

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 068**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 9/00</b>	(2006.01) <b>C12N 15/86</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/19</b>	(2006.01) <b>A61K 38/21</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/10</b>	(2007.01) <b>A61K 48/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/12</b>	(2006.01)	
<b>A61K 47/18</b>	(2007.01)	
<b>A61K 47/26</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/70</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/704</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/7028</b>	(2006.01)	
<b>C07J 41/00</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2002 PCT/US2002/41198**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2003 WO03053365**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2002 E 02805671 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 1456377**

54 Título: **Composiciones de SYN3 y métodos**

30 Prioridad:

**20.12.2001 US 342329 P**

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

**27.02.2020**

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)  
126 East Lincoln Avenue  
Rahway, NJ 07065-0907, US**

72 Inventor/es:

**IHNAT, PETER, M.;  
WITCHEY-LAKSHMANAN, LEONORE, C.;  
SANDWEISS, VARDA y  
UGWU, SYDNEY, O.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**Observaciones:**

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

ES 2 745 068 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones de SYN3 y métodos

Campo de la Invención

5 La presente invención está dirigida a composiciones para el tratamiento contra el cáncer mediante terapia génica utilizando a un gen terapéutico, tal como un gen supresor de tumores administrado por un sistema de administración de genes, tal como un sistema de administración de vectores virales recombinantes, en combinación con un agente potenciador de la transducción. En particular, esta invención se refiere a la administración de un gen supresor de tumores (por ejemplo, P53 o retinoblastoma (RB)) a tejidos y órganos epiteliales cancerosos, como la vejiga, utilizando un sistema de administración de vectores adenovirales recombinantes formulado en un tampón estabilizado en combinación con un agente potenciador de la transducción, que es N-(3-colamidopropil)-N-(3(actobionamidopropil))-colamida (SYN3).

Antecedentes de la Invención

15 El cáncer epitelial es una enfermedad insidiosa. Por ejemplo, un tipo de cáncer epitelial, el carcinoma de vejiga, representa una fuente importante de morbilidad y mortalidad. Se ha reportado que el cáncer de vejiga ocupa el décimo lugar en hombres y el doceavo en mujeres en cuanto a la mortalidad relacionada con el cáncer. Las terapias disponibles para el tratamiento del cáncer de vejiga incluyen quimioterapia adyuvante o inmunoterapia, resección transuretral de la enfermedad superficial, cistectomía radical o radioterapia, que a menudo se combina con quimioterapia sistémica. A pesar de estas opciones terapéuticas, la supervivencia general no ha cambiado de forma apreciable. Por lo tanto, se deben desarrollar nuevas modalidades terapéuticas para el tratamiento del cáncer de vejiga.

20 Las estrategias de la terapia génica se han desarrollado como un enfoque terapéutico alternativo. Se han desarrollado distintos enfoques para tratar a las neoplasias basadas en métodos de transferencia de genes. Se ha reportado el desarrollo de métodos para corregir lesiones específicas en loci genéticos definidos que dan lugar a la transformación y a la progresión neoplásicas. La sobreexpresión de los oncogenes dominantes puede abordarse utilizando técnicas para inhibir el gen transformante o el producto génico. Se ha reportado que la pérdida de la función del gen supresor de tumores se puede abordar utilizando métodos para reconstituir al gen supresor de tumores de tipo silvestre. Además de estos métodos para lograr la compensación de mutaciones, se ha reportado el desarrollo de técnicas genéticas para erradicar de manera específica y selectiva a las células tumorales. Estos enfoques de quimioterapia molecular se basan en la expresión específica de genes de toxinas en células neoplásicas. Finalmente, los métodos de transferencia de genes se han utilizado para lograr la inmunización antitumoral. Se ha reportado que estos métodos de inmunopotenciación genética utilizan técnicas de inmunorregulación genética para aumentar el reconocimiento inmunitario de los tumores. En consecuencia, se ha desarrollado una variedad de enfoques distintos para llevar a cabo la terapia génica contra el cáncer.

35 Se ha reportado una alta incidencia de mutaciones en genes supresores de tumores, tales como p53 y RB, en el caso del carcinoma de vejiga. Para tales lesiones genéticas de genes supresores de tumores, se puede demostrar la reversión del fenotipo neoplásico con el reemplazo del correspondiente gen supresor de tumores de tipo silvestre.

40 Los estudios en condiciones *in vitro* que utilizan líneas celulares derivadas de tejidos de vejiga humana han demostrado una expresión transgénica eficaz después de la infección con el adenovirus recombinante. Se ha reportado que los experimentos en condiciones *in vivo* también han demostrado la expresión del transgén del adenovirus en la vejiga urinaria de roedores después del abordaje intravesical. Los experimentos en condiciones *in vitro* con el adenovirus de tipo silvestre demuestran que el alcohol bencílico no influye en la inserción ni en la internalización del virus, pero, según se reporta, demuestran un aumento en el recubrimiento del virión. Los esfuerzos en condiciones *in vivo* con agentes (por ejemplo, acetona, DMSO, sulfato de prolamina) pueden descomponer la capa protectora de "mucina" que protege el epitelio de la vejiga de las bacterias, los virus y otros patógenos.

45 La Patente de EE.UU Número 5,789,244 reivindica una composición que comprende a un vector viral en el que se ha insertado una secuencia de nucleótidos que codifica para un transgén, en la que el vector viral está formulado en un tampón que comprende etanol en un intervalo de concentración de aproximadamente 1% al 50% (v/v). La Patente de EE.UU Número 5,837,520 reivindica un método para la purificación de una partícula viral intacta de un lisado celular que comprende tratar el lisado celular que contiene a la partícula vírica intacta con un agente enzimático que degrada selectivamente tanto el ADN como el ARN que no están encapsulados; La cromatografía del lisado tratado del primer paso en una primera resina; y la cromatografía del eluyente del segundo paso en una segunda resina; en donde una resina es una resina de intercambio aniónico y la otra es una resina inmovilizada de afinidad a iones metálicos. La Patente de EE.UU 5,932,210 describe una composición que comprende a un vector de expresión de adenovirus recombinante y un acarreador farmacéuticamente aceptable, el vector comprende: (a) un inserto de ADN exógeno que comprende a un gen que codifica para una proteína extraña; y (b) ADN de adenovirus en el que se han eliminado todas las secuencias de codificación de E1a, E1b y la proteína IX, y al menos parte de E3. La Patente de EE.UU Número 6,165,779 describe una composición que comprende a un vector de virus recombinante formulado en un tampón que comprende un detergente. La Patente de EE.UU Número 6,210,939 reivindica a un vector de expresión

5 de adenovirus recombinante que comprende (a) un inserto de ADN exógeno que comprende a un gen que codifica para una proteína extraña y (b) ADN de adenovirus que ha sufrido una delección que comienza en el nucleótido 357 y termina en el nucleótido 4020 a 4050. Finalmente, la Patente de EE.UU Número 6,312,681 describe un método para administrar un vector adenoviral que comprende un transgén a una célula cancerosa en la membrana epitelial de una vejiga, el método comprende en administrar a la membrana epitelial el vector adenoviral y etanol a una concentración entre el 1% y el 50% (v/v), en donde el vector adenoviral infecta a la célula y el transgén se expresa en las células infectadas. El documento WO 99/02191 describe SYN3 en combinación con detergentes, tales como Polisorbato 80 y BigCHAP, y un sistema tampón para mejorar la transferencia de genes a la vejiga.

10 A pesar de lo anterior, existe la necesidad de formulaciones para uso terapéutico que mejoren la eficacia de la administración de transgenes. Los vectores que son inestables presentan dificultades para poder administrar el agente terapéutico deseado al paciente. Debido a la inestabilidad en condiciones *in vivo*, existe la necesidad de una estabilización del vector de manera que haya un aumento en la transducción del agente terapéutico que se va a administrar.

15 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica liofilizada que comprende N-(3-N-(3-colamidopropil)-N-(3(actobionamidopropil))-colamida, hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPβCD) y un sistema tampón de citrato que proporciona un pH de 5 a 6 y un acarreador farmacéuticamente aceptable.

20 N-(3-colamidopropil)-N-(3(actobionamidopropil))-colamida es el nombre genérico del compuesto al que también se hace referencia con el nombre comercial de "SYN3". Los términos se utilizan indistintamente a lo largo de la presente. Por lo tanto, siempre que se utilice la marca comercial "SYN3", se hace referencia a el compuesto con el nombre genérico mencionado anteriormente.

Preferiblemente, la composición comprende además al menos a un agente adicional seleccionado de Polisorbato 80, BigCHAP, Polisorbato 20, copolímero de bloque de polietilenopolipiroilenglicol.

25 Ventajosamente, el Polisorbato está presente en una concentración de 1 a 36 mg/ml, el BigCHAP está presente en una concentración de 20 a 360 mg/ml y el Pluronic L64 y Pluronic L92 están presentes en una concentración de 1 a 150 mg/ml.

Convenientemente, la composición comprende además a al menos un agente de carga farmacéuticamente aceptable.

Ventajosamente, la composición comprende además a el ácido ascórbico.

Preferiblemente, el ácido ascórbico está presente en una concentración de 0.001 a 0.6 mg/ml.

30 Convenientemente, la composición comprende de 0.001 mg/ml a 150 mg/ml de N-(3-colamidopropil)-N-(3(actobionamidopropil))-colamida.

Ventajosamente, la composición se va a utilizar con un sistema de administración de genes.

La invención también proporciona un sistema de administración de genes para utilizar en el tratamiento del cáncer de vejiga, en el que el sistema es para ser utilizado con la composición.

35 Preferiblemente, el sistema de administración de genes es un sistema de administración de vectores adenovirales recombinantes.

Convenientemente, el sistema de administración de vectores adenovirales recombinantes es para el interferón α2b.

Ventajosamente, la composición se redisuelve en agua antes de mezclarse con el sistema de administración de genes.

40 La invención también proporciona la utilización de una composición liofilizada y un sistema de suministro de genes para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer de vejiga en un paciente en el que la composición y el sistema son para mezclarse juntos justo antes de la administración al paciente.

Preferiblemente, el sistema de administración de genes es un sistema de administración de vectores adenovirales recombinantes, preferiblemente para el interferón α2b.

Convenientemente, la composición se redisuelve con agua antes de mezclarse con el sistema de administración de genes.

45 Descripción de las Figuras

La Figura 1 ilustra la formula química estructural de SYN3.

La Figura 2 ilustra un método para la síntesis de SYN3.

Descripción detallada de la invención

Por consiguiente, un aspecto de la invención es que una única molécula SYN3 tipo tensioactivo se formula con excipientes para mantener la solubilidad y la estabilidad, así como la compatibilidad con el adenovirus.

Un aspecto adicional de la invención es que las formulaciones de SYN3 no son tóxicas para los tejidos, por ejemplo, la vejiga con la que entra en contacto a niveles terapéuticos. De hecho, los tensioactivos que actúan como potenciadores de la permeación a menudo producen cierta toxicidad debido a la irritación de la membrana. El uso de SYN3 proporciona entonces el beneficio adicional de evitar esta toxicidad. Connor, et al., Gene Therapy, vol. 8, pp. 41-48 (2001).

Un aspecto adicional de la invención es que la estabilidad del vector no se ve afectada por la combinación con el SYN3. A menudo, los niveles de tensioactivos requeridos para mejorar la transducción pueden ocasionar inestabilidad al vector. La combinación de las preparaciones de adenovirus y de SYN3 produce una mezcla más potente en comparación con el adenovirus.

Se produjeron formulaciones acuosas tamponadas y liofilizadas, así como formulaciones en solución no acuosa de SYN3. SYN3, que también se conoce por el nombre genérico: N-(3-colamidopropil)-N-(3(actobionamidopropil))-colamida (SYN3) (Figura 1), tiene el Registro CAS No. 2127407-44-5. El compuesto tiene un segundo nombre genérico que le asignó CAS. El nombre genérico asignado a CAS es: NODA (N-[3-[(4-OD-galactopiranosil-D-glucanoil)amino]propil]-3,7,12-trihidroxi-N[3-[[[(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-3,7,12-trihidroxi-24-oxocolan-24-il]amino]propil]-, (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ )-colan-24-amida). Como será evidente para los expertos en la técnica, SYN3 existe en varias formas ópticas, tautoméricas, estereoisoméricas e isoméricas. La Figura 1 ilustra a un isómero preferido. Sin embargo, las composiciones de la presente invención abarcan todas las formas en cualquier porcentaje o mezcla racémica de los mismos.

SYN3 es una molécula tipo tensioactivo que mejora la transducción de vectores de genes terapéuticos/adenovirus recombinantes para el tratamiento de tejidos epiteliales y tumores, o, más específicamente, en tumores de vejiga. SYN3 puede estar presente en una concentración de aproximadamente 0.001 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml.

El término "transgén terapéutico" se refiere a una secuencia de nucleótidos cuya expresión en la célula diana produce un efecto terapéutico. El término transgén terapéutico incluye, pero no se limita a, genes supresores de tumores, genes antigénicos, genes citotóxicos, genes citostáticos, genes activadores de fármacos, genes apoptóticos, genes farmacéuticos o genes anti-angiogénicos. Los vectores de la presente invención se pueden utilizar para producir uno o más transgénicos terapéuticos, ya sea en tándem a través del uso de elementos IRES o a través de promotores regulados independientemente.

El término "gen supresor de tumores" se refiere a una secuencia de nucleótidos, cuya expresión en la célula diana es capaz de suprimir el fenotipo neoplásico y/o inducir la apoptosis. Los ejemplos de genes supresores de tumores útiles en la práctica de la presente invención incluyen al gen p53, el gen APC, el gen DPC-4, el gen BRCA-1, el gen BRCA-2, el gen WT-1, el gen del retinoblastoma (Lee, et al, Nature, 329: 642 (1987)), el gen MMAC-1, la proteína coli de la poliposis adenomatosa (Albertsen, et al, Patente de Estados Unidos 5.783.666 concedida el 21 de julio de 1998), gen deletado en carcinoma de colon (DCC), el gen MMS-2, el gen NF-1, gen supresor de tumores del carcinoma nasofaríngeo que se mapea en el cromosoma 3p21.3. (Cheng, et al, Proc. Nat. Acad. Sci, 95: 3042-3047 (1998)), el gen MTS1, el gen CDK4, el gen NF-1, el gen NF2 y el gen VHL.

El término "genes antigénicos" se refiere a una secuencia de nucleótidos, cuya expresión en las células diana da como resultado la producción de una proteína antigénica de la superficie celular capaz de ser reconocida por el sistema inmune. Los ejemplos de genes antigénicos incluyen a el antígeno carcinoembrionario (CEA), p53 (como se describe en Levine, A. PCT International Publication No. WO94/02167 publicada el 3 de febrero de 1994). Para facilitar el reconocimiento inmune, el gen antigénico puede fusionarse con el antígeno de clase I del MHC.

El término "gen citotóxico" se refiere a la secuencia de nucleótidos, cuya expresión en una célula produce un efecto tóxico. Ejemplos de tales genes citotóxicos incluyen secuencias de nucleótidos que codifican para la exotoxina de pseudomonas, la toxina de ricina, la toxina de la difteria y similares.

El término "gen citostático" se refiere a la secuencia de nucleótidos, cuya expresión en una célula produce un arresto del ciclo celular. Los ejemplos de dichos genes citostáticos incluyen p21, el gen de retinoblastoma, el gen E2F-Rb, genes que codifican para inhibidores de la cinasa dependientes de ciclinas tales como P16, p15, p18 y p19, el gen homeobox específico para detener el crecimiento (GAX) como se describe en Branellec, et al. (Publicación PCT WO97/16459 publicada el 9 de mayo de 1997 y Publicación PCT WO96/30385 publicada el 3 de octubre de 1996).

El término "gen de citocina" se refiere a una secuencia de nucleótidos, cuya expresión en una célula produce una citocina. Los ejemplos de tales citocinas incluyen GM-CSF, las interleucinas, especialmente IL-1, IL-2, IL-4, IL-12, IL-10, IL-19, IL-20, interferones de los subtipos alfa, beta y gamma, especialmente el interferón  $\alpha$ -2b y fusiones como el interferón  $\alpha$ -2 $\alpha$ -1.

El término "gen de quimiocina" se refiere a una secuencia de nucleótidos, cuya expresión en una célula produce una citoquina. El término quimiocinas se refiere a un grupo relacionado estructuralmente, de citocinas de bajo peso molecular, los factores de peso secretados por las células están relacionados estructuralmente y tienen actividades

mitogénicas, quimiotácticas o inflamatorias. Son principalmente proteínas catiónicas de 70 a 100 residuos de aminoácidos que comparten cuatro cisteínas que están conservadas. Estas proteínas se pueden clasificar en dos grupos según el espaciado de las dos cisteínas amino-terminales. En el primer grupo, las dos cisteínas están separadas por un solo residuo (C-x-C), mientras que, en el segundo grupo, son adyacentes (C-C). Los ejemplos de miembros de las quimiocinas 'C-x-C' incluyen, pero no se limitan a, factor plaquetario 4 (FP4), proteína plaquetaria básica (PPB), interleucina-8 (IL-8), proteína de actividad estimuladora del crecimiento del melanoma (PECM), proteína inflamatoria de macrófagos 2 (PIM-2), Mig de ratón (m119), 9E3 de pollo (o pCEF-4), factores quimiotácticos I y II de macrófagos alveolares de cerdo (FQMA-I y -II), factor estimulante del crecimiento de células pre-B (FEPB), e IP10. Los ejemplos de miembros del grupo 'C-C' incluyen, pero no se limitan a, proteína quimiotáctica de monocitos 1 (PQM-1), proteína quimiotáctica de monocitos 2 (PQM-2), proteína quimiotáctica de monocitos 3 (PQM-3), proteína quimiotáctica de monocitos 4 (PQM-4), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (PIM-1-alfa), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (PIM-1-beta), proteína inflamatoria de macrófagos 1 gamma (PIM-1-gamma), proteína inflamatoria de macrófagos 3 alfa (PIM-3-alfa), proteína inflamatoria de macrófagos 3 beta (MIP-3-beta), quimiocina (ELC), proteína inflamatoria de macrófagos 4 (PIM-4), proteína inflamatoria de macrófagoS 5 (PIM-5), LD78 beta, RANTES, SIS-épsilon (p500), timo y quimiocina regulada por activación (TQAR), eotaxina, 1-309, proteína humana HCC-1/NCC-2, proteína humana HCC-3, proteína C10 de ratón.

El término "gen de proteína farmacéutica" se refiere a la secuencia de nucleótidos, cuya expresión da como resultado la producción de proteínas que tienen un efecto farmacéutico en la célula diana. Los ejemplos de dichos genes farmacéuticos incluyen al gen de proinsulina y a sus análogos (como se describe en la Solicitud de Patente Internacional PCT No. WO98/31397, gen de la hormona del crecimiento, dopamina, serotonina, factor de crecimiento epidérmico, GABA, ACTH, NGF, VEGF (para aumentar la perfusión de la sangre al tejido diana, inducir angiogénesis, publicación PCT WO98/32859 publicada el 30 de julio de 1998), trombospondina, etc.

El término "gen pro-apoptótico" se refiere a una secuencia de nucleótidos, cuya expresión da como resultado la muerte celular programada de una célula. Los ejemplos de genes pro-apoptóticos incluyen p53, adenovirus E3-11.6K, el gen E4orf4 del adenovirus, genes de la vía p53 y genes que codifican para las caspasas.

El término "genes activadores de profármacos" se refiere a secuencias de nucleótidos, cuya expresión resulta en la producción de proteínas capaces de convertir un compuesto no terapéutico en un compuesto terapéutico, lo que ocasiona que la célula sea susceptible de ser asesinada por factores externos o por causa una condición tóxica en la célula. Un ejemplo de un gen activador de profármacos es el gen de la citosina desaminasa. La citosina desaminasa convierte 5-fluorocitosina en 5 fluorouracilo, un potente agente antitumoral. La lisis de la célula tumoral proporciona un estallido localizado de citosina desaminasa capaz de convertir 5FC en 5FU en el punto localizado del tumor que resulta en la muerte de muchas células tumorales circundantes. Esto da como resultado la muerte de un gran número de células tumorales sin la necesidad de infectar a estas células con un adenovirus (el llamado "efecto espectador"). Además, el gen de la timidina cinasa (TK) (véase, por ejemplo, Woo, et al. United States Patent No. 5,631,236 expedida el 20 de mayo de 1997 y Freeman, et al. Patente de Estados Unidos No. 5,601,818 expedida el 11 de febrero de 1997) en la que las células que expresan el producto del gen TK son susceptibles a la eliminación selectiva por la administración de ganciclovir.

El término "genes anti-angiogénicos" se refiere a una secuencia de nucleótidos, cuya expresión resulta en la secreción extracelular de factores anti-angiogénicos. Los factores anti-angiogénicos incluyen la angiostatina, inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) como Tie 2 (como se describe en PNAS (EE. UU) (1998) 95: 8795-8800), endostatina.

Para los expertos en la técnica será evidente que las modificaciones y/o las eliminaciones de los genes mencionados anteriormente para codificar subfragmentos funcionales de la proteína de tipo silvestre pueden adaptarse fácilmente para uso en la práctica de la presente invención. Por ejemplo, la referencia al gen p53 incluye no solo a la proteína de tipo silvestre sino también a las proteínas p53 modificadas. Los ejemplos de tales proteínas p53 modificadas incluyen modificaciones a p53 para aumentar la retención nuclear como se describe en Wahl, et al., Nat. Cell Biol., 3(12): E277-86 (2001), delecciones tales como las de los aminoácidos delta13-9 para eliminar el sitio de escisión por consenso de la calpaína, modificaciones a los dominios de oligomerización (como se describe en Bracco, et al. PCT solicitud publicada WO97/0492 o la Patente de Estados Unidos No. 5,573,925).

Será rápidamente evidente para los expertos en la técnica que los genes terapéuticos anteriormente mencionados pueden secretarse en el medio o localizarse en ubicaciones intracelulares particulares mediante la inclusión de un objetivo de ataque, tal como un péptido señal o señal de localización nuclear (SLN). También se incluyen en la definición de transgén terapéutico las proteínas de fusión del transgén terapéutico con la proteína estructural del virus herpes simple tipo 1 (HSV-1), VP22. Las proteínas de fusión que contienen la señal VP22, cuando se sintetizan en una célula infectada, se exportan fuera de la célula infectada y entran de manera eficiente a las células no infectadas circundantes en un diámetro de aproximadamente 16 células de ancho. Este sistema es particularmente útil en conjunción con proteínas activas transcripcionalmente (por ejemplo, p53) ya que las proteínas de fusión se transportan de manera eficiente a los núcleos de las células circundantes. Véase, por ejemplo, Elliott, G. & O'Hare, P. Cell., 88: 223-233 (1997); Marshall, A. & Castellino, A. Research News Briefs., Nature Biotechnology, 15: 205 (1997); O'Hare, et al. Publicación PCT WO97/05265 publicada el 13 de febrero de 1997. Un objetivo de ataque similar derivado de la proteína Tat del VIH también se describe en Vives, et al., J. Biol. Chem., 272: 16010-16017 (1997).

Como se utiliza en la presente, "un sistema de suministro de genes" se refiere a cualquier medio de suministro de un gen terapéutico a un tejido u órgano epitelial particular que incluye, por ejemplo, vectores virales recombinantes y sistemas de vectores no virales. Los ejemplos de sistemas no vectores incluyen, pero no se limitan a, cualquier complejo de ADN encapsulado en lípidos, basado en lípidos o complejos de lípidos catiónicos/ADN. Los ejemplos de vectores virales recombinantes incluyen, pero no se limitan a, virus del herpes, retrovirus, virus de vaccinia, adenovirus y virus adenoasociados.

"Recombinante" se refiere a ácidos nucleicos y proteínas codificadas por ellos en los que los ácidos nucleicos se construyen mediante métodos de tecnología de ADN recombinante, también denominada "ingeniería genética". Un vector viral recombinante preferido es el sistema de administración de vectores adenovirales que tiene una delección en el gen de la proteína IX. Véase la solicitud de patente internacional WO 95/11984. El sistema de administración de vectores recombinantes que comprende a un gen terapéutico, tal como un gen supresor de tumores, se formula en un tampón que estabiliza a el vector y se combina con un agente potenciador de la administración que es compatible con el vector.

Un "agente potenciador de la administración" se refiere a cualquier agente que mejora la administración de un gen terapéutico, tal como un gen supresor de tumores a un tejido u órgano cancerosos. Dicha entrega mejorada o potenciada puede lograrse mediante diversos mecanismos. Uno de tales mecanismos puede implicar la ruptura de la capa protectora de glicosaminoglicanos en la superficie epitelial de la vejiga.

Los ejemplos de tales agentes potenciadores de la administración son detergentes, alcoholes, glicoles, tensioactivos, sales biliares, antagonistas de heparina, inhibidores de la ciclooxigenasa, soluciones de sal hipertónica y acetatos. Los alcoholes incluyen, por ejemplo, los alcoholes alifáticos tales como etanol, N-propanol, isopropanol, alcohol butílico, alcohol acetílico. Los glicoles incluyen, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y tioglicerol. Acetatos tales como ácido acético, acetato de gluconol y acetato de sodio son ejemplos adicionales de agentes potenciadores de la administración. Las soluciones de sal hipertónica como 1M NaCl también son ejemplos de agentes que mejoran la administración. Ejemplos de tensioactivos son dodecil sulfato de sodio (SDS) y lisolecitina, polisorbato 80, nonilfenoxipolioxietileno, lisofosfatidilcolina, polietilenglicol 400, polisorbato 20, polioxietilén éteres y tensioactivos de poliglicol éter. Se pueden utilizar sales biliares como taurocolato, tauro-desoxicolato de sodio, desoxicolato, quenodesoxicólico, ácido glicocólico, ácido glicocenodesoxicólico y otros astringentes como el nitrato de plata también pueden utilizarse. También se pueden utilizar antagonistas de la heparina como aminas cuaternarias, tales como el sulfato de protamina. Se pueden utilizar inhibidores de la ciclooxigenasa, como el salicilato de sodio, el ácido salicílico y el fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) como la indometacina, el naproxeno y el diclofenaco.

El término "aumentado" describe el suministro incrementado del gen terapéutico, tal como un gen supresor de tumores, al tejido u órgano cancerosos. El aumento de la administración de un gen terapéutico, como un gen supresor de tumores, se puede medir por diversos medios, por ejemplo, midiendo la expresión del gen supresor de tumores en comparación con los niveles de expresión cuando el gen supresor de tumores se administra en un sistema de administración de vectores adenovirales en un tampón que carece del agente de aumenta la entrega. Ejemplos de genes terapéuticos son los genes supresores de tumores y el gen suicida timidina cinasa. Los ejemplos de genes supresores de tumores incluyen, pero no se limitan a, p53, el gen del retinoblastoma, ya sea de longitud completa, como p110B, o fragmentos del mismo, como p94RB o p56RB, Rb56, una variante funcional del gen Rb, una variante funcional de gen p53, y p16. Otros genes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, CFTR, genes que codifican citocinas (como los interferones alfa, beta, gamma, delta, interleucinas (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-2), GM-CSF y cualquiera de los otro otros genes que codifican para proteínas que tienen potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades no cancerígenas de la vejiga, como la cistitis. En algunos aspectos de la divulgación, el gen terapéutico codifica ARN antisentido.

En algunos aspectos, las composiciones de la divulgación comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un gen terapéutico, tal como un gen supresor de tumores, contenido en un sistema de administración de vectores virales recombinantes en un tampón que comprende un agente potenciador de la administración. "Terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente se refiere a la prevención de, reducción de o curación de los síntomas asociados con un estado de enfermedad.

Las cantidades terapéuticamente efectivas de la composición farmacéutica que comprende a un gen terapéutico, tal como p53, o el gen supresor de tumores en el retinoblastoma, en un sistema de administración de vector viral recombinante formulado en un tampón que comprende un agente potenciador de la administración, se administrarán de acuerdo con las enseñanzas de esta divulgación. Por ejemplo, las cantidades terapéuticamente efectivas del gen supresor de tumores p53 en el sistema de administración de vectores adenovirales recombinantes formulado en un tampón que contiene un agente potenciador de la administración, están en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^8$  partículas/ml a  $2 \times 10^{12}$  partículas/ml, más típicamente, aproximadamente  $1 \times 10^8$  partículas/ml a  $9 \times 10^{11}$  partículas/ml, más típicamente  $1 \times 10^{10}$  partículas/ml a  $9 \times 10^{11}$  partículas/ml.

La proteína P53, también conocido como ACN53, es un adenovirus recombinante tipo 5 que codifica para la proteína supresora de tumores p53 de tipo silvestre, y se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente PCT WO95/11984. En un aspecto de la divulgación, SYN3 formulado se combina con la inyección de p53 y la mezcla se instila en la

vejiga. Esta preparación está destinada a tratar los carcinomas epiteliales. Preferiblemente, p53 estará presente en una cantidad de aproximadamente 5 a aproximadamente  $8 \times 10^{13}$  partículas.

Los detergentes para uso dentro del alcance de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos. Los detergentes ejemplares incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a taurocolate, desoxicolato, taurodeoxicolato, cetilpiridio, cloruro de benalconio, ZWITTERGENT 3-14, CHAPS (3-[(3-Colamidopro-dimetilamonio]-1-propanosulfonato) de Aldrich, Big CHAP, Deoxi Big CHAP, TRITON-X- 100 detergente disponible de Union Carbide, C12E8, Octil-BD-Glucopiranosido, PLURONIC-F64, PLURONIC-F68, PLURONIC-F69 detergentes disponibles de BASF, detergente TWEEN20 y detergente TWEEN80 y detergente TWEEN80 disponibles en ICI.

En una realización, el agente potenciador de la administración se incluye en el tampón en el que se formula el sistema de administración del vector adenoviral recombinante. El agente potenciador de la administración puede administrarse antes del virus recombinante o concomitantemente con el virus, en algunas realizaciones, el agente potenciador de la administración se suministra con el virus mezclando una preparación de virus con una formulación del agente potenciador de la administración justo antes de la administración al paciente. En otras realizaciones, el agente potenciador de la administración y el virus se proporcionan en un solo vial al cuidador para su administración.

En el caso de una composición farmacéutica que comprende a un gen supresor tumoral contenido en un sistema de administración de vectores adenovirales recombinantes formulado en un tampón que comprende además un agente potenciador de la administración, la composición farmacéutica puede administrarse a lo largo del tiempo en el intervalo de aproximadamente 5 minutos a 3 horas, preferiblemente de aproximadamente 10 minutos a 120 minutos, y más preferiblemente de aproximadamente 15 minutos a 90 minutos. En otra realización, el agente potenciador de la administración puede administrarse antes de la administración del sistema de administración de vectores adenovirales recombinantes que contienen a el gen supresor de tumores. La administración previa del agente potenciador de la administración puede estar en el intervalo de aproximadamente 30 segundos a 1 hora, preferiblemente de aproximadamente 1 minuto a 10 minutos, y preferiblemente de aproximadamente 1 minuto a 5 minutos antes de la administración del sistema de administración de vectores adenovirales que contiene gen supresor tumoral.

Los solventes que se pueden utilizar para las formulaciones de la presente invención incluyendo, por ejemplo, solventes acuosos tales como agua inyectable y/o solventes no acuosos, tales como DMSO y N,N-dimetilacetamida, también conocido como DMA, y mezclas de co-solventes, por ejemplo, glicerol y agua, preparadas preferiblemente de acuerdo con los estándares de la USP.

Las formulaciones que contienen HP $\beta$ CD y también pueden contener polisorbatos, o polioxietilén sorbitán ésteres, una clase de tensioactivos no iónicos que incluyen, por ejemplo, polisorbato 80 y polisorbato 20, entre otros, Pluronic o copolímeros de bloque de polietilénpolipropilenglicol, una clase de tensioactivos no iónicos, que incluyen por ejemplo Pluronic L68 y L92<sup>TM</sup>, entre otros, e hidroxipropil-beta-ciclodextrina, una hidroxialquil-beta-ciclodextrina poli sustituida, que es una clase de agentes complejantes no iónicos, que incluyen, por ejemplo, HP $\beta$ CD y BigCHAP<sup>TM</sup>. Los preferidos son HP $\beta$ CD, BigCHAP<sup>TM</sup>, Polysorbate 80<sup>TM</sup>, Polysorbate 20<sup>TM</sup>, Pluronic L64<sup>TM</sup> y Pluronic L92<sup>TM</sup> como agentes solubilizantes. Los solubilizantes pueden utilizarse, por ejemplo, individualmente o en combinaciones. Las concentraciones de los agentes solubilizantes se exponen a continuación. HP $\beta$ CD puede estar presente en una concentración de aproximadamente 50 a 500 mg/ml, BigCHAP<sup>TM</sup> puede estar presente en una concentración de aproximadamente 20 a aproximadamente 360 mg/ml, Polysorbate 80<sup>TM</sup> puede estar presente en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 mg/ml, y los otros ingredientes pueden estar presentes en concentraciones como se establece a continuación.

La concentración del agente potenciador del suministro dependerá de una serie de factores conocidos por los expertos en la técnica, como el agente particular potenciador del suministro que se utiliza, el tampón, el pH, el tejido u órgano objetivo y la vía de administración. La concentración del agente mejorador de la administración estará en el rango de 0.01% a 50% (p/v), preferiblemente de 10% a 40% (p/v), preferiblemente de 14% a 19% (p/v), y preferiblemente 0,01% a 30% (p/v). Preferiblemente, la concentración de detergente será de aproximadamente 1% a 12% (p/v) en la formulación antes de la mezcla, y preferiblemente 0.1% (p/v) de la formulación cuando se mezcla. Preferiblemente, la concentración de detergente en la formulación final administrada al paciente es de aproximadamente 0.5-2 veces la concentración crítica de micelización (CCM). La CCM es igual a 0.001 mg/ml en la formulación de adenovirus recombinante.

Las formulaciones liofilizadas de SYN3 contienen un sistema de tamponamiento de citrato. Preferiblemente, el sistema de tamponamiento de citrato puede comprender al menos un tampón cítrico, tal como de ácido cítrico monohidratado USP o citrato de sodio dihidratado USP. Más preferiblemente, el sistema de tamponamiento de citrato comprende una combinación de ácido cítrico monohidratado USP o citrato de sodio dihidratado USP. Cuando se utilizan en combinación, la cantidad de ácido cítrico monohidratado USP puede estar presente en una concentración de aproximadamente 0.005 a aproximadamente 2 mg/ml, más preferiblemente de 0.016 a aproximadamente 1.35 mg/ml, preferiblemente de 0.016 a aproximadamente 0.72 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0.005 hasta aproximadamente 1.35, y el citrato de sodio dihidratadoo USP puede estar presente en una concentración de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 5.37 mg/ml, preferiblemente de 0.05 a 3.00 mg/ml, preferiblemente de 0.05 a 2.31 mg/ml. Otros sistemas de tamponamiento adecuados que son adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato,

glicina, ya sea en lugar del sistema de tamponamiento de citrato o en combinación con el mismo, y combinaciones variables de todo lo anterior.

5 El sistema de tamponamiento proporcionará un pH de la formulación liofilizada de modo que haya una estabilidad mejorada. El pH estará en un rango de 5 a 6. Las formulaciones acuosas de la mezcla de SYN3 se tamponan preferiblemente a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.5, preferiblemente aproximadamente 7.4, y SYN3 permanece estable en el polvo deshidratado durante al menos 3 meses a 40°C.

10 Las formulaciones liofilizadas contienen preferiblemente glicina o manitol como agentes de carga de liofilización. Otro agente de formación de volumen por liofilización apropiado puede estar presente en una concentración de aproximadamente 5 a 100 mg/ml cuando el agente es manitol, y aproximadamente 10 a 200 mg/ml cuando el agente es glicina.

Las formulaciones liofilizadas contienen preferiblemente ácido ascórbico como antioxidante. Otros antioxidantes apropiados que pueden utilizarse incluyen, por ejemplo, ácido cítrico. Cuando los ácidos ascórbicos son el antioxidante, puede estar presente en una concentración de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.6 mg/ml.

15 Las composiciones de esta invención pueden incluir adicionalmente, por ejemplo, un estabilizador, potenciador u otros acarreadores o vehículos farmacéuticamente aceptables. Un acarreador farmacéuticamente aceptable puede contener a un compuesto fisiológicamente aceptable que actúe, por ejemplo, para estabilizar el sistema de administración de vectores adenovirales recombinantes que comprende a el gen supresor de tumores. Un compuesto fisiológicamente aceptable puede incluir, por ejemplo, carbohidratos, como glucosa, sacarosa o dextranos, Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, antioxidantes, como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizantes o excipientes.

20 Otros compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes o conservadores, que son particularmente útiles para prevenir el crecimiento o la acción de microorganismos. Varios conservadores son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Un experto en la materia sabría que la elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable depende de la vía de administración y de las características fisicoquímicas particulares del sistema de administración de vectores adenovirales recombinantes y del gen supresor de tumores particular contenido en él. Se pueden encontrar ejemplos de portadores, estabilizantes o adyuvantes en Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición. (Mack Publishing. Co., Easton, Pa. 1995).

30 El sistema de administración de vectores virales recombinantes que comprende a un gen terapéutico formulado en un tampón que comprende a un agente potenciador de la administración, puede ser administrado a cualquier tejido u órgano canceroso utilizando cualquier método de administración conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, administración intratumoral o intravesical. Los tejidos y órganos cancerosos incluyen, por ejemplo, cualquier tejido u órgano que tenga una membrana epitelial como el tracto gastrointestinal, la vejiga, el tracto respiratorio y el pulmón. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de vejiga y tracto respiratorio superior, vulva, cuello uterino, vagina o bronquios; tumores metastásicos locales del peritoneo; carcinoma bronco alveolar; carcinoma metastásico pleural; carcinoma de boca y amígdalas; carcinoma de la nasofaringe, nariz, laringe, esófago, estómago, colon y recto, vesícula biliar o piel; o melanoma.

40 Los agentes potenciadores de la administración de la divulgación también se pueden utilizar para formular otros agentes farmacéuticos, tales como proteínas, ácidos nucleicos, ARN antisentido, moléculas pequeñas, etcétera, para la administración a cualquier tejido u órgano que tenga una membrana epitelial.

#### Administración de las Formulaciones

45 En algunos aspectos, el agente potenciador de la administración se incluye en el tampón en el que se formula un vector de expresión. El agente potenciador de la administración puede administrarse antes del vector de expresión o concomitantemente con el vector de expresión. En algunos aspectos, el agente potenciador de la administración se proporciona con el vector de expresión mezclando un vector de expresión con una formulación de agente potenciador de la administración justo antes de la administración al paciente. En otros aspectos, el agente potenciador de la administración y el vector de expresión se proporcionan en un solo vial al cuidador para su administración.

50 En el caso de una composición farmacéutica que comprende a un gen supresor de tumores contenido en un sistema de administración de vectores adenovirales recombinantes formulado en un tampón que comprende además un agente potenciador de la administración, la composición farmacéutica puede administrarse a lo largo del tiempo en el intervalo de aproximadamente 5 minutos a 3 horas, preferiblemente aproximadamente 10 minutos a 120 minutos, y lo más preferible aproximadamente 15 minutos a 90 minutos. En otro aspecto, el agente potenciador de la administración puede administrarse antes de la administración del sistema de administración de vectores adenovirales recombinantes que contiene a el gen supresor de tumores. La administración previa del agente potenciador de la administración puede estar en el intervalo de aproximadamente 30 segundos a 1 hora, preferiblemente de aproximadamente 1 minuto a 10 minutos, y lo más preferible de aproximadamente 1 minuto a 5 minutos antes de la administración del sistema de administración de vectores adenovirales que contiene a el gen supresor de tumores.

5 El vector de expresión formulado en un tampón que comprende a un agente potenciador de la administración puede administrarse a cualquier tejido u órgano, incluidos los tejidos neoplásicos, como el tejido canceroso, utilizando cualquier método de administración conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, administración intratumoral o intravesical. Los tejidos y órganos incluyen a cualquier tejido u órgano que tenga una membrana epitelial como el tracto gastrointestinal, la vejiga, el tracto respiratorio y el pulmón. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de vejiga y tracto respiratorio superior, vulva, cuello uterino, vagina o bronquios; tumores metastásicos locales del peritoneo; carcinoma bronco alveolar; carcinoma metastásico pleural; carcinoma de boca y amígdalas; carcinoma de la nasofaringe, nariz, laringe, esófago, estómago, colon y recto, vesícula biliar o piel; o melanoma.

10 En algunas realizaciones de la invención, un vector de expresión se formula en formulaciones mucosas, tópicas y/o bucales, particularmente en formulaciones de gel mucoadhesivo y gel tópico. Las composiciones de mejora de la permeación a modo de ejemplo, matrices de polímeros y preparaciones de gel mucoadhesivos para administración transdérmica se describen en las patentes de EE.UU. No. 5,346,701. Tales formulaciones son especialmente útiles para el tratamiento de cánceres de boca, cabeza y cuello (por ejemplo, cánceres del epitelio traqueobronquial) cánceres de piel (por ejemplo, melanoma, carcinomas de células basales y de células escamosas), cánceres de la mucosa intestinal, mucosa vaginal, y cáncer cervical.

15 En algunas realizaciones de la invención, un agente terapéutico se formula en formulaciones oftálmicas para la administración al ojo. Tales formulaciones son útiles en el suministro del gen de retinoblastoma (RB) al ojo, opcionalmente junto con el suministro de p53.

Composiciones para la Utilización en Métodos de Tratamiento

20 La composición de la invención se administra típicamente para potenciar la transferencia de un gen a una célula. La célula puede proporcionarse como parte de un tejido, como una membrana epitelial, o como una célula aislada, como en un cultivo de tejidos. La célula se puede proporcionar *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

25 Las composiciones se pueden introducir en el tejido de interés *in vivo* o *ex vivo* mediante una variedad de métodos. El agente modulador se introduce en las células mediante métodos como la microinyección, la precipitación con fosfato de calcio, la fusión de liposomas o la biolística. El agente terapéutico puede ser captado directamente por el tejido de interés.

30 En algunas realizaciones de la invención, las composiciones de la invención se administran *ex vivo* a células o tejidos explantados de un paciente, y luego se devuelven al paciente. Los ejemplos de administración *ex vivo* de construcciones génicas terapéuticas incluyen: Arteaga et al., Cancer Research 56(5): 1098-1103 (1996); Nolta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(6): 2414-9 (1996); Koc et al., Seminars in Oncology 23(1): 46-65 (1996); Raper et al., Annals of Surgery 223(2): 116-26 (1996); Dalesandro et al., J. Thorac. Cardi Surg., 11(2): 416-22 (1996); y Makarov et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 93(1): 402-6 (1996).

**Ejemplos**

35 Los siguientes ejemplos ilustrarán adicionalmente a la presente invención. Todos los ejemplos que muestran composiciones que incluyen SYN3, HPβCD y un sistema de tamponamiento de citrato que proporciona un pH de 5 a 6 son de acuerdo con la invención.

**Ejemplo 1**

40 La siguiente tabla representa los intervalos de los ingredientes para formulaciones líquidas no acuosas de la presente invención. Antes de la administración (para el cáncer de vejiga), la solución de SYN3 se combina con la preparación de adenovirus recombinante en una proporción de 1:50 v/v para formar una mezcla que se administra al paciente.

Ingrediente	Intervalo de Concentración de los Ingredientes.			
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
SYN3	0.001-150	0.001-150	0.001-150	0.001-150
Polisorbato 20	0.001-150			
Polisorbato 80		0.001-150		
Pluronic L64			0.001-150	
Pluronic L92				0.001-150
N,N-Dimetilacetamida qs ad	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

## ES 2 745 068 T3

5 Para preparar, pesar aproximadamente el 75% de DMA en un vaso de precipitados de vidrio. A un vaso de precipitados separado, cargar el tensioactivo (polisorbato 80, polisorbato 20, Pluronic L64 o Pluronic L92) y disolver en un volumen pequeño (aproximadamente el 10% del volumen final) de DMA. Cargar la solución de DMA/tensioactivo en la DMA en agitación constante. Pesar previamente SYN3 en un recipiente por separado. Cargar lentamente a SYN3 en la solución mientras esta se agita. Una vez que se haya disuelto el SYN3, se agrega suficiente DMA al volumen final en peso (densidad = 0.962 g/ml a 25°C). Filtrar la solución a través de un filtro de 0.22 conectado a una jeringa equipada con un émbolo que no sea de látex y almacenar la solución en un recipiente de vidrio herméticamente cerrado a 4°C.

Los siguientes ejemplos pueden prepararse de acuerdo con el Ejemplo 1.

### Ejemplo 2

Ingrediente	mg/ml
SYN3	51
Polisorbato 20	50
N,N-Dimetilacetamida qs ad	1 ml

10

### Ejemplo 3

Ingrediente	mg/ml
SYN3	51
Polisorbato 80	50
N,N-Dimetilacetamida qs ad	1 ml

### Ejemplo 4

15

Ingrediente	mg/ml
SYN3	51
Pluronic L64	25
N,N-Dimetilacetamida qs ad	1 ml

### Ejemplo 5

Ingrediente	mg/ml
SYN3	51
Pluronic L92	25
N,N-Dimetilacetamida qs ad	1 ml

20 Los siguientes lotes de 25 ml se prepararon de acuerdo con el mismo procedimiento.

## ES 2 745 068 T3

### Ejemplo 6

Ingrediente	mg/ml
SYN3	1.275
Polisorbato 20	1.250
N,N-Dimetilacetamida qs ad	25 ml

### Ejemplo 7

Ingrediente	mg/ml
SYN3	1.275
Polisorbato 80	1.250
N,N-Dimetilacetamida qs ad	25 ml

### Ejemplo 8

Ingrediente	mg/ml
SYN3	1.275
Pluronic L64	0.625
N,N-Dimetilacetamida qs ad	25 ml

5

### Ejemplo 9

Ingrediente	mg/ml
SYN3	1.275
Pluronic L92	0.625
N,N-Dimetilacetamida qs ad	25 ml

A continuación, se muestran los análisis de estabilidad de los Ejemplos 2, 3, 4 y 5.

### 10 Ejemplo 10

T°		-20°C	4°C	25°C	55°C	-80°C
Ej. No. 2	Semana 1	52.22	52.12	52.38	51.36	52.31
	Semana 2	52.16	52.14	52.38	52.68	
	Semana 3	51.92	52.38	51.98	51.46	
	Semana 4	52.1	52.63	52.28	51.15	
Ej. No. 3	Semana 1	51.9	53.75	53.09	52.98	53.33
	Semana 2	53.46	52.9	51.98	51.75	

## ES 2 745 068 T3

	Semana 3	52.64	53.35	53.41	50.6	
	Semana 4	53.41	52.96	53.85	55.81	
Ej. No. 4	Semana 1	51.34	53.94	53.68	53.76	54.98
	Semana 2	53.3	53.43	53.76	52.23	
	Semana 3		53.14	52.56	52.35	
	Semana 4	53.72	53.67	54.2	53.42	
Ej. No. 5	Semana 1	52.34	52.16	52.43	51.48	52.33
	Semana 2	51.64	51.5	51.39	52.18	
	Semana 3	52.28	52.56	53.73	53.01	
	Semana 4	53.49	53.49	53.67	53.73	

5 La prueba de estabilidad se realizó por HPLC. Las formulaciones de la solución se colocaron en las condiciones de temperatura indicadas, se incubaron durante tiempos específicos y las concentraciones se determinaron mediante HPLC y se compararon con las concentraciones iniciales (-80°C). Las formulaciones en solución no acuosa de SYN3 permanecen estables durante al menos 1 mes a 55°C cuando SYN3 se disuelve en N, N-Dimetilacetamida (DMA).

### Ejemplo 11

10 La siguiente tabla representa los intervalos de los ingredientes para formulaciones liofilizadas de la presente invención. La solución compuesta se llena como se indica en un vial de vidrio Tipo II de 20 ml de capacidad y se liofiliza. La preparación para la administración requiere la adición de 20 ml de agua inyectable al vial que contiene a la pastila liofilizada para redisolverse a el SYN3. La solución SYN3 se combina con p53, o cualquier preparación de adenovirus recombinante, en una relación v/v de 1:5. La mezcla se administra al paciente para, por ejemplo, el cáncer de vejiga.

Ingrediente	Intervalo de Concentraciones		
	mg/ml	mg/ml	mg/ml
SYN3	0.001-150	0.001-150	0.001-150
Ácido cítrico monohidratado	0.016-0.72	0.016-0.96	0.005-1.35
Ácido cítrico dihidratado	0.05-2.31	0.05-3	0.02-5.37
Hidroxipropil-β-ciclodextrina	-	50-500	-
BigCHAP	20-360	-	-
Glicina	10-200	-	-
Manitol	-	-	5-100
Polisorbato 80	-	1.0-36.0	10-200
Ácido ascórbico <sup>a</sup>	0.001-0.6	0.001-0.6	-
Agua inyectable (WFI) qs ad	1 ml	1 ml	1 ml
Intervalo de pH	5-6	5-6	5-6

1 ml en un vial de 20 ml <sup>b</sup>	5.3	5.3	5.3
Reconstitución del volumen de agua inyectable <sup>c</sup>	20 ml	20 ml	20 ml

Los siguientes ejemplos son métodos de preparación de formulaciones liofilizadas.

**Ejemplo 12**

Ingrediente	Gramos/Litro
SYN3	24
Ácido cítrico monohidratado USP	0.24
Ácido cítrico dihidratado USP	0.77
BigCHAP	120
Glicina USP	50
Ácido ascórbico USP	0.25
Agua inyectable USP qs ad	1000 ml

5

La cantidad real de SYN3 que se cargará se ajustará de acuerdo con la pureza del lote de sustancias farmacológica mediante la siguiente fórmula:

$$\text{gramos de SYN3} = 24.0 \times 1000 / (\% \text{Pureza})$$

Por ejemplo:

10 Sustancia farmacológica SYN3 = 97.0% pura.

$$24.0 \times 100 / 97.0 = 24.7 \text{ gramos de SYN3 a cargar por un lote de 1 litro.}$$

En consecuencia, para determinar la cantidad de SYN3 que se cargará al lote de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{g SYN3/Litro} = 24.0 \text{ g/Litro} \times [100 / (\% \text{SYN3 Pureza del Lote})]$$

El volumen de agua inyectable que se cargará al lote se determinará de acuerdo con la siguiente fórmula:

15 
$$\text{Volumen de agua inyectable (Litros)} = \text{Volumen del Lote (Litros)} \times 0.5$$

20 Cargar el volumen de agua para inyección calculada utilizando la fórmula anterior en un recipiente de composición tarado equipado con un agitador. Cargar y disolver, con agitación, a el BigCHAP. Se puede utilizar agua estéril inyectable para enjuagar el recipiente de pesaje para poder recuperar todo el material. La disolución completa de BigCHAP puede requerir aproximadamente de 30 a 60 minutos de agitación continua a una velocidad de agitación moderada. Cargar y disolver con agitación (velocidad de agitación moderada) a el SYN3 en la solución BigCHAP. Se puede utilizar agua inyectable para enjuagar el recipiente de pesaje para poder recuperar todo el material. La disolución completa de SYN3 puede requerir hasta 1 hora de mezcla. Cargar y disolver con agitación y en orden: glicina, ácido ascórbico, ácido cítrico monohidratado y citrato de sodio dihidrato en la solución que contiene Big CHAP y SYN3. Se puede utilizar agua inyectable para enjuagar los recipientes de pesaje para recuperar todo el material.

25 Agregar agua inyectable para llevar el lote al volumen final (la densidad de la solución es de aproximadamente 1.051 g/ml a 25°C). Mezclar la solución durante un mínimo de 15 minutos.

Retirar una pequeña muestra (<5 ml) de la solución para medir el pH. El pH debe estar entre 5.0 y 6.0. No es necesario ajustar el pH. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente el pH del producto resultante.

30 Para completar la composición, se debe filtrar asépticamente a la solución. Si es necesario, el lote compuesto se puede almacenar a entre 2°C y 8 °C durante hasta 24 horas en un recipiente a presión de acero inoxidable sellado y esterilizado antes de llenar los viales. El lote se puede filtrar más de una vez para asegurar la esterilidad.

## ES 2 745 068 T3

En condiciones asépticas, rellenar  $5.3 \pm 0.1$  ml de solución en viales de vidrio de pedernal Tipo 1 de 20 ml que se han lavado y esterilizado. Insertar en condiciones asépticas tapones de goma West 4416/50 en forma de lio de 20 mm que se hayan lavado, siliconado y esterilizado en los viales en la posición de liofilización.

- 5 Enfriar los estantes del liofilizador a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ . Cargar en condiciones asépticas las bandejas de viales llenos en los estantes de liofilizador. Una vez que se hayan cargado todas las bandejas, enfriar los estantes a  $-40^\circ\text{C}$  en 1 hora y mantener el producto a  $-35^\circ\text{C}$  o menos durante al menos 4 horas antes de continuar. Empezar a enfriar el condensador. Cuando la temperatura del condensador esté a  $-45^\circ\text{C}$  o menos, se comienza a evacuar la cámara. Cuando se alcancen 50-70 mm Hg de presión de vacío, se calienta la temperatura del estante a  $-20^\circ\text{C}$  durante 0.5 horas. Mantener la temperatura del estante a  $-20^\circ\text{C}$  durante 36 horas a una presión de aproximadamente 150 mm Hg (presión de 100 a 200 mm Hg). La temperatura del producto debe permanecer en o por encima de  $-20^\circ\text{C}$  durante al menos 6 horas antes de continuar. Calentar el estante a  $25^\circ\text{C}$  en 1 hora y reducir la presión hasta aproximadamente 50 mm Hg de presión. Mantener la temperatura del estante a  $25^\circ\text{C}$  y a aproximadamente 50 mm Hg de presión durante 14 horas. Ventilar la cámara con nitrógeno filtrado estéril a aproximadamente 950 mm Hg. Tapar los viales dentro del liofilizador. Retirar los viales del liofilizador y plegar los viales con sellos de aluminio de 20 mm. Los viales deben almacenarse entre  $2^\circ\text{C}$  y  $8^\circ\text{C}$  hasta que se complete la inspección.

El producto es una pastilla blanca a blanquecina. Los viales deben almacenarse entre  $2^\circ\text{C}$  y  $8^\circ\text{C}$  después de la inspección. Para fines de etiquetado e inspección, los viales pueden estar expuestos a  $19^\circ\text{C}$  -  $25^\circ\text{C}$  durante un máximo de 6 horas.

- 20 Los siguientes ejemplos se prepararon de acuerdo con la preparación del lote como se indica en el Ejemplo 12 mencionado anteriormente.

### Ejemplo 13

Ingrediente	mg/ml
SYN3	24
Ácido cítrico monohidratado USP	0.24
Ácido cítrico dihidratado USP	0.77
BigCHAP	120
Glicina USP	50
Ácido ascórbico USP	0.25
Agua inyectable USP qs ad	1 ml

- 25 El pH del producto resultante fue 5.34.

### Ejemplo 14

Ingrediente	mg/ml
SYN3	24
Ácido cítrico monohidratado USP	0.32
Ácido cítrico dihidratado USP	1.02
HP $\beta$ CD	200
Polisorbato 80	12
Ácido ascórbico USP	0.25
Agua inyectable USP qs ad	1 ml

## ES 2 745 068 T3

El pH del producto resultante fue 5.45.

### Ejemplo 15

Ingrediente	mg/ml
SYN3	24
Ácido cítrico monohidratado USP	0.45
Ácido cítrico dihidratado USP	1.79
Manitol	30
Polisorbato 80	72
Agua inyectable USP qs ad	1000 ml

5 El pH del producto resultante fue 5.76.

Las pruebas de estabilidad de los productos liofilizados resultantes de los Ejemplos 13, 14 y 15 produjeron los siguientes resultados:

### Ejemplo 16

Condición	Ejemplos		
	13	14	15
	mg/ml	mg/ml	mg/ml
Inicial	6.05	5.89	6.06
2 semanas -20°C	6.02	6.04	6.28
2 semanas 4°C	6.17	5.98	6.17
2 semanas 25°C	6.14	5.91	6.62
2 semanas 40°C	5.87	5.87	6.32
4 semanas -20°C	6.81	5.71	6.11
4 semanas 4°C	6.75	6.63	6.75
4 semanas 25°C	6.81	6.40	6.92
4 semanas 40°C	6.73	6.66	6.58
12 semanas 4°C	6.74	6.66	6.74
12 semanas 25°C	6.74	6.45	6.72
12 semanas 40°C	6.61	6.52	6.71

10

La prueba de estabilidad se realizó por HPLC. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyeron (se redisolviéron) con 19.5 ml de agua inyectable. Las muestras se colocaron en las condiciones de temperatura indicadas, se incubaron durante tiempos específicos y las concentraciones se determinaron mediante HPLC y se compararon con las concentraciones iniciales.

**Ejemplo 17**

Ingrediente	mg/ml
SYN3	24.0
Ácido cítrico monohidratado USP	0.32
Ácido cítrico dihidratado USP	1.02
Hidroxipropil-β-ciclodextrina	200
Polisorbato 80	12.0
Ácido ascórbico USP	0.25
Agua inyectable USP qs ad	1000 ml

La cantidad real de SYN3 que se cargará se ajustará de acuerdo con la pureza del lote de sustancias farmacéuticas mediante la siguiente fórmula:

$$5 \quad \text{gramos de SYN3} = 24.0 \times 1000 / (\% \text{Pureza})$$

Cálculo de la muestra:

Sustancia farmacológica SYN3 = 97.0% pura.

$24.0 \times 100/97.0 = 24.7$  gramos de SYN3 a cargar por un lote de 1 litro.

10 El siguiente ejemplo se preparó como tal: Inicialmente se determinó la cantidad de SYN3 que será cargada al lote de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{g SYN3/Litro} = 24.0 \text{ g/Litro} \times [100/(\% \text{SYN3 Pureza del Lote})]$$

A continuación, determinar el volumen de agua inyectable a ser cargada en el lote de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de agua inyectable (Litros)} = \text{Volumen del Lote (Litros)} \times 0.5$$

15 Cargar el volumen de agua inyectable en un recipiente de mezcla tarado equipado con un agitador. Cargar y disolver, con agitación, al hidroxipropil-β-ciclodextrina. Es necesario tener en cuenta que la disolución completa de hidroxipropil-β-ciclodextrina puede requerir aproximadamente de 30 a 45 minutos de agitación continua a una velocidad de agitación moderada. Se puede utilizar agua inyectable para enjuagar el recipiente de pesaje para recuperar todo el material. Cargar y disolver el polisorbato 80 en la solución. El polisorbato 80 se puede predisolver en 0.1 x volumen de lote total de agua inyectable (litros) y cargar en la solución.

20 Cargar y disolver con agitación el SYN3 en la solución. La disolución completa de SYN3 puede requerir hasta 1 hora de mezclar. Se puede usar agua para inyección para enjuagar el recipiente de pesaje para recuperar todo el material.

25 Se carga y se disuelve con agitación y en orden: ácido ascórbico, ácido cítrico monohidrato y citrato de sodio dihidrato en la solución. Se puede utilizar agua inyectable para enjuagar los recipientes de pesaje para recuperar todo el material. Agregar el agua inyectable para llevar el lote al volumen final (la densidad de la solución es de 1.058 g/ml a 25°C). Mezclar la solución durante un mínimo de 15 minutos.

30 Retirar una pequeña muestra (<5 ml) de la solución para medir el pH. El pH debe estar entre 5.0 y 6.0. No es necesario ajustar el pH. Filtrar en condiciones asépticas la solución que ha sido lavada y probada para determinar su integridad en un recipiente a presión de acero inoxidable esterilizado o equivalente. Si es necesario, el lote compuesto se puede almacenar a una temperatura de 2°C a 8°C durante un máximo de 24 horas en un recipiente a presión de acero inoxidable sellado y esterilizado antes del llenado. El lote se puede filtrar más de una vez para asegurar la esterilidad.

Rellenar en condiciones asépticas  $5.3 \pm 0.1$  ml de solución en viales de vidrio de sílex tipo 1 de 20 ml que se han lavado y esterilizado. Inserte asépticamente caucho en forma de lio que se haya lavado, siliconado y esterilizado en los viales en la posición de liofilización.

35 Para liofilizar, enfriar previamente los estantes del liofilizador a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ . Cargar en condiciones asépticas a las bandejas de viales llenos en los estantes de liofilizador. Después de cargar todas las bandejas, enfriar los estantes a  $-40^\circ\text{C}$  en 1 hora y mantener el producto a  $-35^\circ\text{C}$  o menos durante al menos 4 horas antes de continuar. Se comienza a enfriar el condensador. Cuando la temperatura del condensador esté a  $-45^\circ\text{C}$  o menos, se comienza a evacuar la cámara. Cuando se alcancen 50-70 mm Hg de presión de vacío, se calienta la temperatura del estante a  $-20^\circ\text{C}$  durante 0.5

horas. Mantener la temperatura del estante a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 36 horas a una presión de aproximadamente 150 mm Hg (presión de 100 a 200 mm Hg). La temperatura del producto debe permanecer en o por encima de  $-20^{\circ}\text{C}$  durante al menos 6 horas antes de continuar. Calentar el estante a  $25^{\circ}\text{C}$  en 1 hora y reducir la presión a aproximadamente 50 mm Hg de presión. Mantener la temperatura del estante a  $25^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente 50 mm Hg de presión durante 14 horas. Ventilar la cámara con nitrógeno filtrado estéril a aproximadamente 950 mm Hg. Tapar los viales dentro del liofilizador. Retirar los viales del liofilizador y plegar los viales con aluminio de 20 mm. Los viales deben almacenarse entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$  hasta que se complete la inspección.

El producto es una pastilla de color blanco a blanquecino. Los viales deben almacenarse entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$  después de la inspección. Para fines de etiquetado e inspección, los viales pueden estar expuestos a  $19^{\circ}\text{C}$ - $25^{\circ}\text{C}$  durante un máximo de 6 horas.

p53 (rAD/p53) permanece estable cuando se combina con las formulaciones liofilizadas de SYN3 durante al menos 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y 24 horas a  $25^{\circ}\text{C}$ . p53 permanece estable cuando se combina con las formulaciones de solución acuosa de SYN3 durante al menos 4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y 24 horas a  $25^{\circ}\text{C}$ .

### Ejemplo 18

Este ejemplo ilustra la síntesis de SYN3.

#### Parte I: Síntesis del Compuesto III

El esquema sintético para SYN3 se muestra en la Figura 2, que está adaptado de la Patente de Estados Unidos No. 6,392,069. La lactona del ácido lactobiónico (II) se sintetizó disolviendo un g (2,8 mmol) de ácido lactobiónico (I) en 50 ml de metanol, evaporando a sequedad en un evaporador rotatorio y repitiendo este proceso seis veces. Para obtener el Compuesto III, el residuo resultante (II) se disolvió en 50 ml de isopropanol calentando a  $50^{\circ}\text{C}$ . A esta solución se le añadieron 1.2 ml (8,4 mmol) de N-3-aminopropil)-1,2-propanodiamina. La temperatura se aumentó a  $100^{\circ}\text{C}$  y la solución se agitó durante tres horas. El solvente se eliminó mediante evaporación rotatoria y el residuo resultante se lavó varias veces con cloroformo para eliminar el exceso de N-(3-aminopropil)-1,3-propanodiamina sin reaccionar. El residuo restante (III) se utilizó como se muestra en la Parte 3 a continuación.

#### Parte 2: Síntesis del Compuesto IV

El compuesto IV se sintetizó disolviendo 2.28 g de ácido cólico (5,6 mmol) en N,N-dimetilformamida calentando a  $60^{\circ}\text{C}$ . Se añadió trietilamina (0.78 ml (5,6 mmol)) y la solución se enfrió en un baño de hielo. Posteriormente se añadió cloroformato de isobutilo (0.73 ml (5.6 mmol)) y se formó un precipitado blanco cuando se continuó la agitación durante diez minutos.

#### Parte 3: Síntesis de SYN3 (Compuesto V)

El compuesto III se disolvió en N,N-dimetilformamida, se enfrió en un baño de hielo y se agitó. La suspensión resultante de la síntesis del Compuesto IV se filtró en la solución que contenía a el Compuesto III. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. El solvente se eliminó utilizando evaporación rotatoria al alto vacío y el residuo se disolvió en 100 ml de cloroformo/metanol (50/50). Veinticinco ml de esta solución se purificaron por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice utilizando cloroformo/metanol (60/40) como disolvente de elución. El análisis de las fracciones que se eluyeron de la columna se realizó mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice utilizando una fase móvil que consiste en cloroformo/metanol/agua/hidróxido de amonio concentrado (100/80/10/5). Los compuestos se visualizaron mediante carbonización después de pulverizar con ácido sulfúrico etanólico. Las fracciones que contenían el producto se consolidaron y se repurificaron utilizando cromatografía flash y cloroformo/metanol/agua/hidróxido de amonio concentrado (100/80/10/5) como el disolvente de elución. Las fracciones que contenían a el producto se consolidaron y evaporaron a un polvo blanco (300 mg de Compuesto V). El análisis espectrométrico de masas de  $1\text{H-RMN}$  y MALDI del producto fue consistente con la estructura mostrada.

Las realizaciones particulares de la invención descritas anteriormente deben considerarse como ilustrativas y no restrictivas. El alcance de la presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas en lugar de limitarse a los ejemplos contenidos en la descripción anterior.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica liofilizada que comprende N-(3-colamidopropil)-N-(3(actobionamidopropil))-colamida (SYN3), hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP $\beta$ CD) y un sistema de tamponamiento de citrato que proporciona un pH de 5 a 6 y un acarreador farmacéuticamente aceptable.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende además a al menos un agente adicional seleccionado de Polisorbato 80, BigCHAP, Polisorbato 20, copolímero de bloque de polietilenglicol.
3. La composición de la reivindicación 2, en la que el Polisorbato 80 está presente en una concentración de 1 a 36 mg/ml, el BigCHAP está presente en una concentración de 20 a 360 mg/ml y el copolímero de bloques de polietilenglicol está presente en una concentración de 1 a 150 mg/ml.
- 10 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición comprende HP $\beta$ CD en una concentración de 50 a 500 mg/ml.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición comprende además al menos un agente de carga farmacéuticamente aceptable.
- 15 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición comprende además ácido ascórbico.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que el ácido ascórbico está presente en una concentración de 0.001 a 0.6 mg/ml.
8. La composición de una de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición comprende de 0.001 mg/ml a 150 mg/ml de N-(3-colamidopropil)-N-(3 (actobionamidopropil)) - colamida
- 20 9. La composición de una de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en el tratamiento del cáncer de vejiga, en la que la composición se utiliza con un sistema de administración de genes para administrar a un gen terapéutico.
10. Un sistema de administración de genes para administrar a un gen terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer de vejiga, en el que el sistema se utiliza con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 8.
- 25 11. La composición para el uso de la reivindicación 9 o el sistema para el uso de la reivindicación 10, en el que el sistema de administración de genes es un sistema de administración de vectores adenovirales recombinantes.
12. La composición para el uso de la reivindicación 11 o el sistema para el uso de la reivindicación 11, en el que el sistema de administración del vector adenoviral es para el interferón a2b.
- 30 13. El uso de una composición liofilizada de una de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 8 para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer de vejiga en un paciente en el que la composición se utiliza con un sistema de administración de genes para administrar a un gen terapéutico.
14. El uso de la reivindicación 13, en el que el sistema de entrega de genes es un sistema de vector adenoviral recombinante, preferiblemente para el interferón a2b.

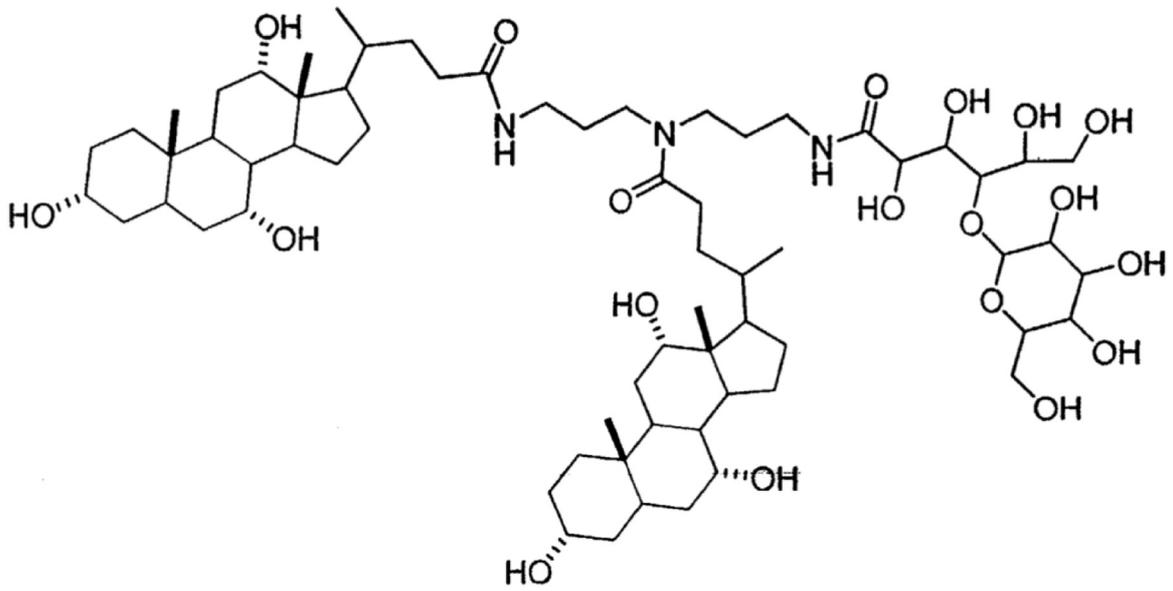


Figura 1

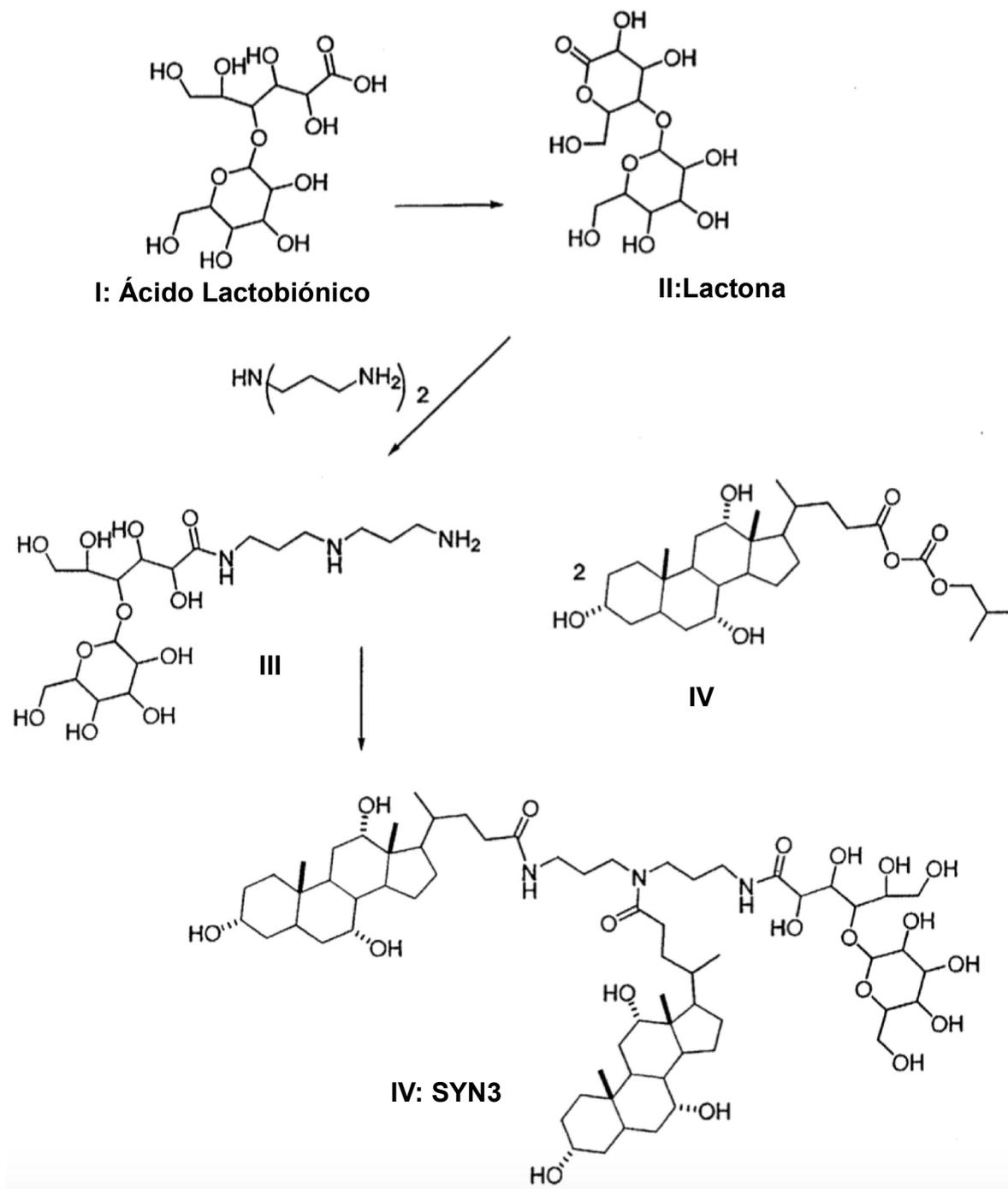


Figura 2