

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 223**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/4375 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2014 PCT/US2014/029907**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145187**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2014 E 14764361 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2968146**

54 Título: **Composición de liposoma para liberación controlada de fármaco**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361792850 P

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

04.08.2020

73 Titular/es:

**TAIWAN LIPOSOME COMPANY, LTD. (50.0%)
2F 3 Yuanqu Street, Nangang District
Taipei City 11503 , TW y
TLC BIOPHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KAN, PEI;
TSENG, YUN-LONG y
OU, HAN, CHUN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 777 223 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de liposoma para liberación controlada de fármaco

5 Campo de tecnología

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un liposoma, por lo menos un donador de ion contrario polivalente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, por lo menos un donador de ion contrario monovalente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un agente terapéutico.

10

Base de la invención

Los liposomas han sido usados ampliamente como un vehículo *in vivo* de diferentes agentes terapéuticos. Idealmente, tales liposomas deberían tener una elevada eficiencia de encapsulación y un perfil extendido de retención (es decir mínima liberación del fármaco antes de alcanzar el sitio objetivo).

15

El producto NanoVNB® es una vinorelbina liposómica, que utiliza el liposoma para mejorar la retención de vinorelbina antes de que ella alcance el sitio objetivo. El ensayo clínico de fase I del producto NanoVNB® mostró eficacia mejorada contra el cáncer, pero la retención *in vivo* extendida de vinorelbina conduce también a incremento en la toxicidad. El documento WO2005107712 divulga una composición farmacéutica que comprende un liposoma que contiene una sal de amonio sustituido y/o de un polianión, y un agente terapéutico como un fármaco contra el cáncer (cualquier inhibidor de topoisomerasa, alcaloide de vinca usado para inhibir el crecimiento de las células de cáncer). La concentración de las sales de amonio sustituido y/o de polianión (sulfato de dextrano) dentro del liposoma está por lo menos a una concentración de 10mM o más.

20

25

Por ello, existe una necesidad de suministrar una composición liposómica que sea útil para la entrega de un agente terapéutico con un perfil de retención ajustable, para obtener un balance entre la eficacia óptima contra el cáncer y mínimo efecto lateral. La presente invención trata esta necesidad, así como otras necesidades importantes.

30 Breve resumen de la invención

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción de los procedimientos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicaciones de la presente invención, para uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

35

La presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un liposoma, por lo menos un donador de ion contrario polivalente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, por lo menos un donador de ion contrario monovalente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un agente terapéutico, un derivado de él, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. De manera ventajosa, esta composición farmacéutica suministra un perfil de retención ajustable y un porcentaje ajustable de encapsulación del agente terapéutico.

40

En particular, la presente invención suministra una composición farmacéutica, que comprende (a) por lo menos un liposoma que tiene un componente de formación de partícula seleccionado de entre el grupo consistente en (i) fosfolípido y (ii) una mezcla de por lo menos un fosfolípido y colesterol; (b) sulfato de dextrano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad que varía de 0.1 mM a menos de 10 mM; (c) sulfato de amonio en una cantidad que varía de 100 mM a 500 mM; y (d) alcaloide de vinca.

45

La presente invención está dirigida también a procedimientos para la inhibición del crecimiento de células de cáncer en un sujeto, que lo necesita. El procedimiento comprende la administración de una composición farmacéutica descrita en esta memoria, en el que se reducen los síntomas y signos de cáncer en el sujeto. De manera ventajosa, este procedimiento mejorar la inhibición de células de cáncer y reduce la toxicidad.

50

Debería entenderse que las declaraciones que contienen estos términos no limitan el tema objeto descrito en esta memoria o limitan el significado o alcance de las reivindicaciones de la patente abajo. Las realizaciones de la invención cubiertas por esa patente están definidas por las reivindicaciones abajo, no en este resumen. Este resumen es un vistazo de alto nivel de los diferentes aspectos de la invención e introduce algunos de los conceptos que son descritos adicionalmente en la sección de Descripción Detallada, abajo. No se pretende que este resumen identifique rasgos clave o esenciales del tema objeto reivindicado, ni se pretende usarlo de manera aislada para determinar el alcance del tema objeto reivindicado. El tema objeto debería ser entendido mediante referencia a partes apropiadas de todo el documento, cualquiera o todos los dibujos y cada reivindicación.

60

La invención se tornará más evidente cuando sea leída con las figuras acompañantes y la descripción detallada que sigue.

65

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la precipitación de sulfato de sodio de dextrano y vinorelbina en el liposoma.

5 La figura 2 muestra el promedio de volumen de tumor en el grupo NanoVNB, el grupo LV304 y el grupo salino (control).

La figura 3 muestra el promedio de tiempo de supervivencia en el grupo NanoVNB, el grupo LV304 y el grupo salino (control).

La figura 4 muestra el puntaje de toxicidad paren la piel en el grupo NanoVNB y el grupo LV304.

10 Descripción detallada de la invención

Definiciones

15 Como se emplearon anteriormente y a través de la divulgación, a menos que se indique de otro modo, deberá entenderse que los siguientes términos tienen los siguientes significados.

Como se usa en esta memoria, las formas singulares "un" "una" y "el" incluyen la referencia plural, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

20 Una "cantidad efectiva" como se usa en esta memoria, incluye una dosificación de la composición farmacéutica que es suficiente para reducir los síntomas y signos del cáncer, que incluyen, pero no están limitados a, pérdida de peso, dolor y masa del tumor, que es detectable, bien sea por vía clínica como una masa palpable o por vía radiológica a través de diferentes medios de imagen.

25 El término "tratando", "tratado" o "tratamiento" como se usa en esta memoria, incluye usos o resultados preventivos (por ejemplo profilácticos), paliativos y curativos.

El término "inhibiendo" y "suprimiendo" incluye la ralentización o detención del crecimiento de.

30 El término "sujeto" puede referirse a un vertebrado que tienen cáncer o vertebrado del que se presume requiere el tratamiento contra el cáncer. Los sujetos incluyen animales de sangre caliente, tales como mamíferos, tales como primates, y, más preferiblemente, un humano. Los primates no humanos son sujetos también. El término sujeto incluye animales domesticados, tales como gatos, perros, etc., ganado (por ejemplo vacas, caballos, cerdos, ovejas, carneros, etc.) y animales de laboratorio (por ejemplo ratón, conejo, rata, gerbo, cobayos, etc.). Así, en esta memoria se contemplan usos veterinarios y formulaciones médicas.

35 El término "donador de ion contrario" incluye un donador de ion contrario capaz de formar una sal con un agente terapéutico y no reduce la actividad del agente terapéutico. En una realización, el agente terapéutico es un ácido anfipático con una carga negativa neta, el donador de ion contrario es un ion catiónico o una entidad enlazada de manera covalente a uno o más grupos funcionales catiónicos. En otra realización, el agente terapéutico es una base anfipática con una carga positiva neta, el donador de ion contrario es un ion aniónico o una entidad enlazada de manera covalente a uno más grupos funcionales aniónicos. El donador de ion contrario tiene elevada solubilidad en el agente que lleva el componente del liposoma, pero una baja permeabilidad de membrana de liposoma (bicapa). Por ello, el donador de ion contrario es retenido en el componente que lleva el agente durante la carga del agente terapéutico, y durante el almacenamiento.

Debe entenderse que todos los números en esta memoria, están modificados por "aproximadamente".

40 Como se usa en esta memoria, el término "alquilo" se refiere a un radical alifático, saturado, de cadena recta o ramificada, que tiene de 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Alquilo puede incluir cualquier número de carbonos, tales como C₁₋₂, C₁₋₃, C₁₋₄, C₁₋₅, C₁₋₆, C₁₋₇, C₁₋₈, C₁₋₉, C₁₋₁₀, C₂₋₃, C₂₋₄, C₂₋₅, C₂₋₆, C₃₋₄, C₃₋₅, C₃₋₆, C₄₋₅, C₄₋₆ y C₅₋₆. por ejemplo, alquilo C₁₋₆ incluye, pero no está limitado a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo, etc. Alquilo puede referirse también a grupos alquilo que tienen hasta 20 átomos de carbono, tales, pero no limitados a heptilo, octilo, nonilo, y decilo.

55 Como se usa en esta memoria, el término "arilo" se refiere a un sistema de anillos aromáticos que tiene cualquier número adecuado de átomos de anillo y cualquier número adecuado de anillos. Los grupos arilo pueden incluir cualquier número adecuado de átomos de anillo, tales como 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 átomos de anillo, así como de 6 a 10, 6 a 12, o 6 a 14 miembros del anillo. Los grupos arilo pueden ser 15 monociclos, fusionados para formar grupos bicíclicos o tricíclicos, o estar unidos mediante un enlace para formar un grupo biarilo. Los grupos arilo representativos incluyen fenilo, naftilo y bifenilo. Otros grupos arilo incluyen bencilo, que tienen un grupo metileno de enlace. Algunos grupos arilo tienen de 6 a 12 miembros del anillo, tales como fenilo, naftilo o bifenilo. Otros grupos arilo tienen de 6 a 10 miembros del anillo, tales como fenilo o naftilo. algunos otros grupos arilo tienen de 6 a 20 miembros del anillo, tales como fenilo. Los grupos "arilo sustituidos" pueden estar sustituidos con uno o más grupos seleccionados de halo, hidroxilo, amino, alquilamino, amido, acilo, nitro, ciano, y alcoxi.

Las "sales farmacéuticamente aceptables" de un ácido anfipático de la presente invención, son sales formadas con bases, es decir sales catiónicas tales como sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, así como 4 sales de amonio tales como sales de amonio, de trimetilamonio, de dietilamonio, y de tris-(hidroximetil)-metil-amonio.

5 También son posibles sales de adición ácida similares, tales como de ácidos minerales, ácidos carboxílicos orgánicos y sulfónicos orgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido metanosulfónico, ácido maleico, suministradas a un agente terapéutico básico con un constituyente tal como piridilo, como parte de la estructura.

10 Liposoma

El término "liposoma" como se usa en esta memoria indica liposoma multivesicular (MVL), de vesícula multilaminar (MLV) o vesículas unilaminares pequeñas o grandes (ULV). Los liposomas tienen tamaño nano y comprenden un componente de formación de partícula y un componente de transporte de agente. El componente de formación de partícula forma una barrera de lípido incluida, y el componente de transporte de agente comprende un medio incluido por el componente de formación de partícula.

El componente de formación de partícula puede ser preparado a partir de un fosfolípido o una mezcla de por lo menos un fosfolípido, y colesterol. Ejemplos de los fosfolípidos usados en la presente invención incluyen, pero no están limitados a, fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina de huevo (EPC), fosfatidilglicerol de huevo (EPG), fosfatidiletanolamina de huevo (EPE), fosfatidilserina de huevo (EPS), ácido fosfatídico de huevo (EPA), fosfatidilinositol de huevo (EPI), fosfatidilcolina de soja (SPC), fosfatidilglicerol de soja (SPG), fosfatidiletanolamina de soja (SPE), fosfatidilserina de soja (SPS), ácido fosfatídico de soja (SPA), fosfatidilinositol de soja (SPI), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleilfosfatidilglicerol (DOPG), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), hexadecilfosfocolina (HEPC), fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoilestearoilfosfatidilcolina (PSPC), palmitoilestearoilfosfatidilglicerol (PSPG), monooleilfosfatidiletanolamina (MOPE), 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatidilserina (DOPS), dimiristoilfosfatidilserina (DMPS), diestearoilfosfatidilserina (DSPS), ácido dipalmitoilfosfatídico (DPPA), ácido 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatídico (DOPA), ácido dimiristoilfosfatídico (DMPA), ácido diestearoilfosfatídico (DSPA), dipalmitoilfosfatidilinositol (DPPI), 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfatidilinositol (DOPI), dimiristoilfosfatidilinositol (DMPI), diestearoilfosfatidilinositol (DSPI), y una mezcla de ellos.

35 En una realización, el componente de formación de partícula está libre de ácido graso o lípido catiónico (es decir un lípido que porta una carga neta positiva a pH fisiológico).

En otra realización, el componente de formación de partícula incluye un polímero hidrofílico con una cadena larga de polímero neutro flexible altamente hidratado unido a una molécula de fosfolípido. Sin estar atados por ninguna teoría, se cree que el polímero hidrofílico estabiliza el liposoma y da como resultado un mayor tiempo de circulación *in vivo*. Los ejemplos de polímero hidrofílico incluyen, pero no están limitados a, polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de aproximadamente 2,000 a aproximadamente 5,000 dalton, metoxi PEG (mPEG), gangliósido GM1, ácido polisialico, ácido poliláctico (también denominado como polilactida), ácido poliglicólico (también denominado poliglicolida), ácido poliláctico poliglicólico, polivinil alcohol, polivinilpirrolidona, polimetoxazolona, polietiloxazolona, polihidroxietiloxazolona, polihidroxipropiloxazolona, poliaspartamida, polihidroxipropil metacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polivinilmetiléter, polihidroxietil acrilato, derivados de celulosas tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa y polímeros sintéticos.

50 En un grupo de realización, los fosfolípidos son seleccionados de DSPC y DSPE-PEG, en los que el peso molecular de PEG es aproximadamente 2,000 dalton (en lo sucesivo DSPE-PEG2000).

En otro grupo de realización, la relación molar de DSPC, colesterol y DSPE-PEG2000 es de aproximadamente 3:2:0.45.

55 El componente de formación de partícula puede comprender además un conjugado de lípido de un anticuerpo o un péptido que actúa como un fragmento que da objetivo, para habilitar al liposoma a ligarse específicamente a una célula objetivo que porta una molécula objetivo. Ejemplos de las moléculas objetivo incluyen, pero no están limitadas a, receptor de factor de crecimiento de epidermis (EGFR), receptor de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), antígeno carcinoembrionario (CEA), y erbB-2/neu (HER2).

Los liposomas tienen un promedio de diámetro de partícula de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 200 nm, más preferiblemente de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm.

65 Los liposomas preparados en esta invención pueden ser generados mediante técnicas convencionales usadas para preparar vesículas. Estas técnicas incluyen el procedimiento de inyección de éter (Deamer et al., Acad. Sci. (1978)

308: 250), el procedimiento de tensioactivo (Brunner et al., *Biochim. Biophys. Acta* (1976) 455: 322), el procedimiento de congelación-descongelación (Pick et al., *Arch. Biochim. Biophys.* (1981) 212: 186), el procedimiento de evaporación en fase inversa (Szoka et al., *Biochim. Biophys. Acta.* (1980) 601: 559 71), el procedimiento de tratamiento ultrasónico (Huang et al., *Biochemistry* (1969) 8: 344), el procedimiento de inyección de etanol (Kremer et al., *Biochemistry* (1977) 16: 3932), el procedimiento de extrusión (Hope et al., *Biochim. Biophys. Acta* (1985) 812:55 65), el procedimiento de prensa francesa (Barenholz et al., *FEBS Lett.* (1979) 99: 210) y procedimientos detallados en Szoka, F., Jr., et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980). todos los procesos anteriores son tecnologías básicas para la formación de vesículas de liposoma.

10 Agente terapéutico

El agente terapéutico es un alcaloide de vinca.

El donador de ion contrario monovalente

15 El donador de ion contrario monovalente es sulfato de amonio. La concentración del donador de ion contrario monovalente es 100 a 500 mM, o cualquier valor o intervalo entre ellos en incrementos de 10 mM (por ejemplo 80mM, 320 mM). En otra realización, la concentración del donador de ion contrario monovalente es de aproximadamente 150 a aproximadamente 450 mM. En todavía otra realización, la concentración del donador de ion contrario monovalente es de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 400 mM. En aun otra realización, la concentración del donador de ion contrario monovalente es de aproximadamente 300 mM.

El ion contrario polivalente

25 El donador de ion contrario polivalente es sulfato de dextrano, que puede tener un peso molecular de aproximadamente 1,600 dalton a aproximadamente 8,000 dalton.

En una realización, la sal farmacéuticamente aceptable de sulfato de dextrano es seleccionada de sulfato de dextrano de amonio o sulfato de dextrano de sodio.

30 La composición farmacéutica

La composición farmacéutica de la presente invención, que está definida por las reivindicaciones, comprende una combinación de a) por lo menos un liposoma que tiene un componente de formación de partícula seleccionado de una mezcla de uno o más fosfolípidos, y colesterol, b) por lo menos un donador de ion contrario polivalente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con una concentración entre aproximadamente 0.1mM a aproximadamente menos de 10mM; (c) por lo menos un donador de ion contrario monovalente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 450 mM; y (d) un alcaloide de vinca. En todavía otra realización, el componente de formación de partícula comprende además un polímero hidrofílico.

De manera ventajosa, mediante la combinación de un donador de ion contrario polivalente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un donador de ion contrario monovalente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden ajustarse la eficiencia de encapsulación y/o perfil de retención del agente terapéutico, para mantener la eficiencia terapéutica y todavía minimizar la toxicidad.

En un grupo de realizaciones, los grupos funcionales aniónicos del donador de ion contrario polivalente o su sal farmacéuticamente aceptable, tienen una valencia equivalente total por litro de aproximadamente 1 a aproximadamente 160 miliequivalentes (mEq), de aproximadamente 3 a 160 mEq, de aproximadamente 1 a aproximadamente 320 mEq, de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 mEq, de aproximadamente 3 a aproximadamente 250 mEq, de aproximadamente 160 a aproximadamente 250 mEq, de aproximadamente 160 a aproximadamente 320 o cualquier valor o intervalo entre 1 y 320 mEq en incrementos de 1 mEq (por ejemplo 23 mEq, 233 mEq). En otra realización, el grupo funcional aniónico del donador de ion contrario polivalente o su sal farmacéuticamente aceptable es sulfato.

En otro grupo de realizaciones, la concentración del donador de ion contrario polivalente o su sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 2mM a menos de 8mM, de aproximadamente 0.1mM a menos de 8mM, de aproximadamente 0.1 mM a menos de aproximadamente 10mM, de aproximadamente 2mM a menos de 10 mM, o cualquier valor o intervalo entre 0.1mM y 10mM en incrementos de 0.1 mM (por ejemplo 1.5 mM, 8.3 mM).

La composición farmacéutica es formulada para cualquier ruta adecuada de administración, incluyendo intracraneal, intracerebral, intraventricular, intratecal, intraespinal, oral, tópica, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intratumoral y similares.

65 La dosificación de la composición farmacéutica de la presente invención puede ser determinada por la persona experta en la técnica, de acuerdo con las realizaciones. Se contemplan formas de dosificación única o dosificación

múltiple, en las que cada una ofrece ventajas en ciertos ajustes clínicos. De acuerdo con la presente invención, la cantidad real de la composición farmacéutica que va a ser administrada puede variar de acuerdo con la edad, peso, condición general del sujeto que va a ser tratado, el tipo de cáncer, toxicidad, y está a discreción de los profesionales médicos.

5 En algunas realizaciones, por lo menos una porción del agente terapéutico (tal como vinorelbina) forma una sal con la sal farmacéuticamente aceptable del donador de ion contrario polivalente y precipita en el núcleo acuoso intraliposómico, como es evidente en la figura 1.

10 El procedimiento para la inhibición del crecimiento de células de cáncer

La invención está dirigida a procedimientos para la inhibición del crecimiento de células de cáncer en un sujeto, que comprenden la administración de una cantidad efectiva de la composición farmacéutica descrita en esta memoria, a un sujeto que lo requiere, mediante los cuales se reducen los síntomas y signos del cáncer y/o toxicidad en el sujeto.

15 La composición farmacéutica puede ser administrada sola, o como un adyuvante para la cirugía, por ejemplo antes de la cirugía para reducir el tamaño del tumor y/o después de la cirugía para reducir la posibilidad de metástasis, por ejemplo inhibiendo el crecimiento y migración de las células circulantes de tumor a través del torrente sanguíneo.

20 La composición farmacéutica puede ser administrada antes, después o simultáneamente con uno o más agentes contra el cáncer. El agente contra el cáncer incluye agente quimioterapéutico convencional, terapia focalizada contra el cáncer o terapia de radiación.

25 El agente quimioterapéutico convencional comprende inhibidor de síntesis de ADN, agente de alquilación, agentes antifolato, inhibidor metabólico o combinación de ellos.

30 La terapia focalizada contra el cáncer son medicaciones que inhiben el crecimiento de células de cáncer, interfiriendo con moléculas objetivo específicas necesarias para la carcinogénesis y el crecimiento del cáncer, más que por la simple interferencia con células que se dividen rápidamente (por ejemplo con agente quimioterapéutico convencional). La terapia focalizada contra el cáncer comprende inhibidor de quinasa, inhibidor de angiogénesis, inhibidor de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de HER2/neu o la combinación de ellos.

35 La terapia de radiación utiliza radiación de alta energía para encoger el tumor y matar células de cáncer. Los ejemplos de terapia de radiación incluyen rayos X, rayos gamma y partículas cargadas.

Los siguientes ejemplos ilustran más la presente invención. Se pretende que estos ejemplos sean simplemente ilustrativos de la presente invención y no debe interpretarse que son limitantes.

Ejemplo 1: preparación de liposomas

40 Los liposomas fueron preparados mediante el procedimiento de inyección de solvente. Los lípidos, incluyendo DSPC, DSPE-PEG2000 y colesterol, fueron combinados en una relación molar de 3:0.045:2 y disueltos en etanol al 99.9% a aproximadamente 60°C en un recipiente. Para la disolución de los lípidos se usó un baño ultrasónico de mesa.

45 La solución de lípidos disueltos fue añadida a la solución de fosfato de sodio 1.0 mM a 100mL/min mediante una bomba peristáltica y se mezclaron las dos soluciones. Se pasó entonces la mezcla de lípidos por 6-10 veces a través de una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 0.2µm y 0.1µm, respectivamente. se formaron los liposomas (o vesículas multilaminares grandes) y el promedio de diámetro de la vesícula fue de aproximadamente 100-120 nm (medido mediante Malvern ZetaSizer Nano ZS-90).

50 La mezcla de liposomas fue sometida a diálisis y concentrada mediante un sistema de filtración con flujo tangencial, contra solución de cloruro de sodio al 0.9% (p/p) y solución de sacarosa al 9% (p/o) con Millipore Pellicon 2 Mini Ultrafiltration Module Biomax-100C (0.1m2), y entonces esterilizada usando un filtro estéril de 0.2 µm.

Ejemplo 2: efecto de donador de ion contrario monovalente sobre la eficiencia de encapsulación y perfil de retención

55 La composición farmacéutica fue preparada mezclando los liposomas del Ejemplo 1 con sulfato de amonio, un donador de ion contrario monovalente. Se estableció un gradiente a través de la membrana bicapa de lípido del liposoma, usando sulfato de amonio 300 mM y 600 mM, para la carga remota de vinorelbina. Se evaluaron la eficiencia de encapsulación (carga) y el perfil de retención de vinorelbina liposómica, usando el procedimiento de liberación *in vitro* de plasma y en la tabla 1 se resumen los resultados.

60 Resultados: los datos muestran que el sulfato de amonio fue efectivo en la carga o encapsulación de vinorelbina en el liposoma. Sin embargo, el sulfato de amonio fue menos efectivo en la retención de vinorelbina en el liposoma, con

menos de 30% de vinorelbina permaneciendo encapsulada en el liposoma después de 24 horas de incubación del plasma.

Tabla 1. Características de composiciones farmacéuticas que tienen donadores de ion contrario monovalente

Composición farmacéutica	Donador de ion contrario monovalente	Tamaño de partícula [nm]	Eficiencia de encapsulación [%]	% de vinorelbina encapsulada que permanece después de 24h de incubación de plasma
LV001	Sulfato de amonio 300 mM	93.3	93	28.7
LV006	Sulfato de amonio 600 mM	93.6	93	24.7

5 Ejemplo 3: efecto de donador de ion contrario polivalente sobre la eficiencia de encapsulación y perfil de retención

10 Se convirtió sulfato de dextrano de sodio con un peso molecular de 8,000 (8K) dalton, en sulfato de dextrano de amonio (una sal farmacéuticamente aceptable de sulfato de dextrano) mediante columna de intercambio iónico DOWEX. Se prepararon dos composiciones farmacéuticas mezclando los liposomas del Ejemplo 1 con sulfato de dextrano de amonio 4mM y 8 mM respectivamente, seguido por la carga remota de aproximadamente 2mg de Vinorelbine, incubada a aproximadamente 60 °C.

15 Se evaluaron la eficiencia de encapsulación y el perfil de retención de vinorelbina liposómica en estas dos composiciones farmacéuticas, usando el procedimiento de liberación *in vitro* de plasma y en la tabla 2 se resumen los resultados.

20 Resultados: El sulfato de dextrano de amonio 8mM dio como resultado una eficiencia de encapsulación de 93%, mientras la eficiencia de encapsulación para sulfato de dextrano de amonio 4 mM estuvo por debajo de 90%. De manera similar, la formulación de LV009 en la tabla 4 incluyó solamente donador de ion contrario polivalente y tuvo una eficiencia de encapsulación menor a 90% y una tasa de retención de 98.74%, 24 horas después de la incubación de plasma.

Tabla 2. Características de composiciones farmacéuticas que tienen donadores de ion contrario polivalente.

Composición farmacéutica	Sal de donador de ion contrario polivalente	Tamaño de partícula	Eficiencia de encapsulación
	Sulfato de dextrano de amonio (MW=8K)	(Nm)	(%)
LV702	4mM	114	84
LV703	8mM	114	93

25 Ejemplo 4: efecto de combinación de donadores de ion contrario mono- y polivalentes

30 Se condujo un estudio *in vitro* para evaluar la combinación de donadores de ion contrario mono- y polivalentes sobre el perfil de retención de vinorelbina liposómica.

Se mezclaron liposomas preparados de acuerdo con el Ejemplo 1 con sulfato de amonio 300mM (donador de ion contrario monovalente) y diferentes concentraciones de sulfato de dextrano de sodio (sal de donador de ion contrario polivalente).

35 Se evaluaron la eficiencia de encapsulación y el perfil de retención de diferentes vinorelbina liposómicas, usando el procedimiento de liberación *in vitro* de plasma de 24 horas y en la tabla 3 se resumen los resultados.

40 Resultados: Los datos demuestran que las diferentes combinaciones de donadores de ion contrario mono- y polivalentes mantienen las eficiencias de encapsulación de vinorelbina, y el tamaño de liposoma fue de alrededor 100 nm. Adicionalmente, el perfil de retención de vinorelbina liposómica depende de la concentración del donador de ion contrario polivalente, el sulfato de dextrano de sodio 8mM está asociado con un porcentaje de retención de vinorelbina a 24 horas (78.9%) mayor que el de sulfato de dextrano de sodio 2mM (51.8%).

45 Tabla 3. Características de vinorelbina liposómica con combinación de donadores de ion contrario mono- y polivalentes

Composición farmacéutica	Tipos de donador de ion contrario y concentración (mM)		Tamaño de partícula	Eficiencia de encapsulación	% de vinorelbina encapsulada que permanece después de incubación de plasma por 24h
	Sulfato de amonio	Sulfato de dextrano de sodio	nm	%	%
LV301	300	2	106.2	101.6	51.8
LV302	300	4	104.5	106.3	67.3
LV303	300	8	101.5	104.6	78.9

Ejemplo 5: efectos de diferentes sales de donador de ion contrario polivalente

5 Se condujo un estudio *in vitro* para evaluar el efecto de diferentes sales de donador de ion contrario polivalente sobre el perfil de retención de vinorelbina liposómica.

Se mezclaron liposomas preparados de acuerdo con el Ejemplo 1 con sulfato de amonio (AS) 300mM y dos diferentes sales de donador de ion contrario polivalente: sal de sodio y sal de amonio de sulfato de dextrano (DS).

10 Se evaluó la eficiencia de encapsulación y el perfil de retención de vinorelbina liposómica, usando el procedimiento de liberación *in vitro* de plasma de 24 horas y en la tabla 4 se resumen los resultados.

15 Resultados: Los datos muestran que la sal de sodio y la sal de amonio de sulfato de dextrano fueron igualmente efectivas en la retención de vinorelbina en el liposoma después de 24 horas de incubación de plasma. Adicionalmente, cuando la concentración de donador de ion contrario polivalente o su sal está en 10mM, el perfil de retención de la combinación de donador de ion contrario mono- y polivalente (100% y 94.2% de vinorelbina remanente en el liposoma a 24 horas) fue similar al de la composición de donador de ion contrario polivalente (98.7% de vinorelbina remanente en el liposoma después de 24 horas). Esto está en contraste con los datos de la tabla 3, en los que cuando la concentración del donador de ion contrario polivalente es menor que 10mM, el perfil de retención de vinorelbina liposómica depende de la concentración del donador de ion contrario polivalente.

Tabla 4. Características de vinorelbina liposómica con combinación de donadores de ion contrario mono- y polivalente

Composición farmacéutica	Combinación de donadores de ion contrario	Tamaño de partícula (nm)	Eficiencia de encapsulación	% de vinorelbina encapsulada remanente después de incubación de plasma por 24h
LV007	AS 300mM /sal de sodio de DS 10mM	112.7	85.1%	100
LV008	AS 300mM /sal de amonio de DS 10mM	114.1	83.7%	94.2
LV009	Sal de amonio de DS 10mM	108.8	89.4%	98.7

25 Ejemplo 6: efecto de diferentes pesos moleculares de donador de ion contrario polivalente

30 Se evaluó el efecto del peso molecular de donador de ion contrario polivalente sobre el perfil de retención de vinorelbina liposómica. Se mezclaron liposomas preparados de acuerdo con el Ejemplo 1, con sulfato de amonio y 5K y 8K de sulfato de dextrano, respectivamente.

Se evaluaron las eficiencias de encapsulación y el perfil de retención de vinorelbina liposómicas, usando el procedimiento de liberación *in vitro* de plasma de 24 horas y en la tabla 5 se resumen los resultados.

35 Resultados: la valencia total del donador de ion contrario polivalente afecta el perfil de retención de vinorelbina liposómica. Los datos indican que el donador de ion contrario polivalente con mayor valencia está asociado con vinorelbina más encapsulada a 24 horas.

Tabla 5. Características de vinorelbina liposómica con diferentes pesos moleculares de donador de ion contrario polivalente.

Composición farmacéutica	Concentración de sulfato de amonio (mM)	Concentración de Sulfato de dextrano (mM)/peso molecular (K)	Tamaño de partícula (nm)	Valencia total (mEq)	% de vinorelbina encapsulada remanente después de incubación de plasma por 24h
LV108	300	3mM/5K	110.0	73.68	55.9
LV102	300	6mM/5K	114.5	147.36	67.7
LV301	300	2mM/8K	106.2	78.64	51.8
LV302	300	4mM/8K	104.5	157.28	67.3

Ejemplo 7: perfil ajustable de retención usando combinación de donador de ion contrario mono- y polivalente

Se prepararon diferentes composiciones farmacéuticas mezclando los liposomas del Ejemplo 1 con diferentes concentraciones de sulfato de amonio y diferentes concentraciones de sulfato de dextrano, seguido por la carga remota de vinorelbina. Se evaluaron las eficiencias de encapsulación y el perfil de retención de vinorelbina liposómica, usando el procedimiento de liberación *in vitro* de plasma de 24 horas y se resumen en las tablas 6-8.

Resultados de Tabla 6: A 72 horas, 72.2 % de la vinorelbina encapsulada todavía permanecía en la composición NanoVNB (una composición farmacéutica que comprende solamente el donador de ion contrario polivalente octasulfato trietiloamina) y esta elevada tasa de retención a 72 horas puede conducir a toxicidad, de manera más notable toxicidad en la piel. Por otro lado, toda la vinorelbina encapsulada fue liberada en la composición LV005 (una composición farmacéutica que comprende solamente donador de ion contrario monovalente) a 72 horas, y esto está asociado con baja eficacia terapéutica. Mediante la combinación de donadores de ion contrario mono- y polivalentes, se obtuvo un intervalo de perfil de retención de vinorelbina liposómica. Se nota que el equivalente total de valencia por volumen del donador de ion contrario polivalente o su sal farmacéuticamente aceptable es de aproximadamente 1 a aproximadamente 240 mEq/L.

Tabla 6. características de composiciones farmacéuticas con 100 mM y 300 mM de donador de ion contrario monovalente y diferentes concentraciones de donador de ion contrario polivalente

Composición farmacéutica	Sulfato de dextrano		Valencia total por volumen mEq/L	Sulfato de amonio mM	% de vinorelbina encapsulada remanente	
	MW	mM			A 24h	A 72h
LV005	-	-		300	19.8	N.D.
LV305	8K	0.3	11.79	300	44.1	27.1
LV306		0.6	23.59		No probada	31.6
LV301		2	78.62		59.2	44.4
LV304		3	117.93		65.1	No probada
LV302		4	157.24		77.1	58.6
LV303		8	314.48		90.1	No probada
LV402		1.6K	0.25		1.97	47.4
LV403	0.5		3.93	53.5	20.7	
LV404	1		7.86	53.3	24.3	
LV401	1.5		11.79	39	20	
NanoVNB	1.2K	75 mM octasulfato trietilamina	600	-	82.2	72.2
LV307	8K	6	235.86	300	49.1	19.6
LV801	8K	4	157.2	100	55.8	15.3

Tabla 7: características de las composiciones farmacéuticas con diferentes concentraciones de donador de ion contrario monovalente y una concentración fija (0.3 mM) de donador de ion contrario polivalente

Composición farmacéutica	Tipos de donador de ion contrario y concentración (mM)		Tamaño de partícula	de	de
	Sulfato de amonio	Sulfato de dextrano de sodio	nm		%
LV801	50	0.3	102.3		44.4
LV802	100	0.3	101.2		72.4
LV803	200	0.3	106.9		102.8
LV305	300	0.3	122.1		102.6
LV804	400	0.3	106.1		87.9
LV805	500	0.3	111.2		70.4
LV806	600	0.3	106.5		48.3

Resultados de Tabla 7: La eficiencia de encapsulación de vinorelbina estuvo por encima de 70% usando 100 mM a 500 mM de sulfato de amonio.

5 Tabla 8: Características de las composiciones farmacéuticas con diferentes concentraciones de donador de ion contrario monovalente y una concentración fija (0.3 mM) de donador de ion contrario polivalente

Composición farmacéutica	Tipos de donador de ion contrario y concentración (mM)		Tamaño de partícula	de	de	% de vinorelbina encapsulada remanente después de incubación de plasma por 24h
	Sulfato de amonio	Sulfato de dextrano de sodio	nm		%	%
NanoVNB	-	-	97.2		100.9	80.3
LV803	200	0.3	106.9		102.8	32.0
LV305	300	0.3	122.1		102.6	44.1
LV804	400	0.3	106.1		87.9	37.4

10 Resultados de Tabla 8: más de 30% de vinorelbina liposómica es detenido después de 24 horas de incubación usando 200-400 mM de sulfato de amonio (donador de ion contrario monovalente).

Ejemplo 8: evaluación *in vivo* contra el cáncer usando células de cáncer HT-29 de colon humano

15 Se ejecutó una evaluación *in vivo* de la composición farmacéutica LV304 contra el cáncer, usando un modelo ortotópico HT-29 de tumor de colon humano, en ratones.

Los ratones tuvieron libre acceso a agua para beber y alimento durante todo el tiempo de este ensayo.

20 El diseño del estudio involucró 3 grupos de estudio, como sigue:

Grupo NanoNVB: a 6 ratones se administró 25mg/kg de vinorelbina as NanoVNB, vez al día mediante inyección intravenosa en los días 0, 3, 6 y 9.

25 Grupo LV304: a 6 se les administraron 25mg/kg de vinorelbina como composición farmacéutica LV304, una es el día mediante inyección intravenosa en los días 0, 3, 6 y 9.

Grupo de control: a 6 ratones se administró una vez al día por vía intravenosa, inyección salina en los días 0, 3, 6 y 9.

30 Durante el periodo del estudio, se midieron las siguientes salidas:

• Porcentaje de cambio en el crecimiento de tumor (% T/C). éste fue calculado mediante la siguiente fórmula:

35
$$\left(\frac{\text{Peso de tumor día X} - \text{peso de tumor día 0}}{\text{tratado}} \right) / \left(\frac{\text{peso de tumor día X} - \text{peso de tumor día 0}}{\text{control}} \right) \times 100 \%$$

- Cambio máximo de peso corporal, comparado con el peso corporal el día 0.
- Promedio de tiempo para duplicar el tumor (TDT). éste es ampliamente usado para la cuantificación de la tasa de crecimiento de tumor y es calculado mediante la siguiente fórmula:

$$(Día x - día 0)$$

- El día x fue el tiempo tomado para que el volumen de tumor se duplicará, comparado con el tamaño de presentación.
- Puntaje de toxicidad paren la piel, evaluado y calificado sobre la base de los parámetros listados en la tabla 9.

Tabla 9. puntaje de toxicidad en la piel

Grado	Signos & severidad	
	Pérdida de pelo & edema alrededor de los párpados	Pérdida de pelo alrededor de la ingle
0	Ninguna	Ninguna
1	Ligera	Ligera
2	Moderada	Moderada
3	Severa	Severa
4	Muy severa	Muy severa

Resultado:

La tabla 10 muestra que el porcentaje de cambio de crecimiento del tumor (% T/C) el día 8 fue similar entre los grupos NanoVNB y LV304 (-41.0% para NanoVNB y -42.4% LV304). El promedio de tiempo para duplicar el tumor (TDT promedio) fue > 78 días en el grupo NanoVNB, 67.1 días en el grupo LV304 y 7.6 días en el grupo de control. Adicionalmente, los ratones que recibieron LV304 desplegaron menos efectos laterales (menor pérdida de peso y puntaje de toxicidad en la piel) respecto a los ratones que recibieron NanoVNB.

La figura 2 muestra el promedio de volumen de tumor en el grupo NanoVNB, el grupo LV304 y el grupo de solución salina (control). Los resultados indican que el promedio de volumen de tumor en los grupos NanoVNB y LV 304 fue menor que 200 mm³ a través del periodo del estudio, mientras el promedio de volumen de tumor en el grupo de control excedió 3000 mm³ en el día 40.

Estos resultados indican que LV304 es un agente terapéutico efectivo contra el cáncer, respecto a NanoVNB, pero desplegó menos efectos laterales.

Tabla 10. Evaluación contra el cáncer de NanoVNB, LV304 y solución salina en modelo HT-29 de cáncer humano de colon

Grupo de tratamiento	% T/C (día)*	% cambio máximo de PC (día)*	Puntaje de toxicidad en la piel (día)*	TDT promedio
Solución salina	-	-10.3 (34)	-	7.0 ± 2.4
NanoVNB	-41.0 ± 15.4 (8)	-20.8 (13)	37 (17)	> 78
LV304	-42.4 ± 13.1 (8)	-4.7(13)	20(15)	67.1 ± 5.4

* no. de días después del día 0

Ejemplo 9: evaluación *in vivo* contra el cáncer usando modelo ortóptico de adenocarcinoma PC14PE6/AS2 humano de pulmón

Se ejecutó una evaluación *in vivo* de la composición farmacéutica LV304 contra el cáncer PC14PE6/AS2, usando un modelo ortóptico de tumor de pulmón, en ratones.

El diseño del estudio involucró 3 grupos de estudio, como sigue:

Grupo NanoVNB: a 6 ratones se administró 50% de la dosificación máxima tolerada (MTD) de NanoVNB (1/2 MTD=7.5mg/kg de vinorelbina) como una inyección intravenosa individual el día 0.

Grupo LV304: a 6 ratones se administró 50% de la MTD de la composición farmacéutica LV304 (1/2 MTD= 10mg/kg de vinorelbina) como una inyección intravenosa individual el día 0.

5 Grupo de control: a 6 ratones se dio una inyección intravenosa individual de solución salina, el día 0.

Durante el periodo del estudio, se midieron las siguientes salidas:

- 10 • Cambio máximo de peso corporal, comparado con el peso corporal el día 0.
- Promedio de tiempo de supervivencia.

Resultados: con referencia a la tabla 11, el promedio de tiempo de supervivencia para los ratones fue de 33.8 días después de una inyección individual de NanoVNB, 34.2 días después de una inyección individual de LV304 y 21.4 días después de una inyección individual de solución salina. La figura 3 muestra que el tiempo de supervivencia en el grupo NanoVNB y en el grupo LV304 fueron significativamente más largos que el del grupo de la solución salina (control) ($p < 0.01$).

Tabla 11. Evaluación contra el cáncer de los grupos de NanoVNB, LV304 y solución salina en un modelo ortóptico de adenocarcinoma PC14PE6/AS2 de pulmón humano.

Grupo de tratamiento	% de cambio máximo de PC (día)*	Promedio de tiempo de supervivencia ± DE (días)
Solución salina	-3.6 (18)	21.4 ± 2.0
NanoVNB	-12.6 (9)	33.8 ± 6.6
LV304	-17.0 (9)	34.2 ± 4.8

*Días después de la administración del fármaco el día 0

20 Ejemplo 10: evaluación *in vivo* de toxicidad en la piel usando el modelo de ratón SCID

Se ejecutó una evaluación *in vivo* de toxicidad en la piel de la composición farmacéutica LV304, usando ratones BALB/c. Los ratones tenían libre acceso a agua para beber y alimento, en todo momento durante este ensayo y fueron distribuidos de manera aleatoria en 3 grupos de estudio, como sigue:

Grupo NanoVNB: 6 ratones recibieron 7.5 mg/kg de vinorelbina como NanoVNB, a través de una inyección IV diaria los días 0 y 9, 5 mg/kg los días 3 y 6.

30 Grupo LV304: 6 ratones recibieron 7.5mg/kg de vinorelbina como LV304, a través de una inyección IV diaria los días 0 y 9, 5mg/kg el día 3 y 6.

Grupo de control: 6 ratones recibieron una vez al día una inyección de solución salina IV los días 0, 3, 6 y 9.

35 Durante el periodo del estudio se evaluó y se calificó la toxicidad en la piel, sobre la base del sistema de calificación de la tabla 9.

Resultados: La figura 4 muestra los puntajes de toxicidad en la piel en el grupo NanoVNB y el grupo LV304. La toxicidad del grupo LV304 en la piel fue significativamente menor, comparada con el grupo NanoVNB durante el periodo de 60 días del ensayo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica, que comprende
- 5 (a) por lo menos un liposoma que tiene un componente de formación de partículas seleccionado del grupo consistente en (i) fosfolípido y (ii) una mezcla de por lo menos un fosfolípido y colesterol;
- (b) sulfato de dextrano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad que varía de 0.1 mM a menos de 10 mM;
- 10 (c) sulfato de amonio en una cantidad que varía de 100 mM a 500 mM; y
- (d) un alcaloide de vinca.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que los grupos sulfato del sulfato de dextrano o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo están en una cantidad de 1 miliequivalente (mEq) a 320 mEq por litro.
- 15 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que los grupos sulfato del sulfato de dextrano o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo están en una cantidad de 1 mEq a 250 mEq por litro.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la sal farmacéuticamente aceptable del sulfato de dextrano es sulfato de dextrano de sodio o sulfato de dextrano de amonio.
- 20 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el sulfato de dextrano tiene un peso molecular de 1,600 dalton a 8,000 dalton.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la concentración del sulfato de amonio está en una cantidad que varía de 150 mM a 450 mM.
- 25 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la concentración del sulfato de dextrano está en una cantidad que varía de 0.1 mM a 8 mM.
- 30 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la concentración del sulfato de dextrano está en una cantidad que varía de 2 mM a 8 mM.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el liposoma comprende además un polímero hidrofílico.
- 35 10. Una composición para uso en la inhibición del crecimiento de células de cáncer, que comprende una cantidad efectiva de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

FIGURA 1



FIGURA 2

Eficacia contra el tumor, de VNB liposómico en modelo HT-29 de cáncer de colon humano

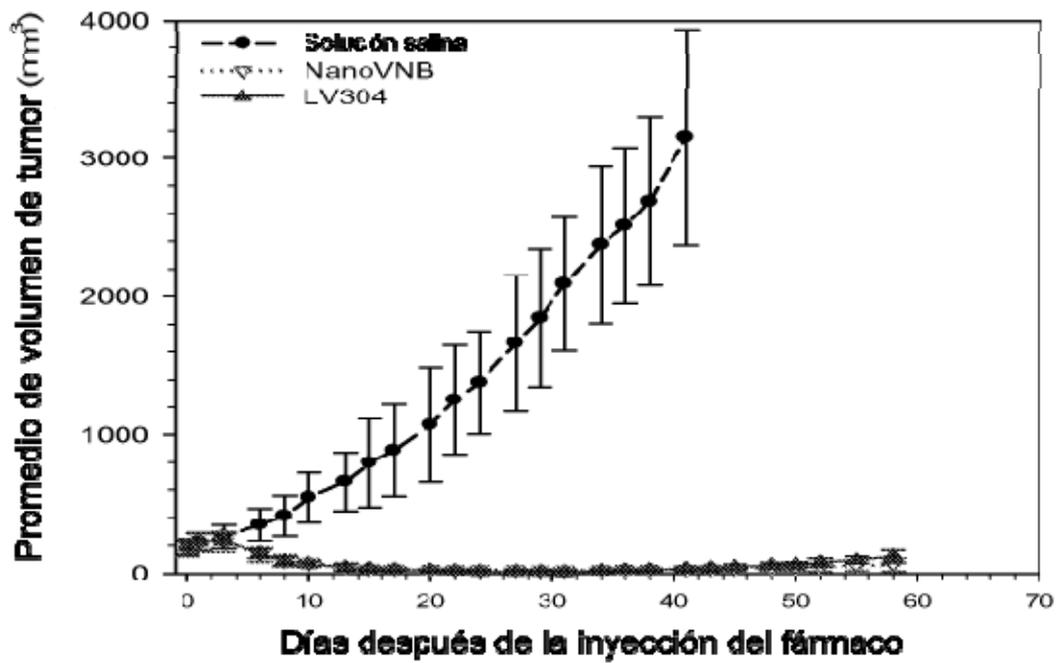


FIGURA 3

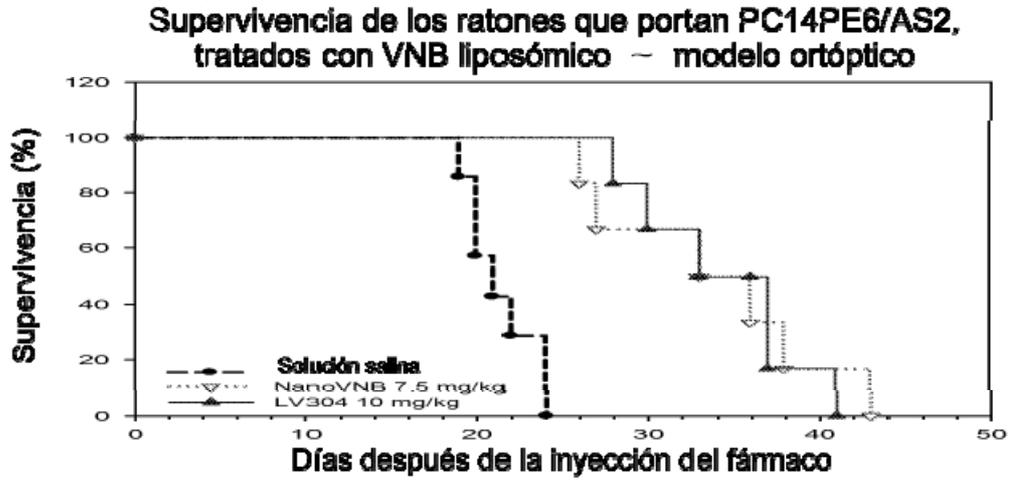


FIGURA 4

**Evaluación de toxicidad en la piel en ratones scid
tratados con VNB**

