar en un recipiente estéril una primera solución de sulfato de vincristina que contiene entre aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml o aproximadamente 5 mg/ml en un tampón que contiene de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mg/ml de manitol (también se pueden usar otros excipientes farmacéuticamente aceptables en los que el sulfato de vincristina permanezca estable) a un pH de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 5,5, o de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 4,7, con una segunda solución de liposomas suspendidos en un tampón a pH bajo (p. ej., aproximadamente 4,0) en una relación de concentraciones apropiadas, por ejemplo, de 0,1/1,0 a 0,2/1,0 (peso de sulfato de vincristina con respecto a peso de lípido).
- 40 • A continuación, el pH de la solución reconstitutiva que contiene el sulfato de vincristina y liposomas se eleva hasta de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5 para crear un gradiente de pH. Esto se puede efectuar, por ejemplo, mediante la adición de un tampón (p. ej., fosfato sódico) a un pH superior (p. ej., aproximadamente 9,0).
- 45 • A continuación, la solución reconstitutiva se calienta durante al menos de aproximadamente 13 a aproximadamente 18 minutos en un termobloque seco equilibrado hasta aproximadamente 75°C, que contiene pocillos calibrados menos de aproximadamente 5% mayores que la longitud o el diámetro medios del recipiente que contiene la solución reconstitutiva para producir el producto reconstituido, VSLI.
- 50 • A continuación, la solución reconstitutiva calentada que comprende el producto reconstituido se deja equilibrar durante al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos o al menos aproximadamente 60 minutos hasta temperatura ambiente (de 15°C a 30°C).
- 55 • A continuación, un volumen de la solución reconstitutiva correspondiente a la dosis de la VSLI reconstituida que se va a administrar al paciente se mezcla con una solución adecuada para la administración intravenosa hasta un volumen final de aproximadamente 100 ml.

En algunas realizaciones, se proporcionan soluciones de sulfato de vincristina, liposomas y tampón de pH alto en tres recipientes separados. En ciertas realizaciones, las tres soluciones se reconstituyen en un recipiente estéril con una capacidad para contener el volumen combinado de las soluciones, por ejemplo, aproximadamente 20-50 ml, aproximadamente 25-40 ml o aproximadamente 30-35 ml.

5 En una realización, los componentes separados se proporcionan como un estuche ("kit") que incluye 3 o más viales. Al menos uno de los viales contiene una solución de vincristina que contiene, p. ej., 1 mg/ml, 2 mg/ml o 5 mg/ml de sulfato de vincristina en tampón que contiene, p. ej., 100 o 200 mg/ml de manitol (también se pueden usar otros excipientes que sean farmacéuticamente aceptables, y en los que la vincristina permanezca estable durante períodos prolongados), y se ajusta hasta pH 3,5 a 5,5, o preferiblemente de pH 4,5 a pH 4,7. Uno de los viales contiene una
10 solución que comprende liposomas de esfingomiélinea y colesterol suspendidos en un tampón de citrato 300 mM a, p. ej., pH 4,0. Otro vial o viales contienen un tampón de fosfato alcalino (p. ej., pH 9,0) tal como fosfato sódico dibásico, 14,2 mg/ml (20 ml/vial).

15 En una realización, los ingredientes para la reconstitución de VSLI se proporcionan separadamente en tres viales que contienen (i) sulfato de vincristina USP (5 mg/5 ml), que es equivalente a 4,5 mg/5 ml de base libre de vincristina, y 500 mg/5 ml de manitol; (ii) inyección de liposomas de esfingomiélinea/colesterol (SPLI) que consiste en 73,5 mg/ml de esfingomiélinea, 29,5 mg/ml de colesterol, 33,6 mg/ml de ácido cítrico, 35,4 mg/ml de citrato sódico y no más de 0,1% de etanol; y (iii) inyección de fosfato sódico (SPI) que contiene 355 mg/25 ml de fosfato sódico dibásico y 225 mg/25 ml de cloruro sódico, todos preparados con agua para inyección.

20 Los recipientes usados en los métodos de la invención son estériles y están compuestos por cualquier sustancia farmacéuticamente aceptable (p. ej., vidrio o plástico). Existe un número de diferentes tipos y dimensiones de viales que son vendidos comercialmente por un número de diferentes fabricantes (p. ej., Wheaton Products, Thomas Scientific). En una realización, los componentes se reconstituyen en un vial estéril con un diámetro medio de aproximadamente 36,5 mm, y un intervalo medio de aproximadamente 35,8 a aproximadamente 37,3 mm.

25 Calentadores de bloque seco adecuados, que proporcionan una fuente de temperatura constante seca y segura, están disponibles comercialmente de un número de fuentes (p. ej., Bibby Scientific Ltd, V&P Scientific, Inc., Fisher Scientific Inc., VWR Scientific, Thermolyne Inc.). Las inserciones termoconductoras que tienen uno o más orificios calibrados adaptados para recibir el recipiente de solución reconstitutiva pueden ser de metal (p. ej., aluminio anodizado, cobre) u otros materiales termoconductores adecuados. Las inserciones que contienen orificios de aberturas del tamaño apropiado se pueden obtener fácilmente (p. ej., V&P Scientific, Inc.) o se pueden fabricar usando métodos estándar.
30 En ciertas realizaciones, el termobloque contiene aberturas que son entre aproximadamente 1-5%, o aproximadamente 4,5%, 4,2%, 4,0%, 3,8%, 3,5%, 3,3%, 3,0%, 2,8%, 2,5%, 2,2%, 2,0%, 1,8%, 1,5%, 1,2% o 1,0% mayores que la longitud o el diámetro medio del recipiente que contiene la solución reconstitutiva. En algunas realizaciones, el termobloque contiene aberturas cilíndricas. En una realización, las aberturas están entre 37,2 y 37,8 mm de diámetro, o entre aproximadamente 37,4 y 37,6 mm de diámetro.

35 En algunas realizaciones, la solución reconstitutiva se calienta durante aproximadamente 13 minutos, aproximadamente 14 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 16 minutos, aproximadamente 17 minutos a aproximadamente 75°C. En una realización, la solución reconstitutiva se calienta durante aproximadamente 14 minutos en un termobloque equilibrado a 75°C.

40 La VSLI reconstituida se puede mezclar con un diluyente farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración intravenosa al paciente (p. ej., dextrosa, cloruro sódico) que se puede proporcionar, por ejemplo, en un recipiente estéril (botella de vidrio, botella de plástico o bolsa de plástico) precargado. En algunas realizaciones, el volumen de la dosis calculada del paciente se retira de una bolsa de infusión y se reemplaza por el volumen calculado de la solución de VSLI reconstituida en una bolsa para infusión, por ejemplo, donde el volumen final del recipiente de infusión será 100 ml. En una realización, los diluyentes farmacéuticamente aceptables son inyección de dextrosa al
45 5 % o inyección de cloruro sódico al 0,9%.

VSLI

La VSLI producida según los métodos descritos en la presente memoria aparece como una suspensión translúcida de blanca a blancuzca, esencialmente libre de materia extraña y agregados visibles. Normalmente, más de
50 aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% o más del sulfato de vincristina se encapsula en los liposomas.

La VSLI producida según los métodos descritos en la presente memoria contiene impurezas totales de menos de aproximadamente 4,0%, 3,5%, 3,4%, 3,2%, 3,1% o 3,0%. En algunas realizaciones, la VSLI contiene menos de aproximadamente 2,0%, 1,8%, 1,7%, 1,6%, 1,5%, 1,4% o 1,3% de N-desformilvincristina.

55 La VSLI producida según los métodos descritos en la presente memoria tiene una velocidad de liberación in vitro (IVR, por sus siglas en inglés) o una velocidad de liberación in vivo media de al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84% o aproximadamente 85% en 72 horas.

Se conocen en la técnica ensayos para determinar el nivel de encapsulación de vincristina, los niveles de impurezas y las velocidades de liberación de vincristina desde liposomas. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. 5543152 y 5837282; Zhigalstev *et al.* J. Controlled Release 104:103-111, 2005); Puscalau *et al.* Am. J. Health-Syst. Pharm. 62:1606-1612, 2005).

- 5 Generalmente, la VSLI producida según los métodos descritos en la presente memoria contiene sulfato de vincristina en de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml. En ciertas realizaciones, el sulfato de vincristina está presente en de aproximadamente 0,15 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml. En una realización, el sulfato de vincristina está presente en aproximadamente 0,16 mg/ml. En una realización, la VSLI contiene 5 mg de sulfato de vincristina, 500 mg de manitol, 73,5 mg de esfingomielina, 29,5 mg de colesterol, 36 mg de citrato sódico, 38 mg de ácido cítrico, 355 mg de fosfato sódico y 225 mg de cloruro sódico.

Dosificación y administración

- 15 Se puede usar VSLI preparada según los métodos descritos en la presente memoria para tratar cualquier tipo de cáncer incluyendo cánceres primarios, recidivantes y refractarios. El paciente o sujeto tratado con la VLSI puede ser una variedad de animales, incluyendo seres humanos, primates no humanos, especies aviares, especies equinas, especies caninas, especies felinas, especies bovinas, cerdos, lagomorfos, roedores y similares. En ciertas realizaciones, la VSLI se usa para tratar cánceres de los sistemas sanguíneo y linfático incluyendo, pero no limitados a, linfomas, leucemias y mielomas. En ciertas realizaciones, la VSLI se usa para tratar tumores incluyendo, pero no limitados a, neuroblastomas y cánceres cerebrales.

- 20 La VSLI se puede usar como un solo agente o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos, tales como ciclofosfamida, doxorubicina y/o prednisona. En una realización, la VSLI se administra junto con ciclofosfamida, doxorubicina y prednisona como una formulación de CHOP liposómica ("lipo-CHOP). En otra realización, la VSLI se coadministra con al menos un agente antitumoral adicional. En otra realización, el agente antitumoral adicional es un anticuerpo monoclonal antitumoral, tal como Oncoly™, Rituxan™ o Bexxar™. En otra realización, el agente antitumoral adicional es un fármaco antisentido o una vacuna antitumoral. En otra realización, la VSLI se coadministra con un tratamiento profiláctico o terapéutico para la neurotoxicidad, tal como gabapentina (Neurontin™).

Normalmente, la VSLI se prepara aproximadamente en las 24 horas antes de la administración al paciente y se almacena a temperatura ambiente (de 15°C a 30°C) o refrigerada (2-8°C).

- 30 La VSLI se administra al paciente sistémicamente mediante aporte intravenoso. En una realización, la VSLI se administra mediante infusión intravenosa a lo largo de un período de, p. ej., aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 90 minutos o más.

Normalmente, la VSLI se administra periódicamente, p. ej., una vez cada 7-28 días. En ciertas realizaciones, la VSLI se administra una vez cada 3, 5, 7, 10, 14, 21 o 28 días. En una realización, la VSLI se administra mediante infusión intravenosa cada 14 días. En otra realización, la VSLI se administra mediante infusión intravenosa cada 7 días. Según se usa en la presente memoria, cada administración de VSLI se considera un "ciclo" de tratamiento.

- 35 La cantidad de VSLI administrada por dosis dependerá de un número de factores, tales como los antecedentes médicos del paciente, el uso de otras terapias y la naturaleza de la enfermedad (p. ej., cáncer de primera línea, recidivante o refractario). Normalmente, la VSLI preparada según los métodos descritos en la presente memoria se administra en una dosificación de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,4 mg/m². En ciertas realizaciones, la VSLI se administra en una dosis de aproximadamente 1,5 mg/m², aproximadamente 1,8 mg/m², aproximadamente 2,0 mg/m², 2,1 mg/m², 2,2 mg/m², 2,3 mg/m² o 2,4 mg/m² (es decir, mg de vincristina por m² de superficie corporal). En una realización, la VSLI se administra en una dosis de 2,25 mg/m² mediante infusión intravenosa a lo largo de aproximadamente 60 minutos una vez cada 7 días.

- 45 En otras realizaciones, la dosis de VSLI se puede interrumpir y/o reducir temporalmente durante el tratamiento. Por ejemplo, en una realización, la dosificación de VSLI administrada a un paciente que describe una neuropatía periférica de Grado 3 o una neuropatía periférica de Grado 2 persistente se puede suspender durante hasta aproximadamente 7 días, y a continuación reducir hasta una dosis de aproximadamente 2 mg/m² con una recuperación hasta el Grado 1 o 2. En otra realización, la dosificación administrada a un paciente que describe una neuropatía periférica de Grado 2 persistente, incluso después de recibir una dosis reducida, se puede suspender durante hasta 7 días, y a continuación reducir hasta una dosis de 1,825 mg/m² o una dosis de 1,5 mg/m².

- 50 La dosificación de VSLI se determina al calcular el área de superficie corporal (BSA, por sus siglas en inglés) del sujeto según métodos muy conocidos. Por ejemplo, según la fórmula de Mosteller en la que la BSA es igual a la raíz cuadrada del producto del peso del sujeto en kg por la altura en cm dividido por 3600. Generalmente, se toma que la BSA "normal" en seres humanos es 1,7 m² pero también depende de otros factores incluyendo la edad y el sexo del individuo. Por ejemplo:

- 55 • BSA media para hombres adultos: 1,9 m²

- BSA media para mujeres adultas: 1,6 m²
- BSA media para niños (9 años): 1,07 m²
- BSA media para niños (10 años): 1,14 m²
- BSA media para niños (12-13 años): 1,33 m²

5 (Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. N Engl J Med 1987;317:1098)

Ejemplos

Ejemplo 1

10 El perfil de temperatura de la solución del vial de VSLI se investigó durante el calentamiento con el procedimiento del bloque seco y se comparó con el perfil de temperatura observado cuando se calentaba con un baño de agua siguiendo las instrucciones etiquetadas aprobadas para Marqibo® (ID de referencia FDA/cder: 3172211, Agosto de 2012).

Equipo y materiales

- VSLI reconstituida con el estuche Marqibo®, lote NT 268035 (contenidos de viales parcialmente usados combinados en un vial)
- 15 • Calentador Techne Dri-block® DB-3 equipado con un pocillo de 3,759 cm (1,480 pulgadas) de diámetro y receptáculo para termómetro (Bibby Scientific Limited).
- Termómetros digitales; precisión hasta $\pm 1^{\circ}\text{C}$ en el intervalo de 0° - 100°C
- Baño de agua Isotemp 202 n° 00947 (Fisher Scientific)
- Calibrador de la temperatura de termopar Fluke 726 n° 914002 (Fluke Corporation)

Procedimiento

20 Las medidas del perfil de temperatura se generaron al registrar la temperatura de la solución dentro del vial después de ponerse en el aparato de calentamiento (es decir, bloque seco o baño de agua). El tiempo cero era el punto en el que el vial se ponía en el aparato de calentamiento. Se usó el siguiente procedimiento:

25 1. Los componentes, VSI y SCLI, se combinaron en un solo vial de SPI (Swiss Precision Instruments, Inc.). Un termopar digital se insertó a través del tabique del vial y se mantuvo aproximadamente a 5 mm de la superficie inferior del vial y situado en el medio de la solución líquida.

30 2. El calentador de bloque seco se usó con un bloque que contenía una cavidad para recipientes de tipo vial de 3,759 cm (1,480 pulgadas). La temperatura del bloque se comprobó al poner un termopar en la cavidad para el termómetro del bloque, que está situada cerca de la cavidad para recipientes de tipo vial. El calentador de bloque se graduó a una temperatura de 75°C y se dejó calentar hasta que el termómetro del bloque medía $75 \pm 2^{\circ}\text{C}$. El bloque calentado se equilibró durante un mínimo de 15 minutos a $75 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A continuación, el vial se insertó en el pocillo del bloque equilibrado a $75 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 14 minutos \pm 15 segundos, y a continuación se retiró. El vial reconstituido se dejó llegar hasta temperatura ambiente al poner en condiciones ambientales durante aproximadamente 60 minutos. El procedimiento se repitió dos veces usando el mismo vial.

35 3. La temperatura del líquido interno del vial y las temperaturas del bloque se registraron a intervalos de 1 minuto (o según se apunte) y se tabulan en la Tabla 1.

4. Para comparación, el baño de agua se dejó calentar hasta que la temperatura del agua fuera $65 \pm 5^{\circ}\text{C}$. El baño de agua se equilibró durante un mínimo de 15 minutos. A continuación, el vial que contenía VSLI reconstituida se insertó en el baño de agua durante 10 minutos \pm 1 minuto, y a continuación se retiró. Los viales reconstituidos se dejaron llegar hasta temperatura ambiente.

5. La temperatura del líquido interno del vial, el tiempo y la temperatura del agua se registraron y se tabulan en la Tabla 1.

Resultados y discusión

5 El perfil de temperatura del calentamiento del contenido de líquido de un vial de VSLI reconstituida con un bloque seco equilibrado a $75^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ demuestra una velocidad de calentamiento uniforme y gradual hasta $65^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$. Los resultados tabulados en la Tabla 1 y la Figura 1 muestran que el bloque seco calentaba el contenido de líquido del vial a una velocidad media de $3,26^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ en comparación con el baño de agua, que calentaba el contenido del vial a una velocidad media de $4,21^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. La temperatura deseada de $65^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$ se alcanzaba en 14 minutos en el bloque seco en comparación con el baño de agua que empleaba 10 minutos. Con ambos aparatos de calentamiento, una vez que el vial se retiraba de la fuente de calentamiento, había un enfriamiento gradual. La temperatura permanecía dentro de $59\text{-}65^{\circ}\text{C}$ durante 3-4 minutos después de la retirada del bloque seco y 1-2 minutos después de la retirada del baño de agua. Con ambos aparatos, el vial se exponía hasta $50\text{-}65^{\circ}\text{C}$ durante al menos 20 minutos con el bloque seco y 15 minutos con el baño de agua. Después del calentamiento en cualquier aparato, las soluciones permanecían visualmente idénticas: una suspensión translúcida de blanco a blanquizco esencialmente libre de materia extraña y agregados visibles.

Tabla 1. Perfil de temperaturas de reconstitución*

Tiempo	Temperatura Interna BC	Temp. Bloque	Temperatura Interna BC	Temp. Bloque 2	Temp. Interna BA	Baño de Agua
0	20,3	75,3	22,8	75,4	20,9	63,8
1	25,6	74,7	29,9	74,8	35,4	63,8
2	31,6	74,0	36,1	74,0	45,6	63,9
3	37,0	73,5	41,3	73,6	51,7	63,4
4	41,9	73,3	45,5	73,4	56,1	63,7
5	46,2	73,2	49,1	73,4	58,8	63,6
6	49,8	73,2	52,4	73,4	60,3	64,0
7	53,0	73,3	55,2	73,4	61,3	64,4
8	55,6	73,4	57,5	73,5	62,2	64,0
9	57,9	73,6	59,7	73,8	62,7	63,8
10	60,8	73,8	61,4	73,9	63,0	63,8
11	62,1	73,9	62,8	74,1	59,0	NR
12	63,3	74,1	64,4	74,2	56,6	NR
13	64,6	74,1	65,4	74,3	54,8	NR
14	65,8	74,3	66,4	74,4	53,1	NR
15	65,6	NR	66,1	NR	52,0	NR
16	64,1	NR	63,7	NR	51,2	NR
17	62,7	NR	NR	NR	50,3	NR
18	61,2	NR	60,6	NR	49,3	NR
19	59,8	NR	59,3	NR	48,7	NR
20	58,6	NR	58,0	NR	48,0	NR
21	57,4	NR	56,5	NR	NR	NR
22	56,1	NR	55,3	NR	NR	NR
23	55,0	NR	54,2	NR	NR	NR
24	53,9	NR	53,2	NR	NR	NR
25	52,8	NR	NR	NR	44,4	NR

ES 2 730 405 T3

26	51,7	NR	NR	NR	NR	NR
27	50,8	NR	NR	NR	NR	NR
28	49,8	NR	NR	NR	NR	NR
	NR	NR	NR	NR	NR	NR
33	45,6	NR	NR	NR	NR	NR
38	42,3	NR	NR	NR	NR	NR
43	39,4	NR	NR	NR	NR	NR
48	37,3	NR	NR	NR	NR	NR
53	35,3	NR	NR	NR	NR	NR
58	33,9	NR	NR	NR	NR	NR
60	33,3	NR	NR	NR	NR	NR

*Temp. Interna BC = temperatura interna del contenido del vial calentado en el bloque seco

Temp. Interna BA = temperatura interna del contenido del vial calentado en el baño de agua

NR= No registrado

Conclusión

- 5 Este estudio demostraba que el bloque seco daba como resultado un perfil de calentamiento de temperatura adecuada que permite que la temperatura del líquido de los viales de VSLI alcance $65 \pm 5^\circ\text{C}$ en menos de 14 minutos, y proporcionaba una exposición al calentamiento en el intervalo de $50\text{-}65^\circ\text{C}$ de 20 minutos. Esto se compara con el calentamiento de los viales en un baño de agua, que alcanza una temperatura del líquido interno de $65 \pm 5^\circ\text{C}$ en 10 minutos y una exposición al calentamiento global en el intervalo de $50\text{-}65^\circ\text{C}$ de 15 minutos. La velocidad de calentamiento para ambos métodos era gradual y uniforme. El bloque seco graduado a $75 \pm 2^\circ\text{C}$ producía una velocidad de calentamiento de $3,26^\circ\text{C}$ por minuto, y el baño de agua graduado a $65 \pm 5^\circ\text{C}$ producía una velocidad de $4,21^\circ\text{C}$ por minuto. El calentamiento se nivelaba con el baño de agua, mientras que la velocidad de calentamiento en el bloque seco continuaba a una velocidad estacionaria hacia el punto fijado de $75 \pm 2^\circ\text{C}$. El enfriamiento hasta temperatura ambiente llevaba aproximadamente 60 minutos una vez que los viales se retiraban de cualquier aparato se calentamiento. Estos perfiles de calentamiento sugieren que la encapsulación casi cuantitativa de vincristina es un proceso termodinámico que depende de la exposición global a temperaturas que promueven la encapsulación en membranas en lugar de la cinética para alcanzar esas condiciones,

En resumen, el bloque seco y el baño de agua pueden proporcionar un perfil termodinámico que permite la encapsulación de vincristina en los liposomas de esfingomielina y colesterol para la preparación eficaz de VSLI.

20 Ejemplo 2

Se investigaron los niveles de productos degradantes de vincristina de una VSLI reconstituida usando un termobloque seco.

Equipo y materiales

- 25
- Techne DB-3 Dri-Block® equipado con un pocillo de 3,759 cm (1,480 pulgadas) de diámetro y receptáculo para termómetro.
 - Termómetro con un diámetro no mayor de 7 mm, y precisión hasta $\pm 1^\circ\text{C}$ en el intervalo de $0^\circ\text{-}100^\circ\text{C}$
 - Cronómetro o temporizador calibrado
 - Micrómetro [0-5 cm (0-2 pulgadas)] o equivalente.
 - 30 Estuches Marqibo®, Lote N° TTX0611 (Talon Therapeutics, Inc.)

30 Procedimiento

ES 2 730 405 T3

Se usaron en el estudio viales procedentes de 30 estuches Marqibo® que tenían viales de SPI con los diámetros máximo y mínimo. El diámetro de los viales de SPI se midió y se registró hasta los 0,0025 cm (0,001 pulgadas) más cercanos. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Identificación de viales y diámetro de los viales de SPI

Identificación del Vial	Diámetro de los Viales de SPI [$\pm 0,00025$ cm (0,0001 pulgadas)]	Asignación del Estudio
1	3,6449 (1,4350)	
2	3,6474 (1,4360)	
3	3,6424 (1,4340)	
4	3,6449 (1,4350)	
5	3,6805 (1,4490)	
6	3,6716 (1,4455)	
7	3,6398 (1,4330)	
8	3,6500 (1,4370)	
9	3,6449 (1,4350)	
10	3,6360 (1,4315)	
11	3,6589 (1,4405)	
12	3,6944 (1,4545)	estuche 2
13	3,6411 (1,4335)	
14	3,6500 (1,4370)	
15	3,6652 (1,4430)	
16	3,6525 (1,4380)	
17	3,6436 (1,4345)	
18	3,6335 (1,4305)	estuche 1
19	3,6398 (1,4330)	
20	3,6716 (1,4455)	
21	3,6474 (1,4360)	
22	3,6386 (1,4325)	
23	3,6640 (1,4425)	
24	3,6741 (1,4465)	
25	3,6767 (1,4475)	
26	3,6386 (1,4325)	
27	3,6627 (1,4420)	
28	3,6678 (1,4440)	
29	3,6360 (1,4315)	
30	3,6398 (1,4330)	

ES 2 730 405 T3

Se seleccionaron dos viales para la reconstitución. El vial que tenía un diámetro más cercano a o igual a 3,58 cm (1,41 pulgadas) ("vial 1"), el extremo inferior del diámetro del vial de SPI permitido, tenía un diámetro medido de 3,6335 cm (1,4305 pulgadas). Se midió que el vial que tenía un diámetro más cercano a o igual a 3,73 cm (1,47 pulgadas) ("vial 2"), el extremo superior del diámetro del vial de SPI permitido, tenía un diámetro de 3,6944 cm (1,4545 pulgadas).

- 5 Los estuches seleccionados se reconstituyeron como se describe anteriormente y se prueban con respecto al sulfato de vincristina, compuestos relacionados y tamaño y distribución de partículas siguiendo métodos de USP de inyección de sulfato de vincristina adaptados.

- 10 Los dos estuches de estudio se reconstituyeron usando las instrucciones anteriores, excepto que en lugar del baño de agua, se usó el calentador Dri-Block con un bloque que contenía una cavidad para recipientes de tipo vial de 3,759 cm (1,480 pulgadas). La temperatura del bloque se comprobó al poner un termómetro en la cavidad para el termómetro del bloque que está situado junto con la cavidad para recipientes de tipo vial. El calentador de bloque se graduó hasta una temperatura de 75°C y se dejó calentar hasta que el termómetro del bloque medía $75 \pm 2^\circ\text{C}$. A continuación, el bloque calentado se equilibró durante un mínimo de 15 minutos (tiempo registrado). Las condiciones se anotan en la Tabla 3. A continuación, cada vial se insertó en el bloque calentado a $75 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 14 minutos \pm 15 segundos (tiempo registrado), y a continuación se retiró y se dejó llegar hasta temperatura ambiente al poner el vial en condiciones ambientales a lo largo de aproximadamente 60 minutos.

El tiempo y las temperaturas del bloque se registraron según se indica en la Tabla 4 durante la reconstitución. Los resultados analíticos se registraron en las Tablas 5, 6 y 7.

Tabla 3. Equilibrado de la temperatura del bloque seco

	Tiempo	Tiempo entre lecturas sucesivas
Bloque seco graduado hasta 75°C	8:35 AM	
En primer lugar el termómetro mide $75 \pm 2^\circ\text{C}$	8:46 AM	73,0°C
15 minutos de equilibrado	9:01 AM	75,2°C

20

Tabla 4. Parámetros de reconstitución del bloque seco

ID de Vial	Diámetro del Vial de SPI	Temperatura T=0 min.	Temperatura T=1 min.	Temperatura T=5 min.	Temperatura T=14 min.	Tiempo en la retirada
		$75 \pm 1^\circ\text{C}$	Para inform.	Para inform.	$75 \pm 1^\circ\text{C}$	14 min \pm 15 s
12	3,6944 cm (1,4545 pulgadas)	75,2°C	74,5°C	73,2°C	74,2°C	9:24AM
18	3,6335 cm (1,4305 pulgadas)	75,2°C	74,6°C	73,2°C	74,3°C	10:02AM

Tabla 5. Resultados de vincristina total y libre

ID de estuche	Vincristina total
Estuche 1	102,10%
Estuche 2	102,14%

25 Tabla 6. Resultados de compuestos relacionados

ID de estuche	N-Desformilvincristina	Cualquier otro compuesto
Estuche 1	1,314	0,572
Estuche 2	1,345	0,574

Tabla 7. Distribución del tamaño de partícula

ID de estuche	Diámetro medio	D ₂₅	D ₉₀
Estuche 1	108 nm	90 nm	139 nm
Estuche 2	107 nm	91 nm	138 nm

Resultados y discusión

La reconstitución de VSLL se alcanzó usando viales de reconstitución que tenían un diámetro de 3,6335 cm (1,4305 pulgadas) y 3,6944 cm (1,4545 pulgadas) usando el calentador Dri-Block. Estos representaban viales más cercanos al límite inferior de 3,58 cm (1,41 pulgadas) y los límites superiores de 3,73 cm (1,47 pulgadas) permitidos para los diámetros de los viales. Durante los 14 minutos de incubación de los viales de VSLL en el termobloque, la temperatura del bloque caía no más de 1 grado debido al equilibrio de temperatura entre el espacio vacío entre el diámetro del pocillo del bloque y cualquier diámetro de los viales. Esta cinética de la transferencia de calor no afectaba a la preparación de VSLL. Después de 14 minutos de exposición al Dri-Block termoequilibrado a 75°C, la VSLL reconstituida resultante procedente de ambos viales alcanzaba más de 97% de encapsulación de vincristina. La incubación usando el Dri-Block daba como resultado una eficacia de encapsulación que tenía como promedio 2,175% de vincristina libre. No se observaron impurezas nuevas o incrementadas con el perfil de calentamiento del Dri-Block. El degradante principal, N-desformilvincristina, se observó en una media de 1,33%, sin otra impureza mayor de 0,574%, e impurezas totales de no más de 3,10%. La distribución del tamaño de partícula estaba de acuerdo con las especificaciones de VSLL con un diámetro promedio de 107,5 nm y un D₂₅ medio de 90,5 nm y D₉₀ de 138,5 nm, la VSLL preparada con calentamiento con Dri-Block liberaba aproximadamente 84 por ciento de la vincristina a las 72 horas mediante análisis por IVR.

En conclusión, la VSLL reconstituida usando el calentador de bloque seco equilibrado a 75 ± 2° con un período de incubación de 14 minutos ± 15 segundos encapsulaba más de 99% de vincristina en los liposomas de esfingomielina/colesterol, y no se registraban anomalías durante este experimento. Los datos establecen un perfil de temperatura de reconstitución en bloque seco que conduce a un producto que encapsula eficazmente vincristina y demuestra que el calentador de bloque seco se puede sustituir por un baño de agua en la reconstitución de VSLL.

Ejemplo 3

En este estudio, se midieron los niveles de productos degradantes de vincristina para proporcionar un intervalo del tiempo de reconstitución usando el procedimiento en bloque seco.

Equipo y materiales

- Dri-Block® equipado con un pocillo de 3,749 cm (±0,010 cm) (1,476 pulgadas (±0,004 pulgadas)) de diámetro y receptáculo para termómetro.
- Termómetro con un diámetro no mayor de 7 mm, y precisión hasta ± 1°C en el intervalo de 0°-100°C
- Cronómetro o temporizador calibrado
- Estuches Marqibo®, Lote n° TTX0611 (Talon Therapeutics, Inc.)

Procedimiento

Se seleccionaron tres estuches Marqibo® aleatoriamente y se reconstituyeron al calentar en el bloque seco en tres momentos diferentes (13, 14 y 15 minutos, respectivamente) a 75°C. Los viales reconstituidos se probaron con respecto al sulfato de vincristina total y libre, los compuestos relacionados, el tamaño y la distribución de partículas, usando métodos de inyección de USP de sulfato de vincristina adaptados.

Los estuches de estudio se reconstituyeron usando las instrucciones que se describen anteriormente, excepto que, en lugar un baño de agua, se usó el calentador Dri-Block® con un bloque que contenía una cavidad para recipientes de tipo vial de 3,749 cm (±0,010 cm) (1,476 pulgadas (±0,004 pulgadas)). La temperatura del bloque se comprobó al poner un termómetro en la cavidad para el termómetro del bloque que está situado junto con la cavidad para el recipiente de tipo vial. El bloque se graduó hasta una temperatura de 75°C y se dejó calentar hasta que el termómetro del bloque medía 75 ± 2°C. A continuación, el bloque calentado se equilibró durante un mínimo de 15 minutos. Las condiciones se registraron en la Tabla 9. A continuación, cada vial se insertó en el bloque calentado a 75 ± 2°C durante 13 minutos ± 15 segundos, 14 minutos ± 15 segundos y 15 minutos ± 15 segundos, respectivamente. A continuación,

ES 2 730 405 T3

los viales se retiraron y se pusieron a temperatura ambiente. Los viales reconstituidos se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante al menos 60 minutos antes de la prueba.

El tiempo y las temperaturas del bloque se registraron según se indica en las Tabla 9 y 10 durante la reconstitución. Los resultados analíticos se registraron en las Tablas 11, 12 y 13.

5 Tabla 9a. Equilibrado de la temperatura del bloque seco (Vial 1)

	Tiempo	Tiempo entre lecturas sucesivas
Bloque seco graduado hasta 75°C	8:20 AM	
En primer lugar el termómetro mide 75 ± 2°C	8:48 AM	NA
15 minutos de equilibrado*	9:03 AM	15 min

*Temperatura al final del período de equilibrado de 15 minutos: 75,2°C

Tabla 9b. Equilibrado de la temperatura del bloque seco (Vial 2)

	Tiempo	Tiempo entre lecturas sucesivas
Bloque seco graduado hasta 75°C	9:17 AM	
En primer lugar el termómetro mide 75 ± 2°C	9:17 AM	NA
15 minutos de equilibrado*	9:32 AM	15 min

*Temperatura al final del período de equilibrado de 15 minutos: 75,2°C

Tabla 9c. Equilibrado de la temperatura del bloque seco (Vial 2)

	Tiempo	Tiempo entre lecturas sucesivas
Bloque seco graduado hasta 75°C	9:47 AM	
En primer lugar el termómetro mide 75 ± 2°C	9:47 AM	NA
15 minutos de equilibrado*	10:02 AM	15 min

10 *Temperatura al final del período de equilibrado de 15 minutos: 75,1°C

Tabla 10. Parámetros de reconstitución del bloque seco

ID de Vial	Diámetro del Vial de SPI	Temperatura T=0 min.	Temperatura T=1 min.	Temperatura T=5 min.	Temperatura T=13 min.	Temperatura T=14 min.	Temperatura T=15 min.
		75±1°C	Para inform.	Para inform.	± 15 s	± 15 s	± 15 s
1	1,4490	75,2°C	74,6°C	73,2°C	74,2°C		
2	1,4360	75,2°C	74,5°C	73,2°C		74,1°C	
3	1,4355	75,2°C	74,6°C	73,3°C			74,2°C

Tabla 11. Resultados de vincristina total y libre

ID de estuche	Vincristina total
Estuche 1	100,91
Estuche 2	100,59
Estuche 3	100,43

15

Tabla 12. Resultados de compuestos relacionados

ID de estuche	N-Desformilvincristina	Cualquier otro compuesto
Estuche 1	1,498	0,590
Estuche 2	1,506	0,587
Estuche 3	1,464	0,593

Tabla 13. Distribución del tamaño de partícula

ID de estuche	Diámetro medio	D ₂₅	D ₉₀
Estuche 1	107 nm	91 nm	137 nm
Estuche 2	106 nm	90 nm	137 nm
Estuche 3	107 nm	90 nm	138 nm

Resultados y discusión

- 5 Cada estuche reconstituido se puso en un termobloque equilibrado a 75°C durante 13, 14 y 15 minutos, respectivamente. Todos los tiempos de muestreo producían vincristina encapsulada y no se apreciaban diferencias significativas en los resultados de prueba entre los tres viales. Se observaba más de 97% de encapsulación de vincristina con los tres viales usando el Dri-Block, dando como resultado una eficacia de encapsulación con un máximo de 2,3% de vincristina libre. No se observaban impurezas nuevas o incrementadas con el perfil de calentamiento del
- 10 Dri-Block. El degradante principal, N-desformilvincristina, se observó en un máximo de 1,51%, sin otra impureza mayor de 0,59% e impurezas totales de no más de 3,3%. La distribución del tamaño de partícula estaba de acuerdo con las especificaciones de VSLI con un diámetro promedio de 107 nm y un D₂₅ medio de 90 nm y D₉₀ de 137 nm.

- 15 En conclusión, la VSLI reconstituida con la sustitución del baño de agua por un Dri-Block equilibrado a $75 \pm 2^\circ\text{C}$ con un período de incubación de 13 a 15 minutos (± 15 segundos) encapsulaba vincristina eficazmente y no se registraban anomalías durante la realización del experimento. Los datos establecen un perfil de temperatura de reconstitución en Dri-block que conduce a una reconstitución de VSLI eficaz y muestran que el calentador Dri-block se puede sustituir por un baño de agua en la reconstitución de la VSLI.

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritos en la presente solamente tienen propósitos ilustrativos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición líquida farmacéuticamente aceptable que comprende vincristina encapsulada en liposomas que está libre de productos de degradación sustanciales, comprendiendo el método:
 - (a) reconstituir en un vial individual
 - 5 (i) una primera solución que comprende sulfato de vincristina en una concentración de 1 mg/ml a 5 mg/ml, en donde la primera solución tiene un pH de 3,5 a 5,5; y
 - (ii) una segunda solución que comprende liposomas de esfingomielina/colesterol a un pH bajo;
 - (b) elevar el pH de la solución reconstitutiva en el vial individual hasta un pH de 7,0 a 7,5;
 - 10 (c) calentar el vial individual que comprende la solución reconstitutiva en un termobloque seco equilibrado a 75°C durante al menos de 13 a 18 minutos, en donde dicho termobloque comprende uno o más orificios 1-5% mayores que la longitud o el diámetro medios del vial individual para producir una solución que comprende vincristina encapsulada en liposomas reconstituida; y
 - (d) equilibrar la solución reconstituida hasta temperatura ambiente.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el pH de la segunda solución que comprende los liposomas es 4,0.
- 15 3. El método según la reivindicación 2, en el que la segunda solución comprende además un tampón de citrato.
4. El método según la reivindicación 1, en el que el pH de la solución reconstitutiva se eleva mediante la adición de una tercera solución que comprende un tampón a un pH de 9,0.
5. El método según la reivindicación 4, en el que la tercera solución comprende tampón de fosfato sódico.
- 20 6. El método según la reivindicación 1, en el que la solución reconstitutiva comprende una concentración de 0,1/1,0 a 0,2/2,0 en peso de sulfato de vincristina con respecto a peso de lípido.
7. El método según la reivindicación 6, en el que la concentración de sulfato de vincristina en la solución reconstituida es de 0,1 mg/ml a 0,5 mg/ml.
8. El método según la reivindicación 7, en el que la concentración de sulfato de vincristina en la solución reconstituida está en de 0,15 mg/ml a 0,2 mg/ml.
- 25 9. El método según la reivindicación 4, en el que la primera solución comprende sulfato de vincristina USP (5 mg/5 ml), que es equivalente a 4,5 mg/5 ml de base libre de vincristina, y 500 mg/5 ml de manitol, la segunda solución comprende liposomas de esfingomielina/colesterol que consisten en 73,5 mg/ml de esfingomielina, 29,5 mg/ml de colesterol, 33,6 mg/ml de ácido cítrico, 35,4 mg/ml de citrato sódico, y la tercera solución comprende 355 mg/25 ml de fosfato sódico dibásico y 225 mg/25 ml de cloruro sódico.
- 30 10. El método según la reivindicación 1, en el que los liposomas tienen un intervalo de tamaño de 0,05-0,5 micras.

Figura 1. Perfil de temperatura de reconstitución

Perfil de Temperatura de Reconstitución

