(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 788 524**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2013** **E 13195503 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020** **EP 2737896**

(54) Título: **Micelas de umirolimus para el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

03.12.2012 US 201261732629 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.10.2020

(73) Titular/es:

MANLI INTERNATIONAL LTD. (100.0%)
39 Chuan Walk
558445 Singapore, SG

(72) Inventor/es:

YU, TING-BIN y
SU, SHIH-HORNG

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 788 524 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

Micelas de umirolimus para el tratamiento del cáncer

Antecedentes

Los tumores tienden a desarrollar resistencias a los fármacos quimioterapéuticos a lo largo del tiempo. Para superar dicha resistencia farmacológica, los médicos prescriben habitualmente diferentes fármacos quimioterapéuticos en las diferentes etapas del tratamiento. Por lo tanto, los pacientes con cáncer tendrán una mayor probabilidad de sobrevivir a su cáncer en particular a medida que aumentan los nuevos fármacos anti-cancerosos.

El sirolimus, también conocido como rapamicina, es un antibiótico macrólido lipofílico desarrollado inicialmente para el uso como un inmunosupresor para pacientes con trasplantes. Posteriormente se empleó en un recubrimiento de un fármaco para endoprótesis de arterias coronarias, donde funciona para reducir la reestenosis después de una angioplastia mediante la inhibición de la proliferación de células del músculo liso. El sirolimus tiene también actividad antitumoral. Véase, la Patente US 4.885.171. Rouf et al., J. Liposome Res. 19:2009-2012 describe la rapamicina encapsulada en un liposoma. Las solicitudes de Patente US 2006/251710, 2012/1276169, 2011/076308, así como Forrest et al., J. Controlled Release 2006 110:370-377, Chen et al., J Nanoparticle Research 2006 9:777-785 y Lu et al., J. Pharamaceutical Sciences 2011, 100:2418-2429) ofrecen todas rapamicina encapsulada en micelas poliméricas.

Se ha descubierto que los derivados de sirolimus son también eficaces para tratar determinados cánceres. Por ejemplo, everolimus, un derivado de sirolimus, es un fármaco aprobado para tratar tanto el cáncer renal avanzado como los tumores neuroendocrinos pancreáticos progresivos o metastásicos inoperables.

El umirolimus (40-alcoxialquil rapamicina o biolimus A9), un derivado muy lipofílico del sirolimus, es 10 veces más lipofílico en comparación con otros compuestos de la familia “limus”, tales como sirolimus y everolimus. Véase, J. Med. Chem. 2000, 43:2922-2928. Esta propiedad proporciona al umirolimus una mayor afinidad por las membranas celulares ricas en lípidos. Sin embargo, dicha elevada afinidad hace al umirolimus menos soluble en preparaciones farmacéuticas típicas. En consecuencia, se necesitan formulaciones especiales de umirolimus para administrarlo de manera eficaz en el lugar de un tumor.

Existe la necesidad de desarrollar nuevos agentes quimioterapéuticos que contengan formulaciones de umirolimus que sean solubles y estables en disolución acuosa, que tengan una circulación prolongada después de la administración, y que tengan la capacidad de dirigirse al tumor.

Compendio

El principal objetivo de la presente invención es proporcionar formulaciones con umirolimus para tratar el cáncer. Por tanto, el principal aspecto de esta invención se refiere a umirolimus encapsulado en un vehículo.

Se proporciona una formulación farmacéutica que incluye umirolimus encapsulado en una micela polimérica, junto con un excipiente, vehículo o diluyente aceptable farmacéuticamente.

Se describe también un método para tratar el cáncer mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de la formulación farmacéutica que incluye umirolimus encapsulado en una micela polimérica.

En los dibujos y en la descripción de a continuación se establecen los detalles de una o más realizaciones de la invención. A partir de la descripción y de las reivindicaciones serán evidentes otras características, objetivos y ventajas de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 es una gráfica de los valores de la concentración inhibidora del 50% (CI_{50}) para tres fármacos “limus” ensayados en varios ejemplos de líneas celulares cancerosas humanas.

Fig. 2A es una gráfica del porcentaje de umirolimus o umirolimus encapsulado que permanece frente al tiempo;

Fig. 2B es una gráfica del porcentaje de umirolimus liberado a partir de una micela polimérica frente al tiempo; y

Fig. 3 es una gráfica de barras que muestra la reducción del crecimiento del tumor en animales experimentales después de la inyección de umirolimus encapsulado.

Descripción detallada

El principal aspecto de la invención se refiere a formulaciones de umirolimus encapsuladas en vehículos para tratar el cáncer.

En la presente memoria se proporciona una formulación farmacéutica que incluye umirolimus encapsulado en una micela polimérica. El umirolimus está presente de un 5-40% en peso de la micela polimérica. El polímero es un co-polímero de bloque.

El co-polímero de bloque contiene un polímero hidrofílico conjugado a un polímero hidrofóbico, en donde el polímero hidrofílico es PEG y el polímero hidrofóbico es PLA, es decir, PEG-PLA.

El PEG puede tener una longitud de 10-3000 unidades monoméricas. El peso molecular del polímero hidrofóbico PLA puede ser de 1000-10000 Da.

Cualquiera de las formulaciones que contienen umirolimus mencionadas anteriormente se puede emplear para producir un medicamento para tratar el cáncer.

La presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de las formulaciones farmacéuticas descritas anteriormente que incluyen umirolimus encapsulado.

En una realización, una formulación farmacéutica que incluye umirolimus encapsulado en una micela polimérica se puede administrar a un paciente con cáncer mediante los métodos descritos anteriormente, que incluyen, pero no se limitan a, inyección intraperitoneal, inyección intravenosa, inyección directa en un tumor, inyección en la circulación arterial ascendente de un tumor, e inhalación nasal.

La administración de fármacos encapsulados en micelas muestran dirigirse de manera ventajosa al lugar de la enfermedad. Umirolimus administrado en forma encapsulada tenderá a acumularse en sitios de un tumor, una infección, o una inflamación, donde estos sitios tienen una estructura microvascular porosa más grande de lo normal.

Los tipos de cáncer que pueden tratarse mediante la administración de las formulaciones descritas anteriormente incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, cáncer suprarrenal, sarcoma de tejido blando en adultos, cáncer anal, anemia aplásica, cáncer de piel de células basales y escamosas, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, tumores cerebrales/del SNC, cáncer de mama, cáncer de mama en el hombre, cáncer en niños, cáncer de tumor primario desconocido, enfermedad de Castleman, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia mielomonocítica crónica, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de esófago, familia de tumores Ewing, cáncer ocular, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal, enfermedad trofoblástica gestacional, enfermedad de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe e hipofaringe, leucemia en niños, cáncer de hígado, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, tumor carcinoide pulmonar, mesotelioma, maligno melanoma, cáncer de piel, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de cavidad oral y orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pene, tumores pituitarios, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándulas salivales, linfoma de la piel, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, y tumor de Wilms.

Sin entrar en más detalles, se cree que un experto en la materia puede, basándose en la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Los ejemplos específicos de a continuación deben interpretarse como meramente ilustrativos, y no como limitativos del resto de la divulgación de ningún modo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Umirolimus inhibe el crecimiento de células cancerosas

Se añadió umirolimus a un cultivo de líneas celulares derivadas de 9 tipos de cánceres humanos. Después de 72 horas de cultivo *in vitro*, se midió la concentración inhibidora del 50% (CI_{50}) de umirolimus sobre el crecimiento celular empleando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo.

Tabla 1. Inhibición del crecimiento de células cancerosas por umirolimus

Línea celular/tipo de cáncer humano	CI_{50} (µM)	Inhibición máxima (%)
SNU-16/ gástrico	1,14	99,75
BxPC-3/ pancreático	3,07	77,24
AZ-521/ gástrico	4,23	99,88

RPMI-8226/ mieloma múltiple	6,8	99,26
NCI-H460/ pulmón	7,07	88,99
A2780/ ovario	7,31	100,19
SK-HEP-1/ hígado	7,81	99,97
K562/ leucemia mielógena crónica	7,97	98,49
SK-MES-1/ pulmón	8,24	96,57
SW620/ colorrectal	8,33	55,69
MDA-MB-231/ mama	9,52	99,23

Los resultados indican que 11 líneas celulares de 9 tipos de cánceres humanos son sensibles a umirolimus con una CI_{50} inferior a 10 µM.

Ejemplo 2: Inhibición del crecimiento de células cancerosas por umirolimus en comparación con sirolimus y everolimus.

Se midió la CI_{50} para 3 fármacos "limus" para inhibir el crecimiento de 10 líneas celulares de cáncer humano empleando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo como se describe en el Ejemplo 1. Las diez líneas celulares ejemplares de cáncer humano analizadas fueron SK-MES-1 (cáncer de pulmón), BxPC-3 (cáncer pancreático), AZ-521 (cáncer gástrico), SNU-16 (cáncer gástrico), SK-HEP-1 (cáncer hepático), A2780 (cáncer de ovario), MDA-MB-231 (cáncer de mama), DLD-1 (cáncer colorrectal), DU-145 (cáncer de próstata) y 786-O (cáncer renal). Los resultados se muestran en la FIG. 1.

La CI_{50} de umirolimus fue inesperadamente superior al de sirolimus y everolimus en 8 de las 10 líneas celulares de cáncer ensayadas. Más específicamente, el umirolimus era superior en la inhibición del crecimiento de las siguientes líneas celulares: A2780, SK-HEP-1, DLD-1, SNU-16, BxPC-3, 786-O, SK-MES-1, y AZ-521.

Ejemplo de Referencia 3: Liposoma que contiene umirolimus

Umirolimus (umirolimus de 0,1-2 mM/lípido total 100 mM), diestearoil fosfatidil etanolamina PEGilada (mPEG-DSPE; longitud de la cadena de monómero de polietilenglicol de 2.000), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), y colesterol (proporción DSPE/HSPC/colesterol: 55-65/2-10/20-40) se disuelven en etanol (10-30% del volumen total del liposoma). La mezcla se inyecta después en 10 mL de agua destilada con agitación constante. La disolución del liposoma así formada se extruye 10 veces a través de un filtro de policarbonato de 0,5 µm y después 10 veces a través de un filtro de policarbonato de 0,22 µm para reducir el tamaño de partícula a 100-200 nm.

Ejemplo de Referencia 4: Liposoma que contiene Umirolimus sin colesterol

Umirolimus, mPEG-DSPE (longitud de la cadena de monómero de polietilenglicol de 2.000), y HSPC, (proporción umirolimus/DSPE/HSPC: 10-30/60-80/10-20) se disuelven en etanol (10-30% del volumen total del liposoma). La mezcla se inyecta después en 10 mL de agua destilada con agitación constante. La disolución del liposoma así formada se extruye 10 veces a través de un filtro de policarbonato de 0,5 µm y después 10 veces a través de un filtro de policarbonato de 0,22 µm para reducir el tamaño de partícula a 100-200 nm.

Ejemplo de Referencia 5: Micela de co-polímero de bloque de tres brazos que contiene umirolimus

Primero se hace reaccionar metil PEG-OH con 4-(clorometil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano para formar un derivado cetal. Después de la eliminación del grupo cetal en una disolución ácida, el diol resultante se emplea para la polimerización de lactida para obtener un co-polímero de bloque de tres brazos $PEG(PLA)_2$.

Se disuelven cincuenta miligramos del co-polímero de bloque de tres brazos $PEG(PLA)_2$ y 5-20 mg de umirolimus en 2,0 mL de acetonitrilo. El acetonitrilo se elimina después utilizando un evaporador rotativo. La película de polímero resultante se hidrata con 2,0 mL de agua para formar micelas. La disolución de las micelas de $PEG(PLA)_2$ que contienen umirolimus se filtra a través de un filtro de 0,22 µm para esterilizar antes de su uso.

Ejemplo de Referencia 6: Micela de co-polímero de bloque de tres brazos a base de péptido que contiene umirolimus

Primero, se sintetiza un péptido hidrofóbico de 5-40 aminoácidos de longitud mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) utilizando un sintetizador de péptidos automatizado en resina de amida de Rink metilbenzhidrilamina (MBHA) usando aminoácidos protegidos con Fmoc/t-butilo estándar y acoplamiento basado en éster activo

hexafluorofosfato de O-7 azabenzotriazol tetrametiluronio (HATU). Los péptidos sintetizados pueden ser poli-Tyr, poli-Leu, poli-Phe, poli-Ala, poli-Ile, poli-Val, o poli-Phe.

En segundo lugar, se sintetiza también un péptido hidrofílico de 20-50 aminoácidos de longitud que termina en un resto de lisina también mediante síntesis de péptidos en fase sólida como se describe anteriormente. Los péptidos sintetizados pueden ser poli-Asp, poli-Gln, poli-Asn, o poli-Glu. Los dos grupos amina activos en la lisina terminal se usan cada uno para conjugar el polipéptido hidrofóbico descrito anteriormente utilizando HATU como reactivo de acoplamiento. Los grupos protectores en las cadenas laterales del péptido se eliminan mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) al 95% y el co-polímero de bloque de tres brazos basado en péptido se obtiene mediante precipitación con metanol.

Se disuelven 50 mg del co-polímero de bloque de tres brazos basado en péptidos y 5-20 mg de umirolimus en 2,0 mL de acetonitrilo. El acetonitrilo se elimina después utilizando un evaporador rotativo. La película resultante se hidrata con 2,0 mL de agua para formar micelas. La disolución de las micelas que contiene umirolimus se filtra a través de un filtro de 0,22 µm para esterilizar antes de su uso.

Ejemplo de Referencia 7: Micela de co-polímero de bloque de tres brazos basado en un péptido/polímero que contiene umirolimus

Se sintetiza un péptido hidrofílico de 20-50 aminoácidos de longitud que termina en un resto de lisina mediante síntesis de péptidos en fase sólida como se describe anteriormente en el Ejemplo 5. Los péptidos sintetizados pueden ser poli-Asp, poli-Gln, poli-Asn, o poli- Glu. Los dos grupos amina activos en la lisina terminal se usan cada uno para la síntesis de polilactida (PLA) como se describe anteriormente en el Ejemplo 4. En lugar de la polilactida también se puede sintetizar policaprolactona (PCL).

Los grupos protectores en las cadenas laterales del péptido se eliminan mediante tratamiento con TFA al 95% y el co-polímero de bloque de tres brazos péptido-$(PLA)_2$ o péptido-$(PCL)_2$ se obtiene mediante precipitación con metanol.

Se disuelven 50 mg de co-polímero de bloque de tres brazos péptido/polímero y 5-20 mg de umirolimus en 2,0 mL de acetonitrilo. El acetonitrilo se elimina después utilizando un evaporador rotativo. La película resultante se hidrata con 2,0 mL de agua para formar micelas. La disolución de micelas de péptido/polímero que contiene umirolimus se filtra a través de un filtro de 0,22 µm para esterilizar antes de su uso.

Ejemplo de Referencia 8: Micela de co-polímero de bloque basado en polímero/péptido que contiene umirolimus

Se sintetizan mediante SPPS péptidos de 5-40 restos de longitud que contienen aminoácidos hidrofóbicos utilizando un sintetizador de péptidos automatizado en resina de amida de Rink MBHA usando aminoácidos protegidos con Fmoc/t-butilo estándar y acoplamiento basado en éster activo HATU. El péptido hidrofóbico puede ser poliAla, polille, poliVal o poliTrp. Se pueden emplear tanto aminoácidos *levo* como *racémicos*.

Para formar un co-polímero de bloque péptido/polímero, el péptido hidrofóbico se une al ácido α-metil-ω-propriónico-poli(óxido de etileno) ($PEO-OCH_2CH_2-COOH$) mediante condensación en fase de disolución. El peso molecular del PEO está en el intervalo de 2.000-100.000 Dal.

Se disuelven 50 mg de co-polímero de bloque péptido/polímero y 5-20 mg de umirolimus en 2,0 mL de acetonitrilo. El acetonitrilo se elimina después utilizando un evaporador rotativo. La película resultante se hidrata con 2,0 mL de agua para formar micelas. La disolución de micelas de péptido/polímero que contiene umirolimus se filtra a través de un filtro de 0,22 µm para esterilizar antes de su uso.

Ejemplo de Referencia 9: Micela de péptido que contiene umirolimus que incluye dominios de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos

Se compra o sintetiza un péptido hidrofóbico mediante polimerización de N-carboxianhidruro (NCA) para servir como un macroiniciador. Después se ensambla un péptido hidrofílico añadiendodo el macroiniciador en una disolución de diclorometano que contiene los conjugados de aminoácidos-NCA deseados. La reacción se lleva a cabo a 40ºC durante 24 h bajo una atmósfera de Ar. La mezcla de reacción se vierte en metanol enfriado, causando la precipitación de un producto sólido blanco. El producto se caracteriza por RMN y cromatografía de permeación en gel. La eliminación de los grupos protectores de la cadena lateral de aminoácidos se lleva a cabo mediante el tratamiento del producto con 95% de TFA en agua. La mezcla de reacción de desprotección se vierte en éter dietílico enfriado para precipitar un polímero sólido blanco. El polímero de bloque de péptido hidrofílico-hidrofóbico resultante se seca al vacío y se caracteriza por RMN.

Se disuelven 50 mg de co-polímero de bloque de péptido hidrofílico-hidrofóbico y 5-20 mg de umirolimus en 2,0 mL de acetonitrilo. El acetonitrilo se elimina después utilizando un evaporador rotativo. La película de polímero peptídico resultante se hidrata con 2,0 mL de agua para formar micelas. La disolución de micela de péptido que contiene umirolimus se filtra a través de un filtro de 0,22 µm para esterilizar antes de su uso.

Ejemplo de Referencia 10: Conjugado de profármaco de micela de polímero de umirolimus

El copolímero mPEG-PLA-COOH se sintetiza mediante polimerización de apertura de anillo. En resumen, la lactida y el 2% en moles de ácido α-metil-ω-propriónico-PEO (PEO-OCH_2CH_2-COOH) se disuelven a 160ºC bajo nitrógeno. Se añadió 2-etilhexanoato estannoso al 0,2% y la reacción se llevó a cabo a vacío a una temperatura de 140ºC durante 90 minutos. El co-polímero así formado se disuelve en diclorometano y se precipita en éter frío.

El co-polímero mPEG-PLA (1000 g) y umirolimus (50 mg) se disuelven en DCM anhidro. Luego se agregan 20 mg de 4-dimetil aminopiridina, 70 mg de bromotripirrolidino-hexafluorofosfato de fosfonio, y 50 µL de diisopropil etilamina (DIPEA). La reacción se agita durante 24 h a temperatura ambiente seguido de la eliminación completa del disolvente por evaporación rotatoria. El conjugado resultante de co-polímero/fármaco se lava con un exceso de etanol para eliminar el umirolimus y los catalizadores sin reaccionar. La estructura del profármaco y el grado de conjugación se determinan disolviendo el polímero conjugado en dimetilsulfóxido deuterado y analizándolo por ^1H y ^{13}C NMR.

Ejemplo de Referencia 11: Umirolimus conjugado a un polipéptido hidrofílico

Una mezcla de 100 mg de ácido poli-glutámico (PM> 50.000), 50 mg de umirolimus, y 20 µL de DIPEA en 3,5 mL de dimetilformamida seca se enfrió a 0ºC. Se agregaron 30 mg de diciclohexilcarbodiimida y la reacción se incubó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se vertió en cloroformo para detener la reacción y precipitar el conjugado de umirolimus/péptido. El precipitado resultante se lavó adicionalmente con cloroformo varias veces para obtener un polvo blanco.

Ejemplo 12 de la invención: Umirolimus encapsulado en un co-polímero de bloque PEG-PLA

Se disolvió una mezcla de 23,42 mg de co-polímero de bloque PEG-PLA junto con 2,23 mg de umirolimus en 0,5 mL de diclorometano. El diclorometano se evaporó en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente. La película de polímero así formada se rehidrató en 2,2 mL de HPLC grado H_2O. La disolución resultante se filtró a través de una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) que tiene un tamaño de poro de 0,22 µm.

Ejemplo de Referencia 13: Umirolimus encapsulado en un co-polímero de bloque PEG-PCL

Se disolvió una mezcla de 33,24 mg de co-polímero de bloque PEG-PCL junto con 3,17 mg de umirolimus en 0,5 mL de diclorometano. El diclorometano se evaporó en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente. La película de polímero así formada se rehidrató en 4,0 mL de HPLC grado H_2O. La disolución resultante se filtró a través de una membrana de PTFE que tiene un tamaño de poro de 0,22 µm.

Ejemplo 14: Propiedades físicas de la solubilidad de Umirolimus encapsulada en polímero de co-polímero de bloque

Se determinó la solubilidad de umirolimus en H_2O y se comparó con la solubilidad en H_2O de umirolimus encapsulado en PEG-PLA y PEG-PCL descritos, respectivamente, en el Ejemplo 12 y el Ejemplo 13 anteriores. Se usó HPLC para medir la concentración de umirolimus después de disolver el fármaco o el fármaco encapsulado. Los resultados se muestran en la Tabla 2 de a continuación. El umirolimus puro tenía una solubilidad de 0,11 µg/mL en agua. La solubilidad de umirolimus fue menor que la de sirolimus (2,6 µg/mL) reportada en la bibliografía. Umirolimus encapsulado en PEG-PCL y PEG-PLA tenía una solubilidad de 55,6 g/mL y 739,1 g/mL, respectivamente.

Tabla 2. Solubilidad en agua de preparaciones de umirolimus

	Solubilidad (µg/mL)	Nº de veces aumentado
umirolimus	0,11	1
umirolimus + PEG-PCL	55,6	505
umirolimus + PEG-PLA	739,1	6719

Estabilidad

La estabilidad de umirolimus se comparó con la de umirolimus encapsulado en una micela de co-polímero de bloque PEG-PLA como se describe en el Ejemplo 12 anterior. Las disoluciones de umirolimus (50 µg/mL) y umirolimus encapsulado (157,4 µg/mL) en PBS al 90%, MeOH al 10% se colocaron en un baño de agua a 37ºC. Se determinó la estabilidad del umirolimus midiendo el contenido del fármaco a diferentes tiempos de incubación. Los resultados se muestran en la FIG. 2A. El umirolimus encapsulado en una micela de copolímero de bloque PEG-PLA fue significativamente más estable que el fármaco no encapsulado.

La vida media de umirolimus se calculó en base a la siguiente ecuación:

vida media = (t * ln(2))/(LN(C_t/C_{t0})),

donde t es el punto de tiempo final, C_t es la concentración en el punto de tiempo final, y C_{t0} es la concentración inicial. Los resultados indican que la vida media de umirolimus era de 21 h, mientras que la vida media de umirolimus encapsulada en la micela de copolímero de bloque PEG-PLA era de 148 h, lo que representa un aumento de 7 veces.

Perfil de liberación

Se determinó el perfil de liberación de fármaco acumulado de umirolimus encapsulado en micelas de copolímero de bloque PEG-PLA. Las micelas de polímero (380 µg) se suspendieron en 5 mL de una disolución de PBS al 90%/metanol al 10%. La suspensión se incubó en un baño de agua a 37ºC. En cada punto de tiempo, se transfirieron 0,2 mL de la suspensión a un tubo de microcentrífuga. Las micelas de polímero en el tubo se recogieron por centrifugación a 15.000 × g durante 15 minutos a 5ºC. Después de eliminar el sobrenadante, el sedimento resultante se re-suspendió por sonicación en 0,2 mL de metanol fresco. La disolución resultante se analizó por HPLC para determinar la cantidad de umirolimus que permanece en las micelas de polímero. Los resultados se muestran en la FIG. 2B. Aproximadamente el 80% del umirolimus se libera dentro de los 8 días de incubación.

Ejemplo 15: Estudio de eficacia inhibidora *in vivo*

Se empleó el modelo de xenoinjerto de cáncer gástrico humano SNU-16 en ratones sin pelo BALB/c para evaluar la eficacia inhibidora del umirolimus encapsulado.

Las células tumorales SNU-16 se cultivaron en suspensión en medio RPMI-1640 enriquecido con suero bovino fetal inactivado con calor al 10% a 37ºC en CO_2 al 5%. Las células se subcultivan rutinariamente dos veces por semana. Las células en la fase de crecimiento exponencial se recolectaron y contaron antes de inocularlas en ratones Nu/nu para establecer un tumor.

Cada ratón se inoculó por vía subcutánea en la parte superior derecha de la espalda con 1×10^7 células SNU-16 en 0,1 mL de PBS junto con matrigel (1:1) para apoyar el desarrollo del tumor. Los tratamientos con fármacos o vehículos se iniciaron cuando el tamaño medio del tumor alcanza aproximadamente 150 mm^3 el día 8 después de la inyección. Cada animal se inyectó por vía intraperitoneal durante 5 días consecutivos a partir del día 8. La formulación administrada y el número de animales en cada grupo de estudio se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Diseño del estudio y preparación de la formulación de ensayo

Compuestos	N	Preparación	Dosis (mg/kg)	Vía de dosificación	Programa
Vehículo (Grupo 1)	10	Añadir 2,0 mL de etanol estéril al 8% y 2,0 mL de polisorbato 80 estéril al 10% a un vial de vidrio de 5 mL, agitar para formar una disolución clara.	0	i.p.	QD x 5
Umirolimus encapsulado en PEG-PLA (Grupo 2)	10	Medir 70 mg del compuesto de ensayo (equivalente a 4,5 mg de fármaco después de la filtración) en un vial de vidrio de 10 mL, añadir 6 mL de agua de inyección y agitar/sonicar hasta que el compuesto de ensayo esté completamente suspendido en disolución y no se observe precipitado. La disolución resultante se filtra después a través de un filtro de 0,45 micras (23 mm o 40 mm, PDVF o PTFE) para producir una nano-suspensión 0,75 de mg/mL	15	i.p.	QD x 5

Después de la inoculación de las células tumorales, los animales se controlaron diariamente por su morbilidad y mortalidad. En el momento de la monitorización de rutina, se verificó a los animales por cualquiera de los efectos de la carga tumoral y los tratamientos sobre el comportamiento normal, por ejemplo, movilidad, estimación visual del

consumo de alimentos y agua, aumento/pérdida de peso corporal, opacidad en los ojos y cualquier otro efecto anormal. La muerte y los signos clínicos observados se registraron para cada animal.

Los volúmenes tumorales se midieron dos veces por semana en dos dimensiones usando un calibrador, y el volumen se calculó usando la fórmula: $V = 0{,}5\ a \times b^2$, donde a y b son los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente.

Los resultados se muestran en la FIG. 3. El umirolimus encapsulado en una micela de copolímero de bloque PEG-PLA era eficaz para retrasar el crecimiento de tumores experimentales.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende umirolimus encapsulado en una micela polimérica, y un excipiente, vehículo, o diluyente, aceptable farmacéuticamente, en donde la micela polimérica incluye un co-polímero de bloque de dos brazos, siendo el co-polímero de bloque polietilenglicol-polilactida (PEG-PLA), y el umirolimus está presente en el 5-40% en peso de la micela polimérica.

2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, para usar en tratar el cáncer.

3. La formulación farmacéutica para el uso según la reivindicación 2, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer pancreático, mieloma, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer hepático, leucemia mielógena crónica, cáncer colorrectal, y cáncer de mama.

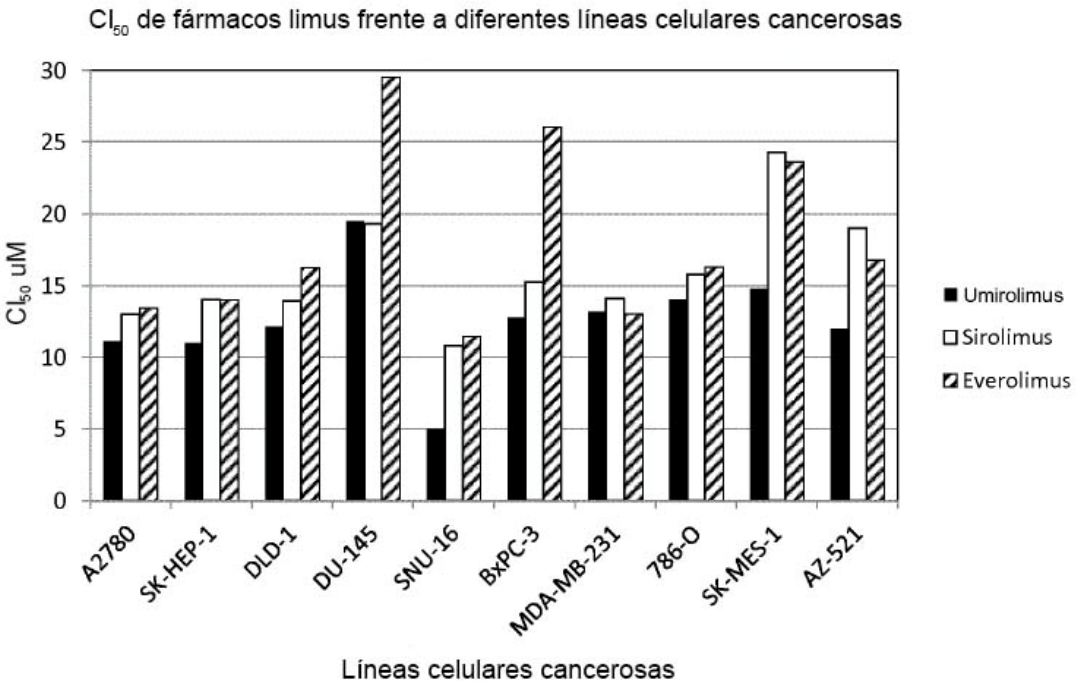
CI50 de fármacos limus frente a diferentes líneas celulares cancerosas
CI50 uM
30
25
20
15
10
5
0
A2780
SK-HEP-1
DLD-1
DU-145
SNU-16
BxPC-3
MDA-MB-231
786-O
SK-MES-1
AZ-521
Líneas celulares cancerosas
Umirolimus
Sirolimus
Everolimus

FIG. 1

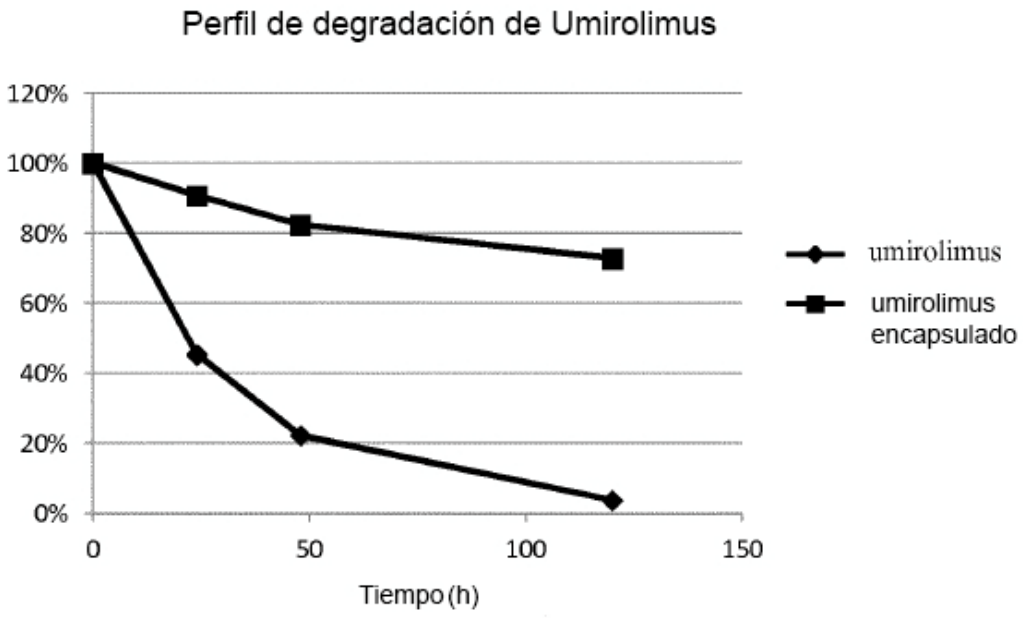
Perfil de degradación de Umirolimus
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
50
100
150
Tiempo (h)
umirolimus
umirolimus encapsulado

FIG. 2A

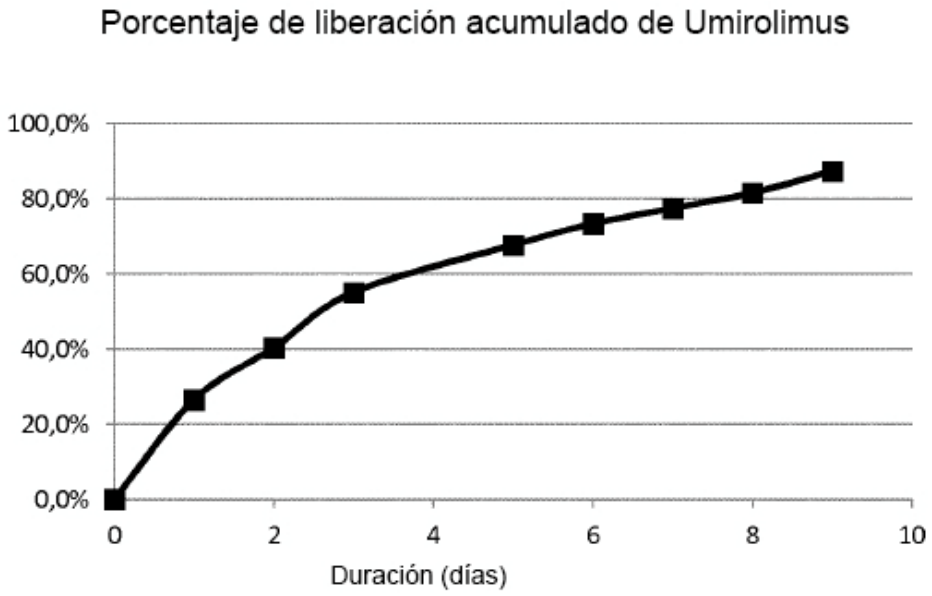
Porcentaje de liberación acumulado de Umirolimus
100,0%
80,0%
60,0%
40,0%
20,0%
0,0%
0
2
4
6
8
10
Duración (días)

FIG. 2B

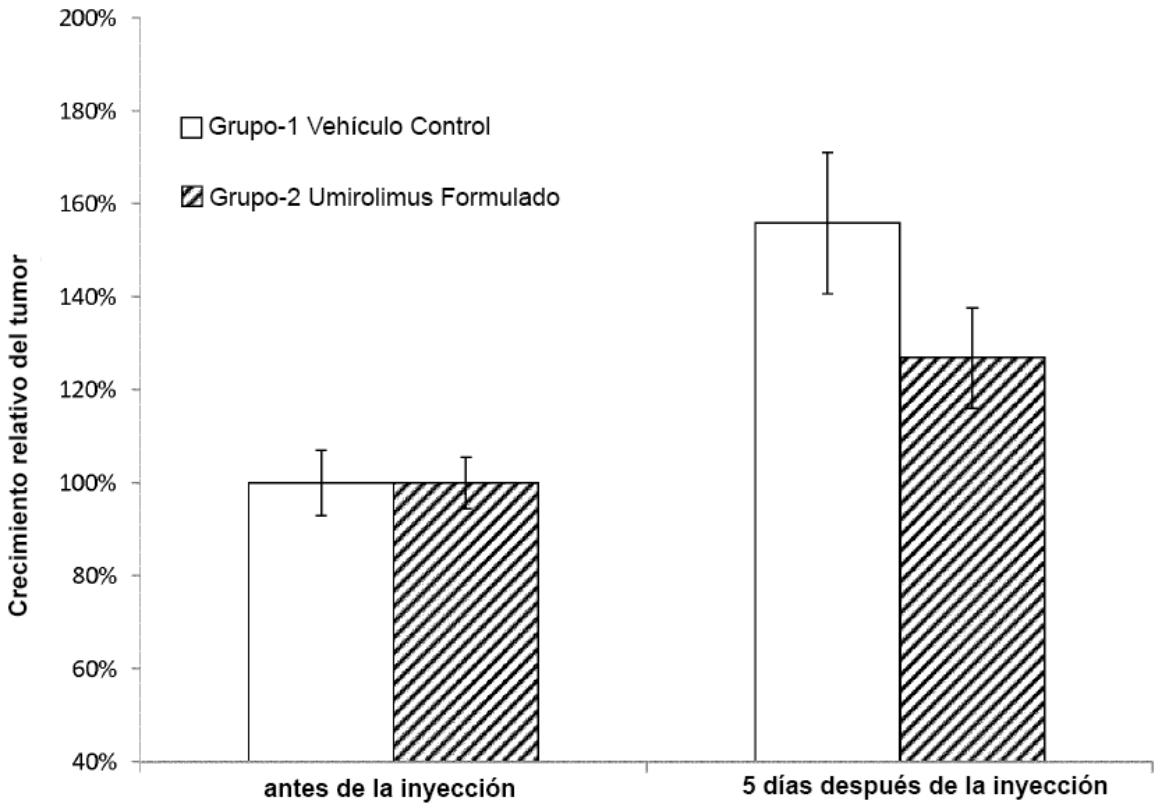
200%
180%
160%
140%
120%
100%
80%
60%
40%
Crecimiento relativo del tumor
Grupo-1 Vehículo Control
Grupo-2 Umirolimus Formulado
antes de la inyección
5 días después de la inyección

FIG. 3