

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INTEL

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-130828- -00000-0000

Fecha: 2011-10-04 17:14:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Follos: 76

SOLICITUD  
**PATENTE DE INVENCION**

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** \_\_\_\_\_

COMPOSICIÓN DE LIPOSOMA

54. **TITULO** \_\_\_\_\_

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** \_\_\_\_\_

EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.

71. **SOLICITANTE** \_\_\_\_\_

**DOMICILIO** \_\_\_\_\_ TOKIO, JAPON

74. **APODERADO** \_\_\_\_\_ JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **BOGOTÁ, D.C.** \_\_\_\_\_

AS: 118.258

## PETITORIO

**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-130828-00000-0000

Fecha: 2011-10-04 17:14:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Follos: 76**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE**  
**PCT**  
**ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1

## SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

**SOLICITANTE**  
**(71)**Nombre: **EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.**

Dirección: 6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku, Tokio 112-8088, Japón

Nacionalidad o Domicilio: Japón  
Lugar de Constitución: Japón

Teléfono:

Fax:

E-mail

## IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE**  
**O APODERADO**  
**(74)**

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Calle 70 A #4-41, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

## IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número 80.410.337 TP 57492

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de radicación (del poder).

4

**INVENTOR (ES)**  
**(72)**

Nombre: KIKUCHI, Hiroshi; HYODO, Kenji; ISHIHARA, Hiroshi

Dirección: c/o Tsukuba Research Laboratories, EISAI CO., LTD., 1-3, Tokodai 5-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-2635, Japón; respectivamente.

Nacionalidad o Domicilio: Japón (respectivamente).

## 5 PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/JP2010/055770

Fecha

30.03.2010

Publicación Internacional No

WO 2010/113984 A1

Fecha

07.10.2010

6 Título (54): COMPOSICIÓN DE LIPOSOMA

## 7 Clasificación Internacional (51):

## 8 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

JP

30.03.2009

2009-082521

US

30.03.2009

61/164,653

## 9 Comprobante de pago No. 11-86118 11-86243 11-86234 11-86225

11-86224

Fecha 30-09-2011

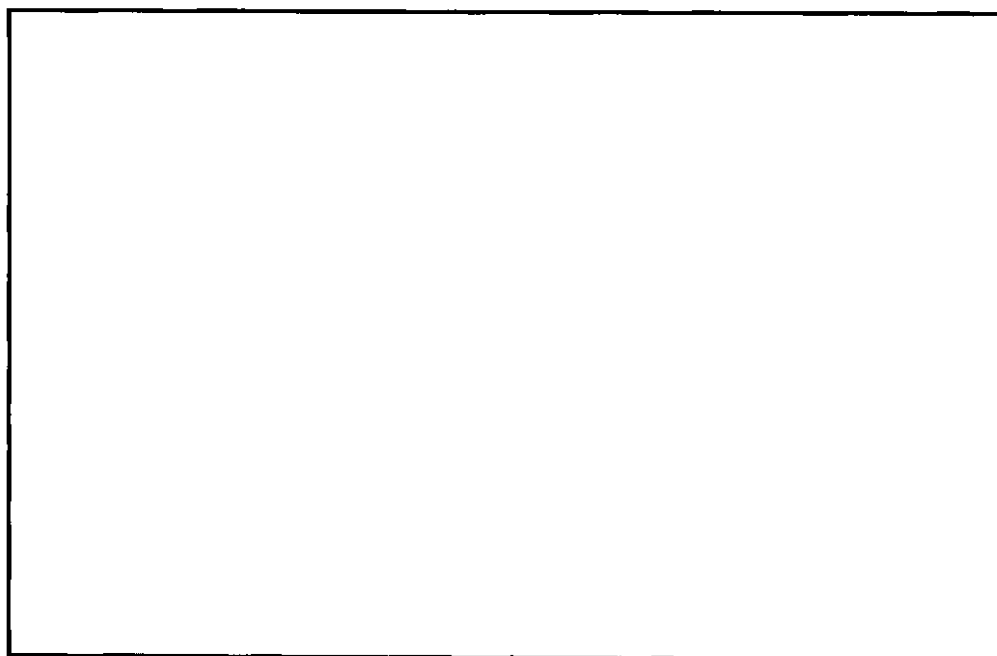
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

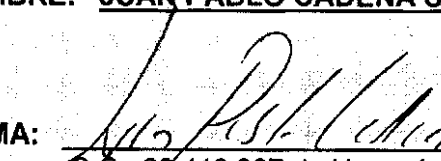
## ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 571.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no esté inscrita en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Fotocopia autenticada.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al español (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional bajo el Art. 34.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales \$ 783.000 (29\*\$27.000).

## 11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTOFIRMA: 

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

AS. 118.258 2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
- / -

|                                          |                |                                               |
|------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------|
| Industria y Comercio<br>SUPERINTENDENCIA | RECIBO DE CAJA | No. 11 - 0086118                              |
|                                          |                | Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2011 - 08:04:49 |

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

|                          |                 |           |           |            |               |
|--------------------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| *** Soporte del Pago *** |                 |           |           |            |               |
| TIPO PAGO                | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
| CONSIGNACION             | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 391971650 | 01/09/2011 | 63.528.100.00 |

|                           |                                            |               |              |
|---------------------------|--------------------------------------------|---------------|--------------|
| *** Conceptos Pagados *** |                                            |               |              |
| CANT. RENTISTICO          | CONCEPTO                                   | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
| 1 50005-01-01 SOLICITUDES | 7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES | 571.000.00    | 571.000.00   |
|                           |                                            |               | \$571.000.00 |
| =====                     |                                            |               |              |

SON: \*\*QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_  
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
  
No. 11-130828- -00000-0000  
Fecha: 2011-10-04 17:14:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 76

AS. 118.278

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0086243

Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2011 - 08:04:49

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR PAGO       |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 391971650 | 01/09/2011 | 63.528.100.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT.         | RENTISTICO                              | CONCEPTO                           | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|---------------|-----------------------------------------|------------------------------------|---------------|--------------|
| 1 50005-01-09 | OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 540.000.00    | 540.000.00   |
|               |                                         |                                    |               | \$540.000.00 |

SON: \*\*QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-130828- -00000-0000

Fecha: 2011-10-04 17:14:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 76

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 5 de 2011 - 08:05:12

AS. 118.258

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
- / -

|                                          |                |                                               |
|------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------|
| Industria y Comercio<br>SUPERINTENDENCIA | RECIBO DE CAJA | No. 11 - 0086234                              |
|                                          |                | Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2011 - 08:04:49 |

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

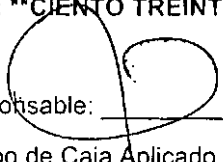
\*\*\* Soporté del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 391971650 | 01/09/2011 | 63.528.100.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                                | Vr. UNIDITARIO | Vr. CONCEPTO                    |
|-------|-------------|-----------------------------------------|----------------|---------------------------------|
| 1     | 50005-01-09 | OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99             | OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS |
|       |             |                                         | 135.000.00     | 135.000.00                      |
|       |             |                                         |                | \$135.000.00                    |

SON: \*\*CIENTO TREINTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
  
No. 11-130828-00000-0000  
Fecha: 2011-10-04 17:14:32 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 76

AS. 118.258

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
- / -

Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0086225

Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2011 - 08:04:49

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

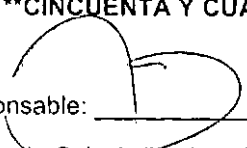
\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 391971650 | 01/09/2011 | 63.528.100.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr. UNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|---------------|--------------|
| 1     | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 54.000.00     | 54.000.00    |
|       |                                                     |                                    |               | \$54.000.00  |

SON: \*\*CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
  
No. 11-130828-00000-0000  
Fecha: 2011-10-04 17:14:32 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL I  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 76

AS. 118.258 7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
-/-

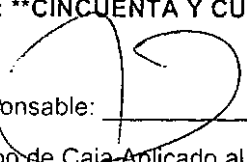
|                                          |                |                                               |
|------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------|
| Industria y Comercio<br>SUPERINTENDENCIA | RECIBO DE CAJA | No. 11 - 0086224                              |
|                                          |                | Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2011 - 08:04:49 |

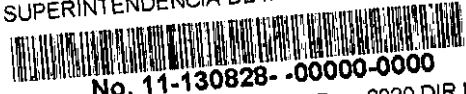
RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

|                          |                 |           |           |            |               |
|--------------------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| *** Soporte del Pago *** |                 |           |           |            |               |
| TIPO PAGO                | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO      |
| CONSIGNACION             | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 391971650 | 01/09/2011 | 63.528.100.00 |

|                           |                                                     |                                    |                             |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| *** Conceptos Pagados *** |                                                     |                                    |                             |
| CANT.                     | RENTISTICO                                          | CONCEPTO                           | Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO |
| 1                         | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL | 99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS | 54.000.00 54.000.00         |
|                           |                                                     |                                    | \$54.000.00                 |
| =====                     |                                                     |                                    |                             |

SON: \*\*CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable:   
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
  
No. 11-130828- -00000-0000  
Fecha: 2011-10-04 17:14:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 76

## (12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2010年10月7日(07.10.2010)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2010/113984 A1

## (51) 国際特許分類:

A61K 31/357 (2006.01) A61K 47/24 (2006.01)  
A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/28 (2006.01)  
A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/34 (2006.01)  
A61K 47/18 (2006.01) A61K 47/36 (2006.01)

台5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波  
研究所内 Ibaraki (JP). 石原 比呂之 (ISHIHARA,  
Hiroshi) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光台  
5丁目1番地3 エーザイ株式会社 筑波研  
究所内 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/055770

(22) 国際出願日: 2010年3月30日(30.03.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

## (30) 優先権データ:

特願 2009-082521 2009年3月30日(30.03.2009) JP  
61/164,653 2009年3月30日(30.03.2009) US

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について):  
エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジ  
メント株式会社 (Elsai R&D Management Co., Ltd.)  
[JP/JP]; 〒1128088 東京都文京区小石川四丁目6  
番10号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

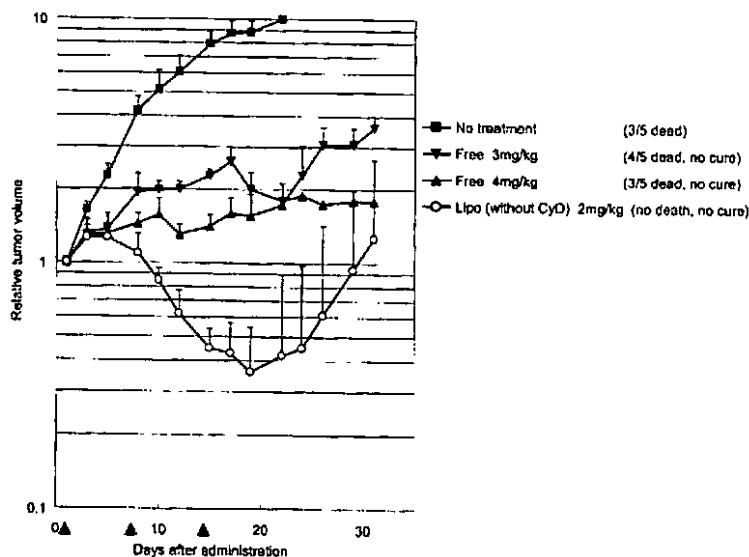
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 菊池 寛  
(KIKUCHI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つく  
ば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会  
社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 兵頭 健治 (HYO-  
DO, Kenji) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (INABA, Yoshiyuki et al.);  
〒1066123 東京都港区六本木6-10-1 六  
本木ヒルズ森タワー23階 TMI 総合法律  
事務所 Tokyo (JP).(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保  
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,  
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,  
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH,  
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,  
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保  
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,  
MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

[続葉有]

(54) Title: LIPOSOME COMPOSITION

(54) 発明の名称: リポソーム組成物

[図2]



(57) Abstract: Disclosed is a novel liposome composition which contains eribulin or a pharmacologically acceptable salt thereof. Also disclosed is a method for producing the liposome composition.

(57) 要約: 本発明は、エリブリンまたはその薬理学的に許容される塩を含む新規なりポソーム組成物およびその製造方法を提供する。

WO 2010/113984 A1

GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類: 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## COMPOSICIÓN DE LIPOSOMA

### Campo Técnico

La presente invención se relaciona a una composición de liposoma novedosa que contiene eribulina o su sal farmacológicamente permisible. La presente invención también se relaciona a un método de manufactura de la composición de liposoma.

### Técnica Antecedente

Los liposomas son vesículas cerradas microscópicas que tienen una fase interna encerrada por una o más bicapas de lípido, y son capaces de contener material soluble en agua en la fase interna, y material lipofílico en la bicapa de lípido. Cuando se atrapa un compuesto activo en el liposoma, y se suministra al tejido objetivo, como atrapar el compuesto activo en el liposoma con alta eficiencia y como asegurar la retención estable del compuesto activo por el liposoma constituyen puntos importantes.

Cuando se atrapan compuestos lipofílicos en el liposoma, una alta relación de atrapamiento puede ser lograda de manera relativa fácilmente, pero excepto en casos de compuestos que tienen muy alta afinidad de membrana tal como anfotericina B (el agente principal en el fármaco liposomal AmBisome), la estabilidad de retención en el suero sanguíneo es ordinariamente baja, y es difícil obtener mejora suficiente en la farmacocinética. Con respecto a métodos para atrapar compuestos solubles en agua en el liposoma, hay varios métodos tal como el método de película de lípido (método de Vórtice), método de evaporación de fase inversa, método de remoción de surfactante, método de congelación-descongelación y métodos de carga remotos (método de gradiente de pH, método de gradiente de ión). Sin embargo, es solamente los métodos de carga remotos que proporcionan una relación de atrapamiento cercana al 100%; una relación de atrapamiento en el orden de solamente 5 a 30% se obtiene de los otros métodos.

Como métodos de carga remotos, se conocen aquellos que usan un gradiente de pH y gradiente de ión de sulfato de amonio. El método de gradiente de pH, que es un método de carga remoto usando un gradiente de pH, es una técnica para incorporar compuestos en el liposoma al usar el movimiento del equilibrio de disociación molecular/iónico debido al pH del compuesto objetivo.

Como un ejemplo de un compuesto atrapado en el liposoma por el

método de gradiente de pH, se puede mencionar, por ejemplo, doxorubicina (DOX, pKa; 8.2). Después de preparar una solución de liposoma con una solución reguladora de pH 4, la fase externa del liposoma se reemplaza con una solución reguladora de pH 7. En el caso donde se adiciona DOX a esta solución de liposoma, como la DOX molecular en la solución de pH es lipofílica, esta migra a la membrana de liposoma antes que a la fase acuosa. En el caso donde la DOX que ha migrado a la membrana de liposoma además hace contacto con la fase interna de pH 4 de liposoma, ésta llega a ser iónica, y se incorpora en la fase interna del liposoma. De esta manera, DOX se transporta de la fase externa a la fase interna de liposoma por un movimiento de equilibrio de disociación (ver la Literatura no de Patente 1, Literatura no de Patente 2 y Literatura de Patente 1).

Una variedad de técnicas se han reportado para mejorar este tipo de método de carga remoto. En la Literatura no de Patente 3, se divulga una técnica para mejorar la relación de atrapamiento de compuestos activos al adicionar etanol junto con el compuesto activo a la fase externa del liposoma, cuando el método de gradiente de pH se conduce en el liposoma de la composición especial llamada liposoma libre de colesterol.

En la Literatura de Patente 2, además del gradiente de pH, se divulga una técnica para mejorar la relación de atrapamiento de compuestos activos al tener iones de cobre existentes en la fase interna del liposoma.

En lugar de un gradiente de pH en el método de gradiente de pH, el método de sulfato de amonio, que es un método de carga remoto usando un gradiente de ión de sulfato de amonio, es una técnica para incorporar compuestos activos en la fase interna de liposoma al usar un gradiente de ión tal como sulfato de amonio bivalente (ver la Literatura no de Patente 1 y la Literatura de Patente 3).

Además de un gradiente de ión basado en sulfato de amonio, la Literatura de Patente 4 divulga una técnica para incorporar compuestos activos en el liposoma al adicionar ácido bórico junto con el compuesto activo a la fase externa del liposoma.

En lugar de un gradiente de ión basado en sulfato de amonio, la Literatura de Patente 5 divulga una técnica en donde, comparado con el caso donde se utiliza sulfato de amonio, la velocidad de liberación del compuesto activo se mejora al incorporar el compuesto activo en el liposoma utilizando un gradiente de ión de anión de ácido glucurónico.

Así, desde el punto de vista de la relación de atrapamiento, los métodos de carga remotos son excelentes métodos de atrapamiento. Sin embargo, en el caso donde se utilizan métodos de carga remotos, excepto para casos especiales tal como Doxil (una preparación de liposoma de DOX) donde el compuesto activo atrapado en la fase interna del liposoma se cristaliza, hay el problema de que el compuesto activo tiende fugarse del liposoma en el suero sanguíneo, y que la estabilidad de retención del compuesto activo es baja.

Como es descrito en lo anterior, con los métodos técnicos convencionales, la situación actual es que es difícil lograr la coexistencia de una alta relación de atrapamiento del compuesto activo en el liposoma y estabilidad de retención del compuesto activo en el liposoma.

Literatura de la Técnica Previa

Literaturas de Patente

Literatura de Patente 1: Patente Norteamericana No. 5192549, Especificación

Literatura de Patente 2: Publicación Internacional de PCT WO2006/037230, Folleto

Literatura de Patente 3: Patente Norteamericana No. 5316771, Especificación

Literatura de Patente 4: Patente Norteamericana No. 6051251, Especificación

Literatura de Patente 5: Publicación Internacional de PCT WO 2005/046643, Folleto

Literaturas no de Patente

Literatura no de Patente 1: Yasuyuki Sazuka, "Liposome Preparation Method," "New Developments in Liposome Application: Toward the Development of Artificial Cells" (Kazunari Akiyoshi, Shigeru Tsujii, editorial supervision)" NTS, (2005), pp. 33-37.

Literatura no de Patente 2: Mayer LD y colaboradores, Biochimica et Biophysica Acta, (1986), 857: pp. 123-126.

Literatura no de Patente 3: N. Dos Santos y colaboradores, Biochimica et Biophysica Acta, (2004), 166(1): pp. 47-60.

Breve Descripción de la Invención

Problema a ser Resuelto por la Invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar una composición de liposoma con una alta relación de atrapamiento y estabilidad de

retención del compuesto activo.

#### Medios Para Resolver el Problema

Como un resultado de la investigación diligente dirigida en resolver los problemas mencionados en lo anterior, los presente inventores descubrieron, con respecto a una composición de liposoma cuyo compuesto activo es eribulina o su sal farmacológicamente permisible, que la relación de atrapamiento y estabilidad de retención del compuesto activo en la composición de liposoma son extremadamente altas, de esta manera perfeccionando la presente invención.

Específicamente, la presente invención es como sigue.

(1)

Una composición de liposoma que contiene liposoma, y que contiene un compuesto activo en la fase interna de liposoma, en donde el compuesto activo es eribulina o su sal farmacológicamente permisible.

(2)

La composición de liposoma de acuerdo con 1, en donde la composición de liposoma esta en una forma sólida o líquida.

(3)

La composición de liposoma de acuerdo con 1 o 2, en donde la fase interna de liposoma además contiene sal de amonio.

(4)

La composición de liposoma de acuerdo con 3, en donde la concentración de la sal de amonio mencionada en lo anterior es 10 mM o más alta.

(5)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 4, en donde la fase interna de liposoma además contiene sal, ácido, base y/o aminoácido.

(6)

La composición de liposoma de acuerdo con 5, en donde la concentración de la sal mencionada en lo anterior es 1 a 300 mM.

(7)

La composición de liposoma de acuerdo con 5 o 6, en donde la concentración del ácido mencionado en lo anterior es 1 a 300 mM.

(8)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 5 a 7,

en donde la concentración del aminoácido mencionado en lo anterior es 1 a 300 mM.

(9)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 5 a 8, en donde la concentración de la base mencionada en lo anterior es 1 a 300 mM.

(10)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 9, en donde la concentración del compuesto activo mencionado en lo anterior es 0.01 a 300 mg/ml.

(11)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 10, en donde el compuesto activo mencionado en lo anterior es mesilato de eribulina.

(12)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 11, en donde la fase interna de liposoma además contiene sulfato de amonio, ácido cítrico y un compuesto activo.

(13)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 12, en donde la fase externa de liposoma contiene azúcar, electrolito y/o aminoácido.

(14)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 13, en donde la fase externa de liposoma contiene azúcar o electrolito, y aminoácido.

(15)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 13 a 14, en donde la concentración de la azúcar mencionada en lo anterior es 2 a 20%.

(16)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 13 a 15, en donde la concentración del aminoácido mencionado en lo anterior es 1 a 300 mM.

(17)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 16, en donde la fase externa de liposoma contiene sacarosa o cloruro de sodio, e

histidina.

(18)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 17, en donde la fase interna de liposoma no contiene sustancialmente ciclodextrina.

(19)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 18, en donde contiene fosfatidilcolina hidrogenada.

(20)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 19, en donde el liposoma contiene colesterol.

(21)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 20, en donde el liposoma contiene condensado de metoxipolietilenglicol.

(22)

La composición de liposoma de acuerdo con 21, en donde el condensado de metoxipolietilenglicol mencionado en lo anterior es condensado de diestearoilfosfatidil etanolamino polietilenglicol.

(23)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 22, en donde el liposoma contiene fosfatidilcolina hidrogenada, colesterol y condensado de diestearoilfosfatidil etanolamino polietilenglicol.

(24)

La composición de liposoma de acuerdo con 23, que contiene 10 a 80% de la fosfatidilcolina hidrogenada mencionada en lo anterior, 1 a 60% de colesterol mencionado en lo anterior y 0 a 50% del condensado de diestearoilfosfatidil etanolamino polietilenglicol mencionado en lo anterior.

(25)

La composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 24, en donde el liposoma contiene fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol y polietilenglicol 2000-fosfatidiletanolamina.

(26)

Un método de manufactura de la composición de liposoma de acuerdo con cualquiera de 1 a 25, que incluye: una etapa en la cual se proporciona un líquido de dispersión de liposoma que contiene liposoma;

una etapa en la cual el líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior se mezcla con el compuesto activo mencionado en lo

anterior; y

una etapa en la cual el compuesto activo mencionado en lo anterior se introduce en la fase interna de liposoma del líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior.

(27)

El método de acuerdo con 26, en donde el líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior no contiene sustancialmente sal de amonio en la fase externa de liposoma.

(28)

El método de acuerdo con 26 o 27, en donde el pH de la fase externa de liposoma del líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior es 3 a 10.

(29)

El método de acuerdo con cualquiera de 26 a 28, en donde el pH de la fase externa de liposoma de líquido a dispersión de liposoma mencionado en lo anterior es 7 a 10.

(30)

El método de acuerdo con 28 o 29, en donde el pH mencionado en lo anterior es el pH de la fase externa de liposoma de líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior en la etapa en la cual se mezclan el líquido de dispersión de liposoma mencionado anterior y el compuesto activo mencionado en lo anterior.

(31)

El método de acuerdo con cualquiera de 26 a 30, en donde la etapa en la cual el líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior se proporciona incluye: una etapa en la cual se proporciona una solución preparatoria de liposoma que contiene liposoma y que contiene sal de amonio en la fase interna de liposoma y la fase externa de liposoma; en la etapa en la cual la fase externa de liposoma de la solución preparatoria de liposoma mencionada en lo anterior se sustituye o se diluye.

(32)

El método de acuerdo con 31, en donde la etapa en la cual la fase externa de liposoma mencionado en lo anterior se sustituye o se diluye es una etapa en la cual el pH de la fase externa de liposoma se hace más alto que el pH de la fase interna de liposoma.

(33)

El método de acuerdo con 31 o 33, en donde la etapa en la cual la fase externa de liposoma mencionado en lo anterior se sustituye o se diluye es una etapa en la cual la diferencia en el pH de la fase interna de liposoma y el pH de la fase externa de liposoma es 1 a 5.

(34)

El método de acuerdo con cualquiera de 26 a 33, en donde el pH de la fase interna de liposoma mencionado en lo anterior es 3 a 9.

(35)

El método de acuerdo con cualquiera de 26 a 34, en donde el pH de la fase interna de liposoma mencionado en lo anterior es 4 a 9.

(36)

El método de acuerdo con cualquiera de 26 a 35, en donde el pH de la fase interna de liposoma mencionado en lo anterior es 5 a 8.

(37)

El método de acuerdo con cualquiera de 26 a 36, en donde la fase externa de liposoma es una solución que contiene electrolito en la etapa en la cual se introduce el compuesto activo mencionado en lo anterior.

(38)

El método de acuerdo con cualquiera de 26 a 37, en donde el líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior sustancialmente no contiene ciclodextrina en la fase interna de liposoma.

(39)

El método de acuerdo con cualquiera de 26 a 38, que además contiene una etapa en la cual se neutraliza el pH de la fase externa de liposoma.

#### Efecto de la Invención

De acuerdo con la presente invención, es posible ofrecer una composición de liposoma novedosa. La composición de liposoma de la presente invención atrapa un compuesto activo en la fase interna de liposoma con un alto grado de eficiencia, y tiene una alta estabilidad de retención del compuesto activo.

#### Breve Descripción de los Dibujos

(Fig. 1) muestra los cambios *in vitro* en la concentración de mesilato de eribulina en una composición de liposoma en el suero sanguíneo de rata (37°C).

(Fig. 2) muestra la actividad antitumoral *in vivo* del mesilato de

eribulina debido al liposoma en ratones desnudos que llevan cáncer FaDu.

(Fig. 3) muestra la actividad antitumoral *in vivo* del mesilato de eribulina debido al liposoma en ratones desnudos que llevan cáncer ACHN.

#### Mejor Modo Para Llevar a Cabo la Invención

La presente invención se describe específicamente por modos para llevar a cabo la invención, pero la presente invención no está limitada a los siguientes modos para llevar a cabo la invención, y se puede llevar a cabo con una variedad de modificaciones.

Los contenidos divulgados en la literatura referenciados en la presente invención son incorporados en la presente invención como referencia.

#### Definiciones

"Liposoma" significa vesículas cerradas microscópicas que tienen una fase interna encerrada por bicapa de lípido. En la presente invención, el liposoma incluye liposoma de una sola membrana pequeña (SUV: vesícula unilaminar pequeña), liposoma de una sola membrana grande (LUV: vesícula unilaminar grande), liposoma de una sola membrana todavía más grande (GUV: vesícula unilaminar gigante), liposoma de multicapa que tiene múltiples membranas concéntricas (ML V: vesícula multilaminar), liposoma que tiene múltiples membranas que no son concéntricas, sino irregulares (MVV: vesícula multivesicular), etc.

"Fase interna de liposoma" significa una región acuosa encerrada en la bicapa de lípido del liposoma, y se utiliza con el mismo significado como "fase de agua interna" y "fase de agua interna de liposoma". "Fase alterna de liposoma" significa la región no encerrada por la bicapa de lípido de liposoma (esto es, la región aparte de la fase interna y la bicapa de lípido) en el caso en donde el liposoma se dispersa en líquido.

"Composición de liposoma" significa una composición que contiene liposoma y que además contiene mesilato de eribulina en la fase interna de liposoma. En la presente invención, la composición de liposoma incluye formas tanto sólidas como líquidas.

"Líquido de dispersión de liposoma" significa una composición que contiene liposoma, y es una composición que precede la introducción del compuesto activo en la fase interna de liposoma.

"Solución preparatoria de liposoma" significa una composición que contiene liposoma, y es una composición que precede el ajuste de la fase externa de liposoma para propósitos de atrapar mesilato de eribulina en la fase

interna de liposoma.

"Reactivo de liposoma" significa un líquido de dispersión de liposoma, en el caso donde está en una forma líquida, en el caso donde está en una forma sólida, esto significa un reactivo del cual el líquido de dispersión de liposoma se puede obtener por disolución o suspensión en el solvente preescrito. El solvente se describe enseguida. Como es descrito enseguida, un reactivo de liposoma sólido se puede obtener, por ejemplo, el secar un líquido de dispersión de liposoma.

En la presente especificación, el "mezclado de sólido y líquido" incluye la disolución y suspensión de sólido en el líquido, y el mezclado, disolución y suspensión se utilizan de una manera mutuamente intercambiable. De manera similar, el solvente y medio de dispersión también se utilizan de una manera mutuamente intercambiable.

Por otra parte, la composición de liposoma, líquido de dispersión de liposoma, solución preparatoria de liposoma y el reactivo de liposoma de la presente invención sustancialmente no contienen ciclodextrina. "No contiene sustancialmente ciclodextrina" significa que no hay adición de ciclodextrina. Es suficiente si la ciclodextrina no es contenida en una cantidad en la cual la mejora de la solubilidad (solubilidad nominal) del compuesto activo debido a la ciclodextrina es significativamente observable, y aún en el caso donde se adicionan una cantidad en la cual la mejora en la solubilidad del compuesto activo no es significativamente observable, no se excluye de la implementación de la presente invención.

Además, como un modo preferido de la presente invención, "el líquido de dispersión de liposoma que no contiene sustancialmente sal de amonio en la fase externa de liposoma" significa que la sal de amonio no se adiciona a la fase externa de liposoma del líquido de dispersión de liposoma. La adición de sal de amonio en una cantidad que está dentro de intervalo que puede lograr el objetivo de la presente invención no va a ser excluido de la implementación de la presente invención. En el caso donde la sal de amonio es contenida en la fase externa del liposoma de una solución preparatoria de liposoma, es posible preparar un líquido de dispersión de liposoma que no contiene sustancialmente sal de amonio al sustituir o diluir la fase externa de liposoma de la solución preparatoria de liposoma utilizando una solución que no contiene sustancialmente sal de amonio.

(Compuesto activo)

El compuesto activo de la presente invención es eribulina o su sal farmacológicamente permisible (después en la presente alguna vez referida como "eribulina, etc."). No hay limitación particular sobre la sal farmacológicamente permisible mientras que se formen la eribulina y la sal, ya sea sal de ácido inorgánico o sal de ácido orgánico. Por ejemplo, se puede mencionar sal de ácido clorhídrico, sal de ácido sulfúrico, citrato, sal de ácido bromhídrico, sal de ácido yodhídrico, sal de ácido nítrico, bisulfato, sal de ácido fosfórico, sal de ácido super fosfórico, sal de ácido isonicotínico, sal de ácido acético, sal de ácido láctico, sal de ácido salicílico, sal de ácido tartárico, sal de ácido pantoténico, sal de ácido ascórbico, sal de ácido succínico, sal de ácido maleico, sal de ácido fumárico, sal de ácido glucónico, sal de ácido sacarínico, sal de ácido fórmico, sal de ácido benzoico, sal de ácido glutamínico, sal de ácido metanosulfónico, sal de ácido etanosulfónico, sal de ácido bencensulfónico, sal de ácido p-toluensulfónico, sal de ácido pamórico, (pamoato) y así sucesivamente. Preferibles entre estas son la sal de ácido clorhídrico, sal de ácido sulfúrico, sal de ácido acético, sal de ácido fosfórico, citrato, sal de ácido mesílico y más preferibles de todos es la sal de ácido mesílico. Esto es, el compuesto activo preferible de la presente invención es mesilato de eribulina. Por otra parte, como la sal farmacológicamente permisible de eribulina, es aceptable usar eribulina y sal de aluminio, calcio, litio, magnesio, zinc [sic], sodio, zinc y dietanolamina. La eribulina o su sal farmacológicamente permisible es el compuesto o su sal registrada en el folleto de la Publicación Internacional de PCT WO 99/65894 o la Patente Norteamericana 62465 (los contenidos registrados en estas patentes son incorporados en la presente por referencia) y tienen acción farmacológica que incluyen acción antitumoral y acción antimetabólica. La eribulina o su sal farmacológicamente permisible exhiben acción antitumoral con respecto a melanoma, fibrosarcoma, leucemia monocítica, cáncer de colon, cáncer ovárico, cáncer de seno, cáncer de hueso, cáncer de próstata, cáncer de pulmón y fibroblastos ras-transformados.

Sin embargo, como compuestos activos que se pueden combinar con eribulina, etc., se puede seleccionar de entre compuestos utilizados en los campos de medicinas (incluyendo fármacos de diagnóstico), productos cosméticos, productos alimenticios y así sucesivamente. Con respecto a los compuestos activos, es aceptable combinar uno o más compuestos diferentes de eribulina, etc.

Como compuestos activos, se pueden mencionar compuestos de bajo peso molecular, etc. Entre estos, los compuestos usados como agentes antitumorales, agentes antibacterianos, agentes antiinflamatorios, agentes de infarto antimiocárdicos y agente de contraste son adecuados.

Con respecto al peso molecular del compuesto activo, es preferible un intervalo de 100 a 2000, es más preferible un intervalo de 200 a 1500, y es aún más preferible un intervalo de 300 a 1000. Dentro de estos intervalos, la permeabilidad de membrana de liposoma del compuesto activo es generalmente satisfactoria, y la presente invención se puede aplicar adecuadamente.

Los compuestos activos incluyen compuestos solubles en agua y compuestos lipofílicos, y mientras que son más o menos solubles en agua o solventes acuosos, la presente invención se puede aplicar.

No hay limitaciones particulares sobre agentes antitumorales en la presente invención, y se pueden mencionar, por ejemplo, derivados de camptotecina tal como clorhidrato de irinotecan, clorhidrato de nogitecan, exatecan, RFS-2000, lurtotecan, BNP-1350, Bay-383441, PNU-166148, IDEC-132, BN-80915, DB-38, DB-81, DB-90, DB-91, CKD-620, T-0128, ST-1480, ST-1481, DRF-1042, DE-310; derivado de taxano tal como hidruro de docetaxel, docetaxel, paclitaxel, IND-5109, BMS-184476, BMS-188797, T-3782, TAX-1011, SB-RA-31012, SBT-1514 Y DJ-927; ifosfamida, clorhidrato de nimustina, carvocon, ciclofosfamida, dacarbazina, tiotepa, busulfan, melfaran, ranimustina, fosfato de estramustina sódico, 6-mercaptopurina ribosido, enocitabina, clorhidrato de gemcitabina, carmfur, citarabina, ocfosfato de citarabina, tegafur, doxifluridina, hidroxycarbamida, fluorouracilo, metotrexato, mercaptopurina, fosfato de fludarabina, actinomicina D, clorhidrato de aclararubicina, clorhidrato de idarubicina, clorhidrato de pirarubicina, clorhidrato de epirubicina, clorhidrato de daunorubicina, clorhidrato de doxorubicina, epirubicina, pirarubicina, daunorubicina, doxorubicina, clorhidrato de pirarubicina, clorhidrato de bleomicina, zinostatin estimalamer, neocarzinostatin, mitomicina C, sulfato de bleomicina, sulfato de peplomicina, etoposido, tartrato de vinorelbina, sulfato de vincristina, sulfato de vindesina, sulfato de niblastina, clorhidrato de amrubicina, gefinitib, exemestano, capecitabina, TNP-470, TAK-165, KW-2401, KW-2170, KW-2871, KT-5555, KT-8391, TZT-1027, S-3304, CS-682, YM-511, YM-598, TAT-59, TAS-101, TAS-102, TA-106, FK-228, FK-317, E7070, (8E, 12E, 14E)-7[(4-cicloheptipiperazina-1-il)carbonil]oxi-3,6,16,21-tetrahidroxi-610,12,16,20-

pentametil-18,19-epoxitricosa-8,12,14-trien-11-ólido (E7107), KRN-700, KRN-5500, J-107088, HMN-214, SM-11355, ZD-0473, etc. con respecto a los compuestos registrados como sales entre los agentes antitumorales mencionados anterior, cualquier sal es aceptable, y los cuerpos libres también son aceptables. Con respecto a los compuestos registrados como cuerpos libres, cualquier sal es aceptable.

No hay limitaciones particulares sobre agentes antibacterianos, y se pueden mencionar, por ejemplo, anfotericina B, cefotiam hexilo, cefalosporina, cloramfenicol, diclofenaco, etc. Con respecto a compuestos de los agentes antibacterianos mencionados en lo anterior, cualquier sal es aceptable.

No hay limitaciones particulares sobre agentes antiinflamatorios, y se pueden mencionar, por ejemplo, prostaglandinas (PGE1, PGE2), dexametasona, hidrocortisona, piroxicam, indometacina, prednisolona, etc. Con respecto a compuestos de los agentes antiinflamatorios mencionados en lo anterior, cualquier sal es aceptable.

No hay limitaciones particulares sobre agentes de infarto anti-miocárdico y se pueden mencionar, por ejemplo, adenosina, etanolol, pilsicainida, etc. y como agentes de contraste, se pueden mencionar, por ejemplo, iopamidol, ácido ioxáglico, iohexol, iomeprol, etc. Con respecto a los compuestos de los agentes de infarto anti-miocárdico mencionados anterior y agentes de contraste, cualquier sal es aceptable.

#### (Lípidos)

Es preferible que los constituyentes de membrana del liposoma de la presente invención incluyan fosfolípidos y/o derivados de fosfolípido. Como fosfolípidos y derivados de fosfolípido se pueden mencionar, por ejemplo, fosfatidil etanolamina, fosfatidil colina, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, fosfatidil glicerol, cardiolipina, esfingomielina, ceramida fosforiletanolamina, ceramida fosforil glicerol, ceramida fosforil glicerol, fosfato, 1,2-dimiristoil-1,2-deoxifosfatidil colina, plasmalogeno, ácido fosfatídico, etc.

No hay limitaciones particulares sobre residuos de ácido graso en los fosfolípidos y derivados de fosfolípido, y se pueden mencionar, por ejemplo el residuo de ácido graso saturado no insaturado con un número de carbonos de 12 a 20. Específicamente, se pueden mencionar grupos de acilo derivados de ácido graso tal como ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico. También se pueden utilizar fosfolípidos

derivados de sustancias naturales tal como la lecitina de yema de huevo y lecitina de soja, lecitina de yema de huevo parcialmente hidrogenada cuyo residuo de ácido graso insaturado es parcial o completamente hidrogenado (completamente) lecitina de yema de huevo hidrogenada, lecitina de soja parcialmente hidrogenada, lecitina de soja (completamente) hidrogenada, etc.

No hay limitaciones particulares sobre la cantidad de mezclado (fracción en mol) de los fosfolípidos y/o derivados de fosfolípido que se utilizan cuando se prepara el liposoma, pero es preferible de 10 a 80% relativo a la composición de membrana de liposoma completa, y es más preferible 30 a 60%.

Con respecto a los constituyentes de membrana, aparte de los fosfolípidos y/o derivados de fosfolípido, el liposoma de la presente invención también puede incluir esteroides tal como colesterol y colesterol como estabilizadores de membrana, ácidos grasos que tienen grupos acilo saturados e insaturados con un número de carbonos de 8 a 22 y antioxidantes tal como  $\alpha$ -tocoferol.

No hay limitaciones particulares sobre la cantidad de mezclado (fracción en mol) de estos esteroides que se utilizan cuando se prepara el liposoma, pero es preferible 1 a 60% relativo a la composición de membrana de liposoma completa, es más preferible 10 a 50% y es aún más preferible 30 a 50%.

Por otra parte, no hay limitaciones particulares sobre la cantidad de mezclado (fracción en mol) de los ácidos grasos, pero es preferible de 0 a 30% relativo a la composición de membrana de liposoma completa, es más preferible 0 a 20% y es aún más preferible 0 a 10%. Con respecto a la cantidad de mezclado (fracción en mol) del antioxidante, es suficiente y se adiciona a una cantidad que puede obtener el efecto antioxidante, pero es preferible 0 a 15% de la composición de membrana de liposoma completa, es más preferible 0 a 10% y es aún más preferible 0 a 5%.

El liposoma de la presente invención también puede contener lípidos funcionales y lípidos modificados como constituyentes de membrana.

Como lípidos funcionales, se pueden mencionar derivados de lípidos retenidos en la sangre, derivados de lípidos sensibles a la temperatura, derivados de lípidos sensibles al pH, etc. Como lípidos modificados se pueden mencionar lípidos de PEG, lípidos de azúcar, lípidos modificados con anticuerpo, lípidos modificados con péptido, etc.

Como derivados de lípidos retenidos en la sangre, se pueden mencionar, por ejemplo, glicoforina, gangliosido GM1, gangliosido GM3, derivados de ácido glucorónico, derivados de ácido glutamínico, derivados de fosfolípido de glicerina, derivados de polietilenglicol (condensado de metoxipolietilenglicol, etc.) tal como N - [carbonil - metoxi polietilenglicol - 2000] - 1,2 - dipalmitoil - sn - glicero - 3 fosfoetanolamina, N - [carbonil - metoxi polietilenglicol - 5000] - 1,2 - dipalmitoil - sn - glicero - 3 - fosfoetanolamina, N - [carbonil - metoxi polietilenglicol - 750] - 1,2 - dipalmitoil - sn - glicero - 3 fosfoetanolamina, N - [carbonil - metoxi polietilenglicol - 2000] - 1,2 - dipalmitoil - sn - glicero - 3 -fosfoetanolamina (MPEG 2000 - distearoil fosfatidil etanolamina), y N - [carbonil - metoxi polietilenglicol - 5000] - 1,2 - diestearoil - sn - glicero - 3 - fosfoetanolamina, que son condensados de fosfoetanolamina y metoxi polietilenglicol. Al tener el liposoma que contiene derivados de lípido con propiedades de retención en la sangre, es posible mejorar la retención en la sangre de liposoma, debido a que el liposoma llega a ser difícil de capturar en el hígado, etc., como una impureza extraña.

Como derivados de lípidos sensibles a la temperatura, se pueden mencionar, por ejemplo, dipalmitoil fosfatidilcolina, etc. Al tener el liposoma que contiene derivados de lípidos sensibles a la temperatura, es posible causar la destrucción de liposoma en temperaturas específicas, y causar cambios en las propiedades superficiales de liposoma. Además, al combinar esto con un incremento en la temperatura en el sitio objetivo del tumor, etc., es posible destruir el liposoma en el sitio objetivo, y liberar el compuesto activo en el sitio objetivo.

Como derivados de lípidos sensibles al pH, se pueden mencionar, por ejemplo, dioleoil fosfatidil etanolamina, etc. Al tener el liposoma que contiene derivados de lípidos sensibles al pH, es posible promover la fusión de membrana de liposoma y endosoma cuando el liposoma se incorpora en las células debido a la endocitosis, y mejorar la transmisión del compuesto activo al tejido celular.

Como lípidos de azúcar, lípidos modificados con anticuerpos y lípido modificados con péptido, se pueden citar lípidos que son enlazados con azúcares, anticuerpos o péptidos que son compatibles con las células objetivo o tejido objetivo. Al utilizar lípidos modificados, el liposoma puede ser transmitido activamente a las células objetivo o tejido objetivo.

No hay limitaciones particulares sobre la cantidad de mezclado

(fracción en mol) de derivados de lípido con propiedades de retención en la sangre utilizados cuando se prepara el liposoma, pero es preferible 0 a 50% de la totalidad de lípidos constituyentes de membranas de liposoma, es más preferible 0 a 30% y es aún más preferible de 0 a 20%.

#### (Liposoma)

Como es mencionado en lo anterior, el liposoma es una vesícula cerrada microscópica que tiene una fase interna encerrada por una bicapa de lípido.

Idealmente, con respecto al liposoma, a) es preferible que la eribulina, etc. tenga una función de barrera que prevenga su fuga a la fase externa de liposoma después de que la eribulina, etc. es una vez atrapada en la fase interna de liposoma. En el caso, en donde se utiliza como una medicina, es preferible que el liposoma exhiba estabilidad *in vivo*, y que la eribulina etc., tenga una función de barrera que prevenga su escape a la fase externa de liposoma en la sangre cuando el liposoma se administra *in vivo*.

La composición de los constituyentes de membrana para liposoma que tienen tal permeabilidad de membrana en un nivel que permite la aplicación práctica se puede seleccionar apropiadamente por aquellos expertos en la técnica de acuerdo con el compuesto activo, tejido objetivo y los similares mediante la referencia como es necesario en las modalidades descritas enseguida (Huroshi Kikuchi, y colaboradores, "Liposome I—Preparation Methodo and Assay Methodo--", Cell Technology (1983), 2(9): pp, 1136-1149, y la literatura de referencia citada en la literatura).

Cuando se utiliza como una medicina, es preferible que la eribulina, etc. sea liberada del liposoma después de que el liposoma alcanza el tejido objetivo, células u organelas intracelulares. Con respecto al liposoma, los constituyentes de membrana por si mismos son ordinariamente biodegradables, y finalmente se descomponen en el tejido objetivo o los similares. Se cree que la eribulina atrapada, etc. es liberada de esta manera. Por otra parte, también es aceptable si el liposoma mismo es incorporado en las células.

No solamente puede la composición de liposoma ser dirigida al tejido objetivo tal como el cáncer sólido, sino también se puede utilizar para transmitir compuestos activos al cáncer hematológico y así sucesivamente. También se puede utilizar como una formulación de liberación lenta, formulación de liberación controlada, etc. en la sangre.

El tamaño de partícula del liposoma se puede ajustar de acuerdo

con el objetivo. Por ejemplo, cuando se propone para transmitir liposoma al tejido canceroso o tejido inflamado mediante el efecto de EPR (Permeabilidad de Retención Aumentada) como un producto de inyección o los similares, es preferible que el tamaño de partícula de liposoma sea de 30 a 400 nm, y es más preferible que el tamaño de partícula sea de 50 a 200 nm. En el caso donde la intención es transmitir el liposoma al macrófago, es preferible que el tamaño de partícula de liposoma sea 30 a 1000 nm, y es más preferible que el tamaño de partícula sea 100 a 400 nm. En el caso donde la composición de liposoma se va a utilizar como una preparación oral o preparación transdérmica, el tamaño de partícula de liposoma se pueden ajustar en varias micras. Se va observar que (1) en el tejido normal, las paredes vasculares sirven como barreras (debido a que las paredes vasculares están densamente constituidas por células endoteliales vasculares) y las micropartículas tales como supermoléculas y el liposoma de tamaño especificado no puede ser distribuido dentro del tejido. Sin embargo, en el tejido enfermo, las paredes vasculares están sueltas (debido a que intersticios existen entre las células endoteliales vasculares) incrementando la permeabilidad vascular, y las supermoléculas y micropartículas se pueden distribuir al tejido extravascular (permeabilidad aumentada). Por otra parte (2) el sistema linfático es bien desarrollado en el tejido normal, pero es conocido que el sistema linfático no es desarrollado en el tejido enfermo, y que las supermoléculas o micropartículas, una vez incorporadas, no son recicladas a través del sistema general, y son retenidas en el tejido enfermo (retención aumentada)—esto es llamado el efecto EPR (Matsumura, Maeda, Cancer Research. (1986), 46: pp. 6387-6392). Consecuentemente, es posible controlar la farmacocinética al ajustar el tamaño de partícula de liposoma.

En la presente invención, el tamaño de partícula de liposoma significa el tamaño de partícula promedio en peso de acuerdo con el método de dispersión de luz dinámica (método de dispersión de luz cuasi-elástica). Aquí, el tamaño de partícula se muestra que es medido por los instrumentos de dispersión de luz dinámica (por ejemplo, Zsatasizer Nano ZS modelo manufacturado por Malvern Instrumets Ltd. y ELS-8000 manufacturado por Otsuka Electronics Co, Ltd). Los instrumentos miden el movimiento Browniano de las partículas, y el tamaño de partícula se determina basado en la teoría metodológica de dispersión de luz dinámica establecida.

No hay limitaciones particulares sobre el solvente de la fase interna de liposoma, y se pueden mencionar, por ejemplo, soluciones

reguladoras tal como la solución reguladora de fosfato, solución reguladora de citrato y soluciones salina fisiológica regulada de fosfato, agua salina fisiológica, medios de cultivo para cultivos celulares, etc. Como el solvente, en el caso donde se utiliza solución reguladora, es preferible que la solución del agente regulador sea 5 a 300 mM, y es más preferible 10 a 100 mM. No hay limitaciones particulares sobre el pH de la fase interna de liposoma, pero es preferible de 3 a 11, y es más preferible 4 a 9.

(Composición de liposoma)

Se ofrece una composición de liposoma de acuerdo con la presente invención. La composición de liposoma contiene liposoma, y además contiene eribulina, etc. en la fase interna de liposoma. Como es mencionado en lo anterior, la composición de liposoma incluye tanto una forma sólida y una forma líquida. En el caso donde el liposoma esta en una forma sólida, este se puede hacer en una forma líquida al disolverlo o suspenderlo en un solvente preescrito como es descrito enseguida. En el caso donde la composición de liposoma es sólida congelada, esta se puede hacer en una forma líquida al fundir al dejarla en reposo a temperatura ambiente.

La concentración de liposoma en la concentración del compuesto activo en la composición de liposoma se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con la composición de liposoma objetivo, formulación, etc. En el caso donde la composición de liposoma es una formulación líquida, la concentración de liposoma como la concentración de todos los lípidos que constituyen el liposoma se pueden ajustar en 0.2 a 100 mM, y de preferencia en 1 a 30 mM. La concentración (dosificación) de compuestos activos en el caso donde la composición de liposoma se utiliza como una medicina se describe enseguida. Con respecto a cantidades de ciclodextrina en la composición de liposoma, es preferible que sea menor que un equivalente de 0.1 mol con relación a la eribulina, etc., y es más preferible que sea menor que el límite de detección.

En la composición de liposoma de la presente invención, la eribulina, etc. se puede proporcionar a la bicapa de lípido.

No hay limitaciones particulares sobre el solvente (medio de dispersión) de la composición de liposoma en el caso de donde la composición de liposoma es una formulación líquida, y se puede mencionar, por ejemplo, soluciones reguladoras tal como la solución reguladora de fosfato, solución reguladora de citrato y solución salina fisiológica regulada de fosfato, agua salina fisiológica y medios de cultivo para cultivos celulares. No hay limitaciones

particulares sobre el pH de la fase externa de liposoma de la composición de liposoma, pero es preferible 3 a 11 y es más preferible 4 a 9.

También se puede adicionar lo siguiente a la composición de liposoma: monosacáridos tales como glucosa, galactosa, manosa, fructosa, inositol, ribosa y xilosa; disacáridos tales como lactosa, sacarosa, cellobiosa, trehalosa y maltosa; trisacáridos tal como rafinosa y melizitosa; polisacáridos tal como ciclodextrina; y alcoholes de azúcar tal como eritritol, xilitol, sorbitol, manitol y maltitol; alcoholes polivalentes tales como glicerina, diglicerina, poliglicerina, propilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, polietilenglicol, éter monoalquílico de etilenglicol, éter monoalquílico de dietilenglicol, 1,3-butilenglicol. También se puede utilizar combinaciones de azúcar y de alcohol.

Para propósitos de almacenamiento a largo plazo estable del liposoma que es dispersado en el solvente (medio de dispersión), desde el punto de vista de la estabilidad física que incluye coagulación y así sucesivamente, es preferible eliminar el electrolito en el solvente (medio de dispersión) tanto como sea posible. Por otra parte, desde el punto de vista de la estabilidad química de los lípidos, es preferible ajustar el pH del solvente (medio de dispersión) de ácido a la vecindad de neutro 8pH 3.0 a 8.0) y remover el oxígeno resuelto a través del burbujeo de nitrógeno.

No hay limitaciones particulares sobre la concentración del azúcar o alcohol polivalente contenido en la composición de liposoma, pero en un estado donde el liposoma es dispersado en un solvente, por ejemplo, es preferible que la concentración de azúcar sea 2 a 20% (W/V) 5 a 10% (W/V) es más preferible. Con respecto a la concentración de alcohol polivalente, 1 a 5% ((W/V) es preferible y 2 a 2.5% (W/V) más preferible. Estos solventes también se pueden utilizar como la fase externa de liposoma en el líquido de dispersión de liposoma, el sustituir o diluir la fase externa de liposoma de la solución preparatoria de liposoma con este solvente, es posible cambiar la solución de la fase externa de liposoma en estas soluciones.

Es preferible que las formulaciones sólidas de la composición de liposoma incluyan, por ejemplo, monosacáridos tales como glucosa, galactosa, manosa, fructosa, inositol, ribosa y xilosa, disacáridos tales como lactosa, sacarosa, cellobiosa, trehalosa y maltosa; trisacáridos tales como rafinosa y melizitosa; polisacáridos tales como ciclodextrina; y alcoholes de azúcar tales como eritritol, xilitol, sorbitol, manitol y maltitol. Más preferible son mezclas de

glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa y sorbitol. Aún más preferibles son mezclas de lactosa, sacarosa y trehalosa. Por este medio, las formulaciones sólidas se pueden almacenar mientras períodos largos. Cuando se congela, es preferible que las formulaciones sólidas mantengan alcoholes polivalentes (soluciones acuosas) tales como glicerina, diglicerina, poliglicerina, propilenglicol, pilirolenglicol, etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, polietilenglicol, éter monoalquílico de etilenglicol, éter monoalquílico de dietilenglicol y 1,3-butilenglicol. Con respecto a alcoholes polivalentes (soluciones acuosas), glicerina, propilenglicol y polietilenglicol son preferibles, y glicerina y propilenglicol son más preferibles. Por este medio es posible almacenar establemente la formulación sólida durante períodos largos. Los azúcares y alcoholes polivalentes se pueden utilizar en combinación.

(Método de manufactura de la composición de liposoma)

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de manufactura para la manufactura de una composición de liposoma que contiene eribulina o su sal farmacológicamente permisible. El método para manufacturar la composición de liposoma incluye: una etapa en la cual se proporciona un líquido de dispersión de liposoma que contiene liposoma; una etapa en la cual el líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior se mezcla con el compuesto activo mencionado en lo anterior (eribulina o su sal farmacológicamente aceptable); y una etapa en la cual se introduce el compuesto activo mencionado en lo anterior en la fase interna de liposoma del líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior.

Es preferible que la etapa en la cual se proporciona el líquido de dispersión de liposoma que contiene liposoma incluya una etapa en la cual se proporciona una solución preparatoria de liposoma, y una etapa en la cual la fase externa de liposoma de la solución preparatoria de liposoma mencionado en lo anterior se sustituye o se diluye.

La solución preparatoria de liposoma se puede proporcionar, por ejemplo, al preparar liposoma en una solución que contiene sal de amonio. Al preparar la solución preparatoria de liposoma en una solución que contiene sal de amonio, es posible hacer un líquido de dispersión de liposoma que también contiene sal de amonio en la fase interna de liposoma.

No hay limitaciones particulares sobre la solución que contiene sal de amonio que es utilizada cuando se prepara la solución preparatoria de liposoma, y se puede utilizar cualquier solución que contiene sal de amonio.

Como sal de amonio, se puede citar, por ejemplo, cloruro de amonio, borato de amonio, sulfato de amonio, formiato de amonio, acetato de amonio, citrato de amonio, tartrato de amonio, succinato de amonio y fosfato de amonio. El sulfato de amonio, sulfato de amonio, citrato de amonio, tartrato de amonio y fosfato de amonio son preferibles entre estos; sulfato de amonio, citrato de amonio y tartrato de amonio son más preferibles y sulfato de amonio es mucho más preferible.

Se puede utilizar estas sales de amonio en combinaciones de dos o más.

La concentración de sal de amonio en la solución que contiene sal de amonio se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con la cantidad de eribulina, etc., que es atrapada, y entre más alta es mejor; 10 mM o más es preferible; 20 mM o más es más preferible y 50 mM o más es aun más preferible. Con respecto al pH de la solución que contiene sal de amonio, 3 a 9 es preferible, 4 a 9 es más preferible desde el punto de vista del balance de la relación de atrapamiento y estabilidad, y 5 a 8 es aún más preferible.

Un ajustador de pH se puede utilizar con el fin de ajustar el pH de la solución que contiene sal de amonio. No hay limitaciones particulares sobre la concentración de los ajustadores de pH individuales en la solución que contiene sal de amonio, pero 1 a 300 mM es preferibles y 5 a 100 mM es más preferible.

Como el ajustador de pH, se puede mencionar, por ejemplo, aminoácidos tales como arginina, histidina y glicina; ácidos tales como ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido glutamínico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido propiónico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido láctico, ácido bórico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido adípico, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico; sales de los ácidos mencionados en lo anterior tal como la sal de sodio, sal de potasio o sal de amonio; y compuestos alcalinos (base) tal como tris-hidroximetilamino metano, agua amoniada (amoníaco), hidruro de sodio e hidruro de potasio. Como ajustadores de pH, el hidruro de sodio, ácido clorhídrico, agua amoniada, ácido acético, ácido láctico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido cítrico y ácido fosfórico son preferibles; hidruro de sodio, agua amoniada, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido cítrico y ácido fosfórico son más preferibles; e hidruro de sodio, agua amoniada, ácido clorhídrico, ácido cítrico y ácido fosfórico solo aún más preferibles. Los ajustadores de pH se pueden utilizar en combinaciones de dos o más de las

sales de amonio. Además, las soluciones reguladoras también se pueden utilizar como ajustadores de pH, tal como la solución reguladora de fosfato, solución reguladora de citrato y soluciones salina fisiológica regulada de fosfato.

Como la solución preparatoria de liposoma, es mejor usar una solución que se obtiene al preparar liposoma sin inclusión sustancial de ciclodextrina. Como la solución preparatoria de liposoma, la fase interna de liposoma también puede contener, sal, ácido, base y/o aminoácido. En este caso, es preferible que la fase interna de liposoma contenga el compuesto activo, sal de amonio y ácido. Como la sal de amonio, el sulfato de amonio se puede mencionar como el ejemplo preferido. Como el ácido, el ácido cítrico se puede mencionar como el ejemplo preferido.

Con respecto a la preparación de liposoma, se puede mencionar el método de película de lípidos (método de Vórtice), método de evaporación de fase inversa, método ultrasónico, método de pre-vesícula, método de inyección de etanol, método de prensa francesa, método de remoción de ácido cólico, método de lote de Triton X-100, método de fusión  $\text{Ca}^{2+}$ , método de inyección de éter, método de recosido, método de congelación-descongelación, etc.

Las diversas condiciones (cantidades de constituyentes de membrana, temperatura, etc.), en la preparación de liposoma se pueden seleccionar adecuadamente de acuerdo con el método de preparación de liposoma, composición de liposoma objetivo, tamaño de partícula, etc. (ver Op. Cit, Kikuchi (1983), etc.).

El tamaño de partícula de liposoma se puede ajustar opcionalmente como sea necesario. El tamaño de partícula se puede ajustar, por ejemplo, al conducir extrusión (filtración de extrusión) bajo alta presión utilizando un filtro de membrana de diámetro de poro regular. El ajuste del tamaño de partícula se puede conducir en cualquier tiempo durante la manufactura de la composición de liposoma de la presente invención. Por ejemplo, se puede conducir antes del ajuste de la fase externa de liposoma en la solución preparatoria de liposoma, después del ajuste de la fase externa de liposoma en la solución preparatoria de liposoma, o después de la introducción del compuesto activo en la fase interna de liposoma. Es preferible conducir el ajuste de tamaño de partícula antes de introducir el compuesto activo en la fase interna de liposoma, y es más preferible conducirlo antes de ajustar la fase externa de liposoma en la solución preparatoria de liposoma.

El líquido de dispersión de liposoma se puede obtener al sustituir o

diluir la fase externa de la solución preparatoria de liposoma obtenida. La sustitución de la fase externa de liposoma se puede conducir una vez, o una combinación de varios tipos de métodos de sustitución o dilución se pueden conducir múltiples veces.

Como un método para sustituir la fase externa de liposoma de la solución preparatoria de liposoma, se puede mencionar la diálisis, separación centrífuga y filtración en gel. Al sustituir la fase externa de liposoma, la presente invención se puede implementar de modo que la fase externa de liposoma no contiene sustancialmente ciclodextrina o sal de amonio. Por otra parte, sustituir o diluir la fase externa de liposoma, es posible atrapar eficientemente la eribulina o su sal farmacológicamente permisible en la fase interna de liposoma.

La diálisis se puede conducir, por ejemplo, usando una membrana de diálisis. Como una membrana de diálisis, se puede mencionar una membrana con un corte de peso molecular tal como un tubo de celulosa o Spectra/Por.

Con respecto a la separación centrífuga, la aceleración centrífuga se puede conducir de preferencia a 100,000 g o más alta, y más de preferencia a 300,000 g o más altas. Al sustituir la fase externa de liposoma por centrifugación, también se puede conducir la concentración de liposoma en conjunción con la sustitución de la fase externa de liposoma.

La filtración en gel se puede llevar a cabo, por ejemplo, al conducir el fraccionamiento basado en el peso molecular utilizando una columna tal como Sephadex o Sepharose.

Como el solvente (medio de dispersión) utilizado cuando se sustituye o diluye la fase externa de liposoma, se puede mencionar, por ejemplo, la solución de sacarosa, solución salina y medio de cultivo para cultivo celular. Al usar estos solventes, es posible preparar una composición de liposoma estable.

No hay limitaciones particulares sobre el pH del solvente, pero un intervalo de 2 a 11 se puede ajustar; 3 a 10 es preferible, 6 a 10 es más preferible y 7 a 10 es aún más preferible, como es descrito enseguida, un gradiente de pH se puede utilizar para introducir la eribulina, etc. en la fase interna de liposoma. En este caso, el pH de solvente se puede ajustar de modo que la fase externa de liposoma alcance el pH objetivo.

Un ajustador de pH se puede utilizar con el fin de ajustar el pH en el solvente. No hay limitaciones particulares sobre la concentración de uso, pero

1 a 300 mM es preferible, y 5 a 100 mM es más preferible.

Como el ajustador de pH, se puede mencionar, por ejemplo, aminoácidos tales como arginina, histidina, y glicina; ácidos tales como ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido glutamínico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido propiónico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido láctico, ácido bórico, ácido maléico, ácido fumárico, ácido málico, ácido adípico, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico; sales de los ácidos mencionados en lo anterior tal como sal de sodio, sal de potasio y sal de amonio; y compuestos alcalinos tal como tris-hidroximetilamino metano, agua amoniada, hidruro de sodio e hidruro de potasio. Hidruro de sodio, ácido clorhídrico, histidina, ácido tartárico, ácido succínico, ácido cítrico y ácido fosfórico son preferibles; hidruro de sodio, ácido clorhídrico, histidina, ácido tartárico, ácido cítrico y ácido fosfórico son más preferibles; e hidruro de sodio, ácido clorhídrico, histidina y ácido fosfórico son aún más preferibles.

Con el fin de mejorar la relación de atrapamiento de eribulina o su sal farmacológicamente permisible en el liposoma, la relación de atrapamiento se puede incrementar al adicionar una solución (solución de sal) que contiene electrolito a la fase externa de liposoma para incrementar la intensidad iónica. No hay limitaciones particulares sobre el electrolito (sal) contenido en la fase externa de liposoma, pero cloruro de sodio y cloruro de potasio son preferibles, y cloruro de sodio es más preferible. También se puede utilizar solución salina fisiológica, por otra parte, como la fase externa de liposoma del líquido de dispersión de liposoma o los similares, azúcar, electrolito y/o aminoácidos se pueden incluir, y azúcar o electrolito de aminoácidos también se puede incluir. Como azúcar, sacarosa se pueden echar como el ejemplo preferido, como electrolito, la solución salina fisiológica de cloruro de sodio se puede mencionar como ejemplos preferidos, y como aminoácidos, histidina se puede mencionar como el ejemplo preferido.

Es preferible que el líquido de dispersión de liposoma obtenido no contenga sustancialmente el ciclodextrina o sal de amonio en la fase externa de liposoma y la fase interna de liposoma, ver la presente invención, la eribulina o sal y farmacológicamente permisible se puede introducir en la fase interna de liposoma aún en el caso donde la ciclodextrina o sal de amonio tiene por alguna razón que ser adicionada a la fase externa de liposoma de líquido especial de liposoma, y aún cuando la fase externa de liposoma de líquido de dispersión de liposoma contiene ciclodextrina o sal de amonio.

Con respecto a la concentración de lipido de liposoma en el líquido de dispersión de liposoma, 1 a 100 mM es preferible, y 1-50 mM es más preferible. Dentro de estos intervalos, es posible formar adecuadamente un número más grande de partículas de liposoma sin deteriorar las propiedades físicas del líquido de dispersión de liposoma.

La composición de liposoma se puede obtener al mezclar el líquido de dispersión de liposoma obtenido y el compuesto activo de eribulina, etc., y al introducir el compuesto activo en la fase interna del liposoma de líquido de dispersión de liposoma. Es preferible que la etapa de introducción incluya una etapa en la cual la permeabilidad de membrana de liposoma se aumente en la solución mezclada del líquido de dispersión de liposoma y el compuesto activo. Por este medio, el atrapamiento de la eribulina, etc. en el liposoma se puede realizar en un período mas corto de tiempo. Sin embargo, aún si no se conducen operaciones particulares para el propósito de aumentar la permeabilidad de membrana de liposoma después del mezclado del líquido de dispersión de liposoma y eribulina, etc., es posible atrapar la eribulina, etc. en el liposoma si se toma el tiempo requerido.

En la etapa en la cual se mezcla la eribulina o su sal farmacológicamente permisible, es posible usar una sustancia disuelta en un solvente o una sustancia sólida como la eribulina, etc. No hay limitaciones particulares sobre el solvente y se puede usar, por ejemplo, una sustancia idéntica a la fase externa de liposoma del líquido de dispersión de liposoma.

En una opción como sea necesario, es posible usar un gradiente de pH en la introducción de eribulina, etc., en la fase interna de liposoma. En este caso, con respecto al pH de la fase interna de liposoma del líquido de dispersión de liposoma, 3 a 9 es preferible, 4 a 9 es más preferible y 5 a 8 es aún más preferible.

Por otra parte, es posible ajustar el pH de la fase externa de liposoma más alto que el pH de la fase interna de liposoma para crear un gradiente de pH. Un gradiente de pH de 1 a 5 es preferible, y 2 a 3 es más preferible.

Además, es posible incrementar la relación de atrapamiento en el liposoma al llevar el pH de la fase externa de liposoma más cercano a la vecindad del pKa de eribulina, etc. 7.5 a 12.5 es preferible, 8.5 a 11.5 es más preferible y 9 a 10.5 es aún más preferible (el pKa de mesilato de eribulina es 9.6).

Como la solución preparatoria de liposoma, es óptimo usar una solución que se obtiene al preparar liposoma sin inclusión sustancial de ciclodextrina.

Como un método para aumentar la permeabilidad de membrana de liposoma en la solución mezclada obtenida, se puede mencionar el método de calentamiento de la solución mezclada, el método de adicionar un fluidizador de membrana a la solución mezclada, etc.

En el caso donde se calienta la solución mezclada, el compuesto activo generalmente puede ser más eficientemente producido en la fase interna de liposoma al calentar a temperaturas más altas. Específicamente, es preferible ajustar la temperatura de calentamiento tomando en consideración la estabilidad térmica del compuesto activo y los constituyentes de membrana de liposoma empleados. En particular, es preferible que la temperatura de calentamiento se ajuste a la temperatura de transición de fase de la membrana de bicapa de lípido de liposoma o más alta.

La "temperatura de transición de fase" de la membrana de bicapa de lípido de liposoma significa la temperatura en la cual la absorción de calor inicia (la temperatura cuando comienza la reacción endotérmica) en el análisis térmico diferencial de condiciones de temperaturas elevadas. El análisis térmico diferencial es una técnica que permite el análisis de las propiedades térmicas de las muestras al medir las diferencias de temperatura de una muestra o sustancia de referencia como una función del tiempo o temperatura mientras se cambia la temperatura de la muestra o sustancia de referencia. En el caso donde se conduce el análisis térmico diferencial con respecto a los constituyentes de membrana de liposoma, los componentes de membrana de liposoma fluidizan a medida que se incrementa la temperatura, y se observa la reacción endotérmica. Como es ampliamente conocido en este campo técnico, el intervalo de temperatura en el cual la acción endotérmica se observa grandemente varía de acuerdo con los componentes de membrana de liposoma. Por ejemplo, en el caso donde los componentes de membrana de liposoma consisten de un lípido puro, el intervalo de temperatura en el cual la reacción endotérmica se observa es extremadamente reducido, y la reacción endotérmica frecuentemente se observa dentro de un intervalo de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  con relación a la temperatura pico endotérmico. Por otra parte, en el caso donde los componentes de membrana de liposoma consiste de múltiples lípidos, y particularmente en el caso donde los componentes de membrana de liposoma

consiste de lípidos derivados de materiales naturales, en el intervalo de temperatura en el cual la reacción endotérmica se observa debe ser amplio y la reacción endotérmica se observa, por ejemplo, dentro de un intervalo de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  con relación a la temperatura pico endotérmico. Esto es, un pico amplio, etc. se observa. De acuerdo con la presente invención, se cree que la fluidización de membrana de liposoma se incrementa, y la permeabilidad de membrana del compuesto activo se incrementa al elevar la temperatura más alta que la temperatura de retención de fase de la membrana de bicapa de lípido de liposoma.

Por ejemplo, aunque dependiente de la estabilidad térmica y así sucesivamente del compuesto activo y los constituyentes de membrana de liposoma empleados, es preferible tener un intervalo de temperatura desde la temperatura de transición de fase de la membrana de bicapa de lípido de liposoma a  $+20^{\circ}\text{C}$  de la temperatura de transición de fase; un intervalo de temperatura desde la temperatura de transición de fase a  $+10^{\circ}\text{C}$  de la temperatura de transición de fase más preferible; y un intervalo de temperatura desde  $+5^{\circ}\text{C}$  de la temperatura de transición de fase a  $+10^{\circ}\text{C}$  de la temperatura de transición de fase es aún más preferible.

La temperatura de calentamiento es ordinariamente 20 a  $100^{\circ}\text{C}$ ; 40 a  $80^{\circ}\text{C}$  es preferible y 45 a  $65^{\circ}\text{C}$  es más preferible.

Específicamente, en el caso de una membrana de liposoma cuyos ingredientes principales son di-palmitoil fosfatidilcolina (temperatura de transición de fase como sustancia simple:  $41^{\circ}\text{C}$ ) y colesterol, aunque también depende de la composición de la misma, una temperatura de calentamiento de 40 a  $60^{\circ}\text{C}$  es ordinariamente preferible, y 45 a  $50^{\circ}\text{C}$  es más preferible. Por otra parte, en el caso de una membrana de liposoma cuyos ingredientes principales son fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC; temperatura de transición de fase como sustancia simple: 50 a  $60^{\circ}\text{C}$ ) y colesterol, aunque también depende la composición de la misma como una temperatura de calentamiento del 50 a  $70^{\circ}\text{C}$  es ordinariamente preferible, y 55 a  $65^{\circ}\text{C}$  es más preferible. Sin embargo, estas temperaturas de calentamiento de ninguna manera limita la presente invención.

En la etapa de calentamiento, no hay limitaciones particulares sobre el tiempo en el cual se mantiene la temperatura en o arriba de la temperatura de transición de fase, y esta se puede ajustar apropiadamente de otro intervalo, por ejemplo, de varios segundos a 30 minutos. Tomando en

consideración la estabilidad térmica de compuesto activo y los lípidos así como la producción de más eficientes, es deseable conocido el tratamiento dentro de un tiempo corto. Esto es, es preferible que el período de mantenimiento de temperatura elevada sea de 1 a 30 minutos, y 2 a 5 minutos es más preferible. Sin embargo, estos tiempos de mantenimiento de temperatura de ninguna manera limitan la presente invención.

Por otra parte como es establecido en lo anterior, también es posible aumentar la permeabilidad de membrana de liposoma y adicionar un fluidizador de membrana a la solución mezclada obtenida (esto es, adicionando al lado de fase interna de liposomas). Como un fluidizador de membrana, se pueden mencionar solventes orgánicos, surfactantes, enzimas, etc., que son solubles en solventes acuosos. Más específicamente, como solventes orgánicos, se pueden mencionar, por ejemplo, alcoholes monovalentes tales como alcohol etílico y alcohol bencilico; alcoholes polivalentes tales como glicerina y propilenglicol; solventes polares apróticos tal como dimetil sulfóxido (DMSO). Como surfactantes se pueden mencionar, por ejemplo, surfactantes aniónicos tal como ácido graso sódico, sulfato de monoalquilo y fosfato de monoalquilo; surfactante catiónicos tal como la sal de trimetilamonio de alquilo; surfactantes amfolíticos tal como óxido de dialquildimetilamina y surfactante no iónicos tal como polioxietileno, alquil éter, éter monoglicérido de alquilo y éster de sorbitan de ácido graso. Como enzimas, se pueden mencionar, por ejemplo, colinesterasa y colesterol oxidasa. Aquellos expertos en la técnica pueden ajustar la cantidad de fluidizador de membrana de acuerdo con la composición de los constituyentes de membrana de liposoma, el fluidizador de membrana, etc. y tomando en consideración el grado de eficiencia de atrapamiento del compuesto activo debido a la adición del fluidizador de membrana, la estabilidad de liposoma, etc.

El método de manufactura de la composición de liposoma de la presente invención puede incluir una etapa de ajustar el pH de la fase externa de liposoma de la composición de liposoma obtenida después de la etapa de introducción mencionada en lo anterior.

El pH de la fase externa que es ajustado no es particularmente limitado, pero de preferencia pueden ser 4 a 10, más de preferencia 5 a 9 y aún más de preferencia neutro 6 a 8 desde el punto de vista de estabilidad química del fosfolípido que compone liposoma.

Además, se puede incluir adicionalmente una etapa de secado de

la composición de liposoma obtenidas. Esto es, cuando sustituyen una composición de liposoma como una formulación líquida, la composición de liposoma en una forma líquida obtenida de la etapa de introducción mencionado en lo anterior se puede utilizar sin modificación, la composición de liposoma final, o la fase externa liposoma en la composición de liposoma líquida obtenida en la etapa de introducción mencionada anterior se puede ajustar (reemplazar, etc.) para hacer una composición de liposoma final. Cuando se hacen esto, el ajuste de la fase externa de liposoma se puede llevar a cabo de manera similar al ajuste de la fase externa de liposoma en un líquido preparatorio y liposoma. En el caso de la composición de liposoma es una formulación líquida, este se puede utilizar sin modificación adicional.

Además, en el caso donde la composición de liposoma se va a hacer en una preparación líquida, la composición de liposoma líquida obtenida en la etapa de introducción mencionada en lo anterior se puede secar para hacer la composición de liposoma sólida final. El secado por congelación y secado por rocío se puede mencionar como ejemplos de métodos para secar la composición de liposoma. En caso en donde la composición de liposoma es una preparación sólida, esto se puede disolver o suspender de un solvente adecuado y utilizar como una formulación líquida. El solvente para el uso se puede ajustar apropiadamente de acuerdo con el propósito de uso, etc., para la composición de liposoma, y en el caso de usar la composición de liposoma como un producto de inyección, por ejemplo, el solvente es de preferencia agua destilada estéril. En el caso de usar la composición de liposoma como una medicina, el médico o paciente puede inyectar el solvente de un frasquito en el cual se atrapa de preparación sólida, por ejemplo, para hacer la preparación en el tiempo de uso. En el caso donde la composición de liposoma líquida es una preparación sólida congelada como este se puede utilizar como una formulación líquida al almacenar un estado congelado, y regresar a un estado líquido al dejar fundir la temperatura ambiente o al fundir rápidamente con calor en el momento del uso.

(Composiciones Farmacéuticas, etc.)

La composición de liposoma de la presente invención se puede utilizar como una medicina curativa en el campo médico. Específicamente, la composición de liposoma de la presente invención se puede utilizar como una composición farmacéutica antitumoral.

En el caso donde la composición de liposoma de la presente

invención se utiliza como una composición farmacéutica, la composición de liposoma se puede administrar mediante inyección (intravenosa, intraarterial, o inyección local) oralmente, nasalmente, subcutáneamente, pulmonarmente o a través de gotas para ojos, y en particular la inyección local a un grupo dirigido de células u órganos u otra de tal inyección es preferible además de la inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intracutánea e inyección intraarterial. La tableta, polvo, granulación, jarabe, cápsula, líquido y los similares se pueden dar como ejemplos de la formulación de la composición de liposoma en el caso de administración oral. El producto de inyección, inyección de goteo, gotas para ojos, ungüento, supositorios, suspensión, cataplasma, loción, aerosol, plaster y los similares se pueden dar como ejemplos de formulaciones de la composición de liposoma en el caso de administración oral, y un producto de inyección y agente de infusión de goteo son particularmente preferibles.

La dosificación de la composición farmacéutica difiere notablemente dependiendo del tipo de enfermedad objetivo, el tipo de compuesto activo, así como la edad, sexo y peso del paciente, la severidad de los síntomas, junto con otros factores, pero ordinariamente, la dosis diaria de eribulina o su sal farmacológicamente permisible para adultos no es particularmente restringida, aunque el mesilato de eribulina, que es una sal adecuada, es ordinariamente 0.1 a 10 mg. También, la administración puede ser dividida en más de una dosis por día. Una composición de liposoma que contiene, por ejemplo, 0.01-00 mg/mL eribulina o su sal permisible [error tipográfico] [sic. Farmacológicamente] a la fase interna de liposoma se puede administrar como la composición de liposoma de la presente invención.

(Equipo)

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un equipo para preparar la composición de liposoma. El equipo se puede utilizar para preparar la composición de liposoma como una medicina, que se puede utilizar por un médico en la instalación clínica o un paciente.

El equipo incluye un reactivo de liposoma. El reactivo de liposoma puede ser ya sea una forma sólida o líquida. Si el reactivo de liposoma está en una forma líquida, el líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior se puede utilizar como el reactivo de liposoma. También, si el reactivo de liposoma está en una forma sólida, el reactivo de liposoma se puede disolver o suspender en un solvente apropiado para obtener el líquido de dispersión de

liposoma, y el líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior se puede secar para obtener el reactivo de liposoma. El secado se puede llevar a cabo similarmente al secado mencionado en lo anterior de la composición de liposoma. Cuando se utiliza el equipo, si el reactivo de liposoma esta en una forma sólida, el reactivo de liposoma se puede disolver o suspender en un solvente apropiado para hacer el líquido de dispersión de liposoma. Cuando se hace de esta manera, el solvente es similar a la fase externa de liposoma en el líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior.

El equipo de la presente invención además contiene eribulina o su sal farmacológicamente permisible (mesilato de eribulina es una sal adecuada). La eribulina o su sal farmacológicamente permisible puede estar ya sea en una forma sólida o líquida (un estado de disuelto o suspendido en un solvente). Cuando se utiliza el equipo, si la eribulina o los similares están en una forma sólida, es preferible que sea disuelta o suspendida en un solvente apropiado para ser una forma líquida. El solvente puede ser apropiadamente ajustado de acuerdo con las propiedades físicas y los similares de la eribulina o los similares, y se pueden hacer similar a la fase externa de liposoma en el líquido de dispersión mencionado en lo anterior, por ejemplo. El equipo de la presente invención puede incluir un compuesto activo diferente de eribulina o su sal farmacológicamente permisible.

En el equipo, el reactivo de liposoma y el compuesto activo se pueden empaquetar separadamente, o pueden estar en formas sólidas y mezclar conjuntamente.

En el caso en donde el reactivo de liposoma está en una forma sólida, sustituyendo los casos de disolución o suspensión para formar un líquido de dispersión de liposoma, en lo anterior, el equipo se puede utilizar al llevar a cabo una etapa similar aquellas de mezclado de líquido de dispersión de liposoma y el compuesto activo y de introducir el compuesto activo en la fase interna de liposoma del líquido de dispersión de liposoma en el método de manufactura de la composición de liposoma mencionado en lo anterior. De esta manera es posible manufacturar una composición de liposoma en la cual un compuesto activo se introduce en la fase interna del reactivo de liposoma.

En el caso en donde el reactivo de liposoma y el compuesto activo están ambos en forma sólida si se empaquetan conjuntamente, la mezcla de reactivo en liposoma y el compuesto activo se disuelve o suspende apropiadamente en un solvente. Cuando se hace de esta manera, el solvente

es similar a la fase externa de liposoma en el líquido de dispersión de liposoma mencionado en lo anterior. De esta manera es posible formar un estado en el cual el líquido de dispersión de liposoma y el compuesto activo se mezclan, después de que se hace el uso posible al llevar a cabo otras etapas de introducción del compuesto activo en la fase interna de liposoma de líquido de dispersión de liposoma en el método de manufactura en la composición de liposoma mencionado en lo anterior.

#### Modalidades

La presente invención se describe específicamente al dar las modalidades y ejemplos comparativos, pero no se limita a las modalidades enseguida.

##### (Modalidad 1)

<Preparación de una solución acuosa para la fase interna de liposoma>

396.4 mg de sulfato de amonio y 189.1 mg de monohidrato de ácido cítrico se disolvieron en agua pura, y esto se diluyó a 15 mL para preparar sulfato de amonio 200 mM/ácido cítrico acuoso 60 mM. Después de ajustar 2.5 mL del sulfato de amonio 200 mM/ácido cítrico acuoso 60 mM con amoníaco acuoso a un pH de 5.5, la solución acuosa para la fase interna de liposoma se diluyó a 5 mL con agua pura.

##### <Preparación del líquido preparatorio de liposoma>

Después de disolver 317.9 mg de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (manufacturada por Lipoid), 116.0 mg de colesterol (manufacturado por Sigma) y 130.4 mg de polietilenglicol 2000-fosfatidiletanolamina (manufacturada por Genzyme, MPEG 2000-distearoil fosfatidiletanolamina) en 10 mililitros de cloroformo, esto se suministró precisamente en tres frasquitos, después de lo cual el cloroformo de un frasquito se removió bajo presión reducida en un evaporador rotatorio para crear una película de lípido. 5 mL de la solución acuosa para la fase interna de liposoma se calentó a aproximadamente a 60°C y se adicionó a la película de lípido obtenida, y esto se agitó para preparar un líquido preparatorio de liposoma. Después de tratar el líquido preparatorio de liposoma con ondas ultrasónicas durante 20 minutos, este se granuló con un extrusor (manufacturado por Lipex Biomembranes) calentado a aproximadamente 65° C para obtener el líquido preparatorio de liposoma. El tamaño de partícula de los liposomas en el líquido preparatorio de liposoma obtenido se midió utilizando un

método de dispersión de luz dinámica y todos fueron 90 a 100 nm.

#### <Preparación del líquido de dispersión de liposoma>

Utilizando columnas Sephadex G-50, el líquido preparatorio de liposoma obtenido se eluyó con cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM (pH = 7.6), sustituyendo la fase externa de liposoma con cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM. Después de sustituir la fase externa de liposoma, este se centrífugo durante 30 minutos a 400,00 x g. Después de la centrifugación, esto se redispersó y con cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM se utilizó para preparar volumen de 5 mL, que contiene líquido de dispersión de liposoma.

#### <Preparación de la solución de compuesto activo>

El mesilato de eribulina se disolvió en cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM para obtener 1 mg/mL de mesilato de eribulina.

#### <Preparación de la composición de liposoma>

0.5 mL de líquido de dispersión de liposoma y 0.5 mL de la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio al 10-mL, y este se incubó durante 3 minutos en 50° C de agua para obtener una composición de liposoma con mesilato de eribulina introducida en los liposomas.

#### <Medición de la Relación de Atrapamiento>

La relación de atrapamiento se determinó como es descrito enseguida.

La composición de liposoma que atrapa un compuesto activo se ultracentrifugó durante 30 minutos a 400,000 x g. La concentración de compuesto activo en el filtrado se midió con HPLC, cuantificando la cantidad de compuestos activos no atrapados en los liposomas. La relación de atrapamiento se calculó utilizando la fórmula enseguida.

(Fórmula 1)

$$\text{Relación de atrapamiento (\%)} = \frac{\text{Cantidad de compuesto activo en la cantidad total (mg)} - \text{cantidad de compuesto activo en el filtrado después de la ultracentrifugación (mg)}}{\text{Cantidad de compuesto activo en la cantidad total (mg)}} \times 100$$

La relación de atrapamiento de mesilato de eribulina fue 90.9%.

(Modalidad 2)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna de liposoma>

Similarmente a la Modalidad 1, 264.3 mg de sulfato de amonio y 126.1 mg de monohidrato de ácido cítrico se disolvieron en agua pura, y un matraz graduado se utilizó para diluir esto a 10 mL para preparar sulfato de amonio 200 mM/ácido cítrico acuoso 60 mM. De esto, se tomó 1 mL y se ajustó a un pH de 5.5 con agua amoniada, después de cual se diluyó con agua pura a 2 mL para preparar la solución acuosa para la fase interna de liposoma.

<Preparación del líquido preparatorio de liposoma>

80 mg cada uno de la mezcla de lípido (fosfatidilcolina de soja hidrogenada : colesterol : polietilenglicol 2000-fosfatidiletanolamina=58,6:19:2:22.2 (en peso) se pesó, 2 mL de la solución acuosa para la fase interna de liposoma se calentó a aproximadamente 80° C y se adicionó a la misma, y esto se agitó para preparar el líquido preparatorio de liposoma. Este líquido preparatorio de liposoma se granuló utilizando un extrusor (manufacturado por Lipex Biomembranes) calentado aproximadamente a 80° C para obtener el líquido preparatorio de liposoma.

<Preparación del líquido de dispersión de liposoma>

El líquido preparatorio de liposoma obtenido se diluyó a 10 mL con el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM (pH = 7.6), y esto se centrifugó durante 30 minutos a 400,000 x g. Después de la centrifugación, se desechó todo el filtrado. El precipitado se dispersó con el cloruro de sodio 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM, y un matraz graduado se utilizó para preparar 1 mL del líquido, obteniendo el líquido de dispersión de liposoma.

<Preparación de la solución de fármaco>

Mesilato de eribulina (mesilato de eribulina) se disolvió en el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM y se obtuvo 5 mg/mL de solución de mesilato de eribulina.

<Preparación de la composición de liposoma>

0.96 mL del líquido de dispersión de liposoma y 0.24 mL de la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio de 10 mL, y este se incubó durante 3 minutos en 60° C de agua para obtener una composición de liposoma con mesilato de eribulina introducido en los liposomas.

### <Estabilidad en el plasma sanguíneo de rata>

0.2 mL del mesilato de eribulina preparado atrapado en el liposoma y 1.8 mL de plasma sanguíneo de ratas se mezclaron, y esto se agitó a 37° C utilizando una incubadora de fase líquida. Inmediatamente después de la preparación, el muestreo se realizó en 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas después de que se comenzó la agitación, y la cantidad residual de mesilato de eribulina en los liposomas se midió con HPLC.

Los resultados de medición se muestran en la Fig. 1. Como se puede observar en la Fig. 1, se indicó que el mesilato de eribulina se retuvo establemente en el plasma sanguíneo aún durante el lapso de tiempo largo de 120 horas, y fue posible la liberación gradual.

### (Modalidad 3)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna de liposoma>

264.3 mg de sulfato de amonio y 126.1 mg de monohidrato de ácido cítrico se disolvieron en agua pura para obtener aproximadamente 15 mL. Después de ajustar el pH a 7.0 con hidróxido de sodio acuoso, esto se diluyó con agua pura a 20 mL para preparar la solución acuosa para la fase interna de liposoma (sulfato de amonio a 100 mM/ácido cítrico 30 mM).

### <Preparación del líquido preparatorio de liposoma>

378 mg de una mezcla de lípido (fosfatidilcolina de soja hidrogenada : colesterol : polietilenglicol 2000-fosfatidiletanolamina=58,6:19:2:22.2 (en peso) se pesó, 10 mL de la solución acuosa mencionado en lo anterior o para la fase interna de liposoma se calentó a aproximadamente 80° C y se adicionó a la misma, y esto se agitó para preparar el líquido preparatorio de liposoma. Este líquido preparatorio de liposoma se granuló utilizando un extrusor (manufacturado por Lipex Biomembranes) proporcionado con un filtro de membrana de policarbonato de 50-nm y calentado aproximadamente a 80° C para obtener el líquido preparatorio de liposoma con un tamaño de partícula de aproximadamente 80 nm.

### <Preparación del líquido de dispersión de liposoma>

Utilizando columnas Sephadex G-50, el líquido preparatorio de liposoma obtenido se eluyó con cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM (pH = 7.6), sustituyendo la fase externa de liposoma con el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM. Después de

sustituir la fase externa liposoma, este se centrifugo durante 30 minutos a 400,00 x g. Después de la centrifugación, esto se redispersó con 96 mg/mL de sacarosa/solución acuosa de histidina de 10 mM (pH = 7.6), y 10 mL de la solución se diluyó a 10n mL para obtener el líquido de dispersión de liposoma.

<Preparación de la solución de fármaco >

Mesilato de eribulina se disolvió con los 96 mg/mL de sacarosa/solución acuosa 10 mM de histidina 10 mM (pH = 7.6) y se obtuvo 5 mg/mL de solución de mesilato de eribulina.

<Preparación de la composición de liposoma>

9.6 mL de líquido de dispersión de liposoma y 1.2 mL de la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio al 10-mL, e hidróxido de sodio se utilizó para ajustar el pH 9.5. Esto se incubó durante 3 minutos en 60° C en agua para obtener una composición de liposoma con mesilato de eribulina introducida en los liposomas. Después del enfriamiento, el cloruro se utilizó para ajustar el pH a 7.5. De manera similar a la modalidad 1, de relación de atrapamiento se midió y se encontró que es 99%.

(Modalidad 4)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna de liposoma>

Similarmente a la Modalidad 1, se preparó sulfato de amonio 100 mM/ácido cítrico 30 mM (pH = 5.5).

<Preparación del líquido preparatorio de liposoma>

Fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol y polietilenglicol 2000-fosfatidiletanolamina se pesaron de acuerdo con las cantidades mostradas en la Tabla 1 enseguida. Después de disolver cada uno en 3 mL de cloroformo, el cloroformo se removió bajo presión reducida en un evaporador rotatorio para crear una película de lípido. 10 mL de la solución acuosa preparada para la fase interna de liposoma se calentó a aproximadamente 80° C y se adicionó a la película de lípido obtenida, y esto se agitó para preparar un líquido preparatorio de liposoma. Esto se granuló utilizando un extrusor (manufacturado por Lipex Biomembranes)se calentaron a aproximadamente a 80° C para obtener el líquido preparatorio de liposoma granulado. El tamaño de partícula de los ribosomas en el líquido preparatorio de liposoma obtenido se midió utilizando un método de dispersión de luz dinámica, y Rp. 1 fue 77 nm, Rp. 2 95 nm, Rp. 3 79 nm y Rp. 4 128 nm.

(Tabla 1)

| Rp. | Fosfatidilcolina de soja<br>hidrogenada | Colesterol | Polietilenglicol<br>2000-<br>fosfatidiletanolamina |
|-----|-----------------------------------------|------------|----------------------------------------------------|
| 1   | 234 mg                                  | 76 mg      | 15 mg                                              |
| 2   | 234 mg                                  | 76 mg      | 15 mg                                              |
| 3   | 222 mg                                  | 73 mg      | 87 mg                                              |
| 4   | 222 mg                                  | 73 mg      | 87 mg                                              |

## &lt;Preparación de la composición de liposoma&gt;

Similarmente a la Modalidad 1, se obtuvo el líquido de dispersión de liposoma. También, mesilato de eribulina se disolvió en cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina de 10 mM y se obtuvo 5 mg/mL de mesilato de eribulina.

4.8 mL de cada uno de los líquidos de dispersión de liposoma y 0.6 mL de la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en recipientes de vidrio de 10 mL, que se incubaron durante 3 minutos en 60° C en agua para obtener composiciones de liposoma con mesilato de eribulina introducido en los liposomas. 24.6 mL del cloruro de sodio a 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM se adicionó a cada una de las composiciones de liposoma, y un filtro de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0-22- $\mu$ m se utilizó para filtraciones de esterilización, obteniendo una muestra de administración (concentración de mesilato de eribulina: 0.1 mg/mL). Similarmente la Modalidad 1, la relación de atrapamiento se midió y se confirmó que es por lo menos 90% en cada una de las prescripciones.

Ratones desnudos hembras (UN/UN, Charles River Laboratories Japón, Inc.) se inocularon subcutáneamente con células LOX de melanoma humano, y 11 o 12 días después, las muestras se administraron en las venas caudales para ser 10 mL/kg (1-0 mg/kg para mesilato de eribulina). Una muestra de sangre se tomó y una extracción de tejido de tumor se llevó a cabo con una pulsión cardiaca en periodos fijos después de la administración (15 minutos, 30 minutos, 2, 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 horas) (n = 3). La sangre se muestreo en un tubo de prueba que contiene heparina, y dentro de 30 minutos del muestreo, la sangre se separó al centrifugar en 1,500 x g durante 10 minutos a 4° C para obtener el plasma sanguíneo. Todo el tejido de tumor se extrajo, se lavó con PBS, y se limpió con papel absorbente de agua, y luego el peso del tejido se pesó inmediatamente y se registró. El tejido se colocó en un

tubo de prueba y se enfrió en agua helada, y luego se almacenaron a -80° C hasta que se llevó a cabo el análisis.

El mesilato de eribulina en el plasma sanguíneo y en el tejido de tumor se midió utilizando el LC/MS/MS.

Los parámetros PK se calcularon utilizando el software de análisis de modelo no de compartimiento (WinNonlin versión 5.0.1). Los resultados de los parámetros PK de plasma sanguíneo y los parámetros PKJ de tejido de tumor de mesilato de eribulina se muestra respectivamente en la Tabla 2 y la Tabla 3.

(Tabla 2)

Rp. 1-4 y parámetros PK de plasma sanguíneo de mesilato de eribulina en ratones portadores de cáncer LOX

| Prescripción          | AUC <sub>0-1</sub><br>(ng.hr/mL) | AUC <sub>0.00</sub><br>(ng.hr/mL) | CL<br>(mL.hr/kg) | V <sub>ss</sub><br>(mL/kg) | T <sub>1/2</sub><br>(hr) | MRT<br>(hr) | Relación<br>1 |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------|----------------------------|--------------------------|-------------|---------------|
| Rp. 1                 | 253049                           | 258274                            | 3.87             | 43.99                      | 8.7                      | 11.4        | 707.1         |
| Rp. 2                 | 176148                           | 177893                            | 5.62             | 56.40                      | 6.8                      | 10.0        | 487.0         |
| Rp. 3                 | 228151                           | 233067                            | 4.29             | 48.93                      | 8.4                      | 11.4        | 638.1         |
| Rp. 4                 | 221494                           | 230541                            | 4.34             | 55.88                      | 9.4                      | 12.9        | 631.2         |
| Mesilato de eribulina | 363.02                           | 365.247                           | 24.20            | 8032                       | 3.7                      | 3.3         | 1.0           |

$$\text{Relación 1} = \text{AUC}_{\text{liposoma de plasma}} / \text{AUC}_{\text{mesilato de eribulina de plasma}}$$

(Tabla 3)

Rp. 1-4 y parámetros PK de plasma sanguíneo de mesilato de eribulina en ratones portadores de cáncer LOX

| Prescripción          | C <sub>[max]</sub><br>(hr) | T <sub>[max]</sub><br>(hr) | AUC <sub>0.1</sub><br>(ng.hr/mL) | AUC <sub>0.00</sub><br>(ng.hr/mL) | t <sub>1/2</sub><br>(hr) | MRT<br>(hr) | TPI<br>(mL/g) | Relación |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------|---------------|----------|
| Rp. 1                 | 692.1                      | 4.0                        | 24960.7                          | 34581.8                           | 22.8                     | 38.8        | 0.13          | 5.5      |
| Rp. 2                 | 1002.9                     | 8.0                        | 16759.6                          | 22301.1                           | 22.2                     | 34.5        | 0.13          | 3.5      |
| Rp. 3                 | 3965.7                     | 12.0                       | 41643.7                          | 46297.3                           | 16.1                     | 23.3        | 0.20          | 7.4      |
| Rp. 4                 | 1132.8                     | 12.0                       | 28377.4                          | 45005.6                           | 23.7                     | 44.3        | 0.20          | 7.2      |
| Mesilato de eribulina | 323.425                    | 0.25                       | 4649.521                         | 6294.283                          | 17.8                     | 27.7        | 17.23         | 1.0      |

$$\text{Relación 2} = \text{AUC}_{\text{liposoma de tumor}} / \text{AUC}_{\text{mesilato de eribulina de tumor}}$$

A partir de la Tabla 2 y la Tabla 3, se puede observar que la AUC del plasma sanguíneo del tejido de tumor se incrementa en comparación al mesilato de eribulina libre en todas las cuatro composiciones de liposoma Rp. 1 a 4 y por lo tanto, la cantidad de migración del tumor y retención de mesilato de eribulina son mejorados.

(Modalidad 5)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna de liposoma>

Similarmente a la Modalidad 1, se preparó sulfato de amonio 100 mM/ácido cítrico acuoso 30 mM (pH = 5.5).

<Preparación del líquido preparatorio de liposoma>

221.8 mg de fosfatidilcolina del soja hidrogena, 72.5 mg de colesterol y 86.9 mg de polietilenglicol 2000-fosfatidiletalina se pesaron. Después de disolverlos en 3 mL de cloroformo, el cloroformo se removió bajo presión reducida en un evaporador rotatorio y se creó una película de lípido. 10 mL de la solución acuosa creada para la fase interna de liposoma se calentaron a aproximadamente de 80° C y se adicionaron en la película de lípido de obtenida, y esto se agitó para preparar un líquido preparatorio en liposoma. Esto se granuló utilizando un extrusor (manufacturado por Lipex Biomembranas) calentado a aproximadamente a 80° C, y se obtuvo un líquido preparatorio de liposoma granulado. Cuando los tamaños de partícula de los liposomas en el líquido preparatorio de liposoma obtenido se midieron utilizando el método de dispersión de luz dinámica y ellos fueron aproximadamente 90 nm.

<Preparación del líquido de dispersión de liposoma>

Utilizando columnas Sephadex G-50, el líquido preparatorio de liposoma obtenido se eluyó con cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM (pH = 7.6), sustituyendo la fase externa del liposoma con el cloruro de sodio a 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM. Después de sustituir la fase externa de liposoma, esta se centrifugo durante 30 minutos en 400,000 x g. Después de la centrifugación, esta se redispersó y cloruro de sodio a 0.9%/solución acuosa de histidina a 10 mM, se utilizó para preparar 10 mL de líquido, creando un líquido de dispersión de liposoma.

<Preparación de la solución de fármaco>

Mesilato de eribulina se disolvió en el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM y se obtuvo 1 mg/mL de solución de mesilato de eribulina. También, como muestras de administración de cuerpos libres, la solución de mesilato de eribulina se diluyó con el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina a 10 mM y un filtro de PVDF de 0.22-μm se utilizó para la filtración y esterilización para obtener muestras de administración (concentraciones de mesilato de eribulina: 0.3 mg/mL y 0.4 mg/mL).

<Preparación de la composición de liposoma>

;

1.8 mL de líquido de dispersión de liposoma y 1.2 mL de la solución de mesilato de eribulina cada uno se mezclaron en un recipiente de vidrio de 10 mL, que se incubó durante 3 minutos en 60° C en agua para obtener una composición de liposoma con mesilato de eribulina introducido en los liposomas. La composición de liposoma obtenida se diluyó con el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina de 10 mM (y un filtro de PVDF 0.22- $\mu$ m se utilizó para la filtración y esterilización para obtener una muestra de administración (concentraciones de mesilato de eribulina: 0.2 mg/mL) similarmente a la modalidad 1, la relación de atrapamiento se midió y se confirmó que es por lo menos 90%.

FaDu (obtenido de la Colección Americana de Cultivos Tipos) que es una línea de carcinoma de célula escamosa faríngea humana, se cultivó y se dejó crecer en un cultivo MEM que contiene suero fetal bovino al 10%. Las células se separaron del matraz utilizando una solución de Tripsina 0.05%-SDTA y se recolectó. Después del lavado con PBS, la célula se suspendió en PBS para  $5 \times 10^7$  células/mL se mantuvieron en hielo. 0.1 mL de líquido de suspensión de células se inyectaron subcutáneamente en la porción ventral derecha de los ratones desnudos de 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japón, Inc.). Cada ratón se observó diariamente y notas se hicieron apropiadamente en casos donde se encontraron condiciones anormales. Calibradores se utilizaron para medir el tamaño del tumor a través del tiempo, y el tamaño del tumor se calculó basado en la fórmula de cálculo: eje mayor x (cuadrado de eje menor mg/mL  $\div$  2). En el punto con el tamaño del tumor fue 100 a 200 mm<sup>3</sup>, los ratones se separaron en grupos tal que los valores promedio de los tamaños de tumor y los pesos corporales de ratón fueron uniformes entre los grupos de prueba (cinco ratones por grupo de prueba), y el fármaco se administró en la vena caudal (0.2 mL/20 g; 3 veces de intervalos de 7 días).

Los cambios resultantes en el volumen de tumor promedio después de la administración de muestra se muestra en la Fig. 2.

Como se muestra en la Fig. 2, un efecto de reducción de tumor no se obtuvo aún en 4 mg/kg, que es la dosis tolerada máxima para cuerpos libres, debido a que FaDu es una línea celular con una baja sensibilidad a mesilato de eribulina. Mientras tanto, en el caso del compuesto de liposoma, un efecto de reducción de tumor claro se encontró aun con la administración de 2 mg/kg, que está abajo de la dosis de tolerancia máxima, indicando que un efecto

farmacológico extremadamente alto se puede obtener aun para tipos de cánceres contra los cuales no se ha tenido éxito con mesilato de eribulina.

(Modalidad 6)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna de liposoma>

Similarmente a la modalidad 1, se preparó sulfato de amonio 100 mM/ácido cítrico acuoso 30 mM (pH = 5.5).

<Preparación de la solución de fármaco>

Similarmente a la modalidad 5, se obtuvieron muestras de administración (concentración de mesilato eribulina: 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL y 0.4 mg/mL) de cuerpos libres.

<Preparación de la composición de liposoma>

Excepto para el uso de la solución acuosa de solución de fase interna de liposoma [sic: solución acuosa para la fase interna de liposoma] preparada como es descrito en lo anterior, la composición de liposoma (concentración de mesilato de eribulina: 0.3 mg/mL) se obtuvo similarmente a la modalidad 5. Similarmente a la modalidad 1, la relación de atrapamiento se midió y se encontró que es por lo menos 90%.

ACHN (obtenido de la colección Americana de Cultivos Tipo) que es una línea de células de cáncer renal humano, se cultivó y se dejó crecer en un cultivo MRM que contiene suero fetal bovino al 10%. Las células se separaron del matraz utilizando la solución de Tripsina al 0.05%-EDTA, se recolectaron. Después del lavado con PBS, la célula se suspendieron en PBS para ser  $5 \times 10^7$  células/mL y luego se mantuvieron en hielo. 0-1 mL de líquido o suspensión de células se inyectaron subcutáneamente en la porción ventral derecha de los ratones desnudos de 6 semanas de (Charles River Laboratories Japón, Inc.). Cada ratón se observó diariamente, y notas se hicieron apropiadamente en casos en donde se encontraron condiciones anormales. Calibradores se utilizaron para medir el tamaño del tumor durante el tiempo, y el tamaño de tumor se calculó basado en la fórmula de cálculo: eje mayor x (eje menor cuadrado  $\div$  2). En el punto con el tamaño del tumor fue 150 a 200 mm<sup>3</sup>, los ratones se separaron en grupos tal que los valores promedio de los tamaños de tumor y los pesos corporales de ratón fueron uniformes entre los grupos de prueba (cinco ratones por grupo de prueba) y el fármaco se administró en la vena caudal (0.2 mL/20 g; 3 veces en intervalos de 7 días).

Los resultados del cambio en el volumen de tumor promedio

después de la administración de muestra se muestran en la Fig. 3.

Como se muestra en la Fig. 3, debido a que SCHN es una línea de células que es resistente a mesilato de eribulina, no se encontró diferencia significativa entre cualquiera de la administración 2 mg/kg, administración 3 mg/kg y grupos de administración de cuerpos libres de 4 mg/kg (dos de tolerancia máxima) y el grupo no tratado 45 días después de inicio de la administración de la muestra. Mientras tanto, en el grupo de administración de composición de liposoma de 3 mg/kg, se encontró un efecto de superación de crecimiento de tumor, y un valor de volumen de tumor menor significativo se indicó para el grupo no tratado y los grupos de administración de cuerpos libres 45 días después del inicio de administración de muestra. Como es así indicado, es posible retardar el crecimiento de un tumor al preparar una formulación liposomal para un tumor para el cual un efecto terapéutico nunca se ha obtenido antes con un mesilato de eribulina.

(Modalidad 7)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna de liposoma>

Los 12 tipos de soluciones acuosas para la fase interna mostradas enseguida en la Tabla 4 se crearon.

<Preparación del líquido preparatorio de liposoma>

120 mg de una mezcla de lípido (fosfatidilcolina de soja hidrogenada : colesterol : polietilenglicol 2000-fosfatidiletanolamina=58.6:19.2:22.2 (en peso) se pesaron en tubos de prueba y 3 mL de cada muestra de la solución acuosa para la fase interna se calentó a 80° C.

El líquido preparatorio de liposoma se granuló utilizando una extrusor calentado a aproximadamente a 80° C, y se obtuvo el líquido preparatorio de liposoma.

<Preparación de la solución de dispersión de liposoma>

Utilizando columnas Sephadex G-50, el líquido preparatorio de liposoma obtenido se eluyó con cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina de 10 mM, sustituyendo a la fase externa liposomal con el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM.

Después de sustituir la fase externa de liposoma, este se centrifugó durante 1 hora en 400,000 x y el filtrado se removió completamente. El secado se resuspendió con 96 mg/mL de sacarosa/solución acuosa de

histidina a 10 mM (pH = 7-5) para ser aproximadamente 2 mL.

El tamaño de partícula del líquido de dispersión de liposoma obtenido se midió utilizando un método de dispersión de luz dinámica, y todos fueron aproximadamente 80 nm.

<Preparación de la solución de fármaco>

Mesilato de eribulina se disolvió en 96 mg/mL de sacarosa/solución acuosa de histidina 10 mM y se obtuvo 5 mg/mL de solución de mesilato de eribulina.

<Preparación de la composición de liposoma>

El líquido de dispersión de liposoma y la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio de 10 10-mL tal que el mesilato de eribulina fue 0.2 mg/mL y la concentración de lipido total fue de 16  $\mu$ mol/mL. Esto se calentó a 25 minutos a 60° C para obtener una composición de liposoma con mesilato de eribulina introducida en los liposomas.

<Medición de la relación de atrapamiento>

La relación de atrapamiento se midió similarmente a la modalidad 1, y los resultados se muestran en la Tabla 4. Como se puede observar en la Tabla 4, sin considerar que sal de amonio se utilizó en la fase interna, se mejoró claramente la relación de atrapamiento de mesilato de eribulina. En particular, la mejora en la relación de atrapamiento fue marcada cuando se utiliza sulfato de amonio, citrato de amonio, fosfato de amonio y tartrato de amonio.

(Tabla 4)

| No. | Composición                | pH | Presión Osmótica | Relación de atrapamiento (%9 |
|-----|----------------------------|----|------------------|------------------------------|
| 1   | 50 mM de sulfato de amonio |    |                  | 69.4                         |
| 2   | 50 mM de sulfato de sodio  |    |                  | 7.2                          |
| 3   | 50 mM de acetato de amonio |    |                  | 36.8                         |
| 4   | 50 mM de acetato de amonio |    |                  | 10.2                         |
| 5   | 50 mM de fosfato de amonio |    |                  | 45.8                         |
| 6   | 50 mM de fosfato de sodio  |    |                  | 14.6                         |

|    |                              |                                                         |                                  |      |
|----|------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------|------|
| 7  | 50 mM de citrato de amonio   | 7.5 (ajustado con ácido clorhídrico hidroxido de sodio) | 300 mOsm (ajustado con sacarosa) | 65.8 |
| 8  | 50 mM de citrato de sodio    |                                                         |                                  | 8.7  |
| 9  | 50 mM de succinato de amonio |                                                         |                                  | 14.7 |
| 10 | 50 mM de succinato de sodio  |                                                         |                                  | 10.0 |
| 11 | 50 mM de tartrato de amonio  |                                                         |                                  | 74.7 |
| 12 | 50 mM de tartrato de sodio   |                                                         |                                  | 11.6 |

(Modalidad 8)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna de liposoma>

Similarmente a la modalidad 7, la solución acuosa para la fase interna de liposoma se preparó de sulfato de amonio 100 mM/ácido cítrico acuoso 30n mM (pH = 7.5).

<Preparación del líquido preparatorio de liposoma>

Similarmente a la modalidad 7, la solución acuosa mencionada en lo anterior para la fase interna de liposoma se utilizó para preparar un líquido preparatorio de liposoma.

<Preparación del líquido de dispersión de liposoma>

Utilizando columnas Sephadex G-50, el líquido preparatorio de liposoma obtenido se eluyó con cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM, sustituyendo la fase externa de liposoma con el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM.

Después de sustituir la fase externa de liposoma, esto se centrifugó durante 1 hora en 400,000 x g, completamente removiendo el filtrado. El precipitado se resuspendió con 96 mg/mL de solución acuosa de histidina a 10 mM (pH = 7.5), la fase externa en el liposoma se sustituyó con 96 mg/mL de sacarosa/solución acuosa de histidina 10 mM (pH = 7.5) y se obtuvo un líquido de dispersión de liposoma. El tamaño de partícula de líquido de dispersión de liposoma obtenido se midió utilizando un método de dispersión de luz dinámica, y esto fue aproximadamente 80 nm.

El líquido de dispersión de liposoma se suministró en 7 frasquitos,

y sulfato de amonio (ajustado pH de 7.5 utilizando el oxido de sodio acuoso) de una cantidad conocida se adicionó a la fase externa de liposoma tal que los frasquitos tuvieron las concentraciones en la Tabla 5 y un liquido de dispersión de liposoma se obtuvo en el cual el sulfato de amonio en la fase de externa de liposoma fue de una concentración conocida.

<Preparación de la solución de fármaco>

Mesilato de eribulina se disolvió en 96 mg/mL de sacarosa/solución acuosa de histidina 10 mM y se obtuvo 5 mg/mL de solución de mesilato de eribulina.

<Preparación de la composición de liposoma>

El liquido de dispersión de liposoma y la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio de 10-mL tal que el mesilato de eribulina fue 0.2 mg/mL y una concentración de lípido total fue 16 mM. Esto se calentó en 5 minutos a 60° C para obtener una composición de liposoma con mesilato de eribulina introducido en los liposomas.

<Medición de la relación de atrapamiento>

La relación de atrapamiento se midió similarmente a la Modalidad 1, y los resultados se muestran en la Tabla 5. Esto muestra que si aún 0.4 mM de sulfato de amonio esta presente en la fase externa de liposoma, la relación de atrapamiento cae notablemente, y no hay casi atrapamiento si 10 mM de sulfato de amonio está presente.

(Tabla 5)

| No. | Fase acuosa interna                                   | Concentración de sulfato de amonio en la fase externa (mM) | Relación de atrapamiento (%) |
|-----|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------|
| 1   | Sulfato de amonio 100 mM ácido cítrico 30 mM pH 0 7.5 | 0                                                          | 90.4                         |
| 2   |                                                       | 0.016                                                      | 90.8                         |
| 3   |                                                       | 0.08                                                       | 91.3                         |
| 4   |                                                       | 0.4                                                        | 75.9                         |
| 5   |                                                       | 2                                                          | 36.8                         |
| 6   |                                                       | 10                                                         | 16.1                         |
| 7   |                                                       | 50                                                         | 8.6                          |

(Modalidad 9)

<Preparación de la solución acuosa para fase interna de liposoma>

Similarmente el Ejemplo 7, la solución acuosa para la fase interna de liposoma se preparó de sulfato de amonio 100 mM/ácido cítrico acuoso 30 mM (pH = 7.5).

<Preparación del líquido preparatorio de liposoma>

Similarmente al Ejemplo 7, la solución acuosa mencionada en lo anterior para la fase interna de liposoma se utilizó para preparar el líquido preparatorio de liposoma.

<Preparación de la solución de dispersión de liposoma>

Utilizando columnas Sephadex G-50, el líquido preparatorio de liposoma obtenido se eluyó con cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM, sustituyendo la fase externa de liposoma con el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM.

Después de sustituir la fase externa de liposoma, esto se centrífugo durante 1 hora en 400,000 x g y el filtrado se removió completamente. El precipitado se resuspendió con 96 mg/mL de sacarosa/solución acuosa de histidina de 10 mM (pH = 7.5), la fase externa de liposoma se sustituyó con 96 mg/mL de sacarosa/solución acuosa de histidina 10 mM (pH = 7.5) y se obtuvo el líquido de dispersión de liposoma. El tamaño de partícula de líquido de dispersión de liposoma obtenido se midió utilizando un método de dispersión de luz dinámica, y este fue aproximadamente 80 nm.

<Preparación de la solución de fármaco>

Mesilato de eribulina se disolvió en 96 mg/mL de sacarosa/solución acuosa de histidina 10 mM y se obtuvo 5 mg/mL de solución de mesilato de eribulina.

<Preparación de la composición de liposoma>

El líquido de dispersión de liposoma y la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio de 10-mL tal que el mesilato de eribulina fue 0.2 mg/mL y la concentración de lípido total fue 16 mM. Como se muestra en la Tabla 6, cada pH de la fase externa de liposoma se ajustó utilizando una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M. Esto se calentó durante 25 minutos a 60° C para obtener una composición de liposoma con necesidad de eribulina introducido en los liposomas. Enseguida, ácido clorhídrico se utilizó para ajustar el pH de la fase externa 7.5.

<Medición de la relación de atrapamiento>

La relación de atrapamiento se midió similarmente a la Modalidad 1, y los resultados se muestran en la Tabla 6. Junto con la elevación en el pH de la fase externa de liposoma, la relación de atrapamiento de eribulina se elevó sustancialmente, alcanzar una relación de atrapamiento de casi 100%. (Tabla 6)

| No. | Fase acuosa | pH de fase | Relación de |
|-----|-------------|------------|-------------|
|-----|-------------|------------|-------------|

|   | interna                                                        | externa | atrapamiento (%) |
|---|----------------------------------------------------------------|---------|------------------|
| 1 | Sulfato de amonio<br>100 mM ácido<br>cítrico 30 mM pH<br>= 7.5 | 7.5     | 72.9             |
| 2 |                                                                | 8.0     | 79.8             |
| 3 |                                                                | 8.5     | 86.4             |
| 4 |                                                                | 9.0     | 92.8             |
| 5 |                                                                | 9.5     | 98.5             |
| 6 |                                                                | 10.0    | 100.0            |
| 7 |                                                                | 10.5    | 99.3             |

(Modalidad 10)

<Preparación de la solución acuosa para la fase interna de liposoma>

Similarmente al ejemplo 7, la solución acuosa para la fase interna de liposoma se preparó de sulfato de amonio 100 mM/ácido cítrico acuoso 30 mM (pH = 7.5).

<Preparación del líquido preparativo de liposoma>

Similarmente al Ejemplo 7, la solución acuosa mencionada en lo anterior para la fase interna de liposoma se utilizó para preparar el líquido preparatorio de liposoma.

<Preparación de la solución de dispersión de liposoma>

Utilizando columnas Sephadex G-50, el líquido preparatorio de liposoma obtenido se eluyó con cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM, sustituyendo al fase externa de liposoma con el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM.

El líquido de dispersión de liposoma se suministró en cuatro frasquitos, que se centrifugaron durante 1 hora a 400,000 x g y el filtrado se removió completamente. El precipitado de dos de los frasquitos se resuspendió con 96 mg/mL de sacarosa/solución acuosa de histidina de 10 mM (pH = 7.5), y la fase externa de liposoma se sustituyó con 96 mg/mL de sacarosa/solución acuosa de histidina 10 mM (pH = 7.5). El precipitado de los dos frasquitos restantes se resuspendió con el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM (pH = 7.5) y la fase externa de liposoma se sustituyó con el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM (pH = 7.5). El tamaño de partícula de los líquidos de dispersión de liposoma obtenidos se midió utilizando un método de dispersión de luz dinámica, y todos fueron aproximadamente 80 nm.

<Preparación de la solución de fármaco>

Mesilato de eribulina se disolvió en 96 mg/mL de sacarosa/solución acuosa de histidina 10 mM y se obtuvo 5 mg/mL de solución de mesilato de eribulina. De manera similar, el mesilato de eribulina se disolvió

en el cloruro de sodio al 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM y se obtuvo 5 mg/mL de solución de mesilato de eribulina.

#### <Preparación de la composición de liposoma>

El líquido de dispersión de liposoma y la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio de 10-mL tal que el mesilato de eribulina fue 0.2 mg/mL y la concentración de lípido total fue 16 mM. El pH de la fase externa de liposoma de uno de los dos frasquitos de 96 mg/mL sacarosa/solución acuosa de histidina 10 mM (pH = 7.5), se ajustó a 9.5 al adicionar hidróxido de sodio. De manera similar, el pH de la fase externa de liposoma de uno de los dos frasquitos del cloruro de sodio 0.9%/solución acuosa de histidina 10 mM (pH = 7.5) se ajustó al 9.5 al adicionar hidróxido de sodio. Esto se calentó durante 5 minutos a 60° C para obtener una composición de liposoma con mesilato de eribulina introducido en los liposomas.

#### <Medición de la relación de atrapamiento>

La relación de atrapamiento se midió similarmente a la Modalidad 1, y los resultados se muestran en la Tabla 7. Comparado con el caso donde la fase externa de liposoma es una sacarosa, que es no electrolito, el caso de cloruro de sodio, que es un electrolito, claramente se obtiene una relación de atrapamiento extremadamente alta. Además del efecto de electrolito, la aplicación del gradiente de pH para hacer la fase externa liposoma un álcali logró una relación de atrapamiento de 100%.

(Tabla 7)

| No. | Fase acuosa interna                                 | Composición de fase interna                       | Relación de atrapamiento (%) |
|-----|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------|
| 1   | Sulfato e amonio 100mM ácido cítrico 30 mM pH = 7.5 | 96 mg/mL de sacarosa histidina 10mM pH = 7.5      | 72.9                         |
| 2   |                                                     | Cloruro de sodio al 0.9% histidina 10mM pH = 7.5  | 95.9                         |
| 3   |                                                     | 96% mg/mL de sacarosa histidina 10 mM pH = 9.5    | 97.5                         |
| 4   |                                                     | Cloruro de sodio al 0.9% histidina 10 mM pH 0 9.5 | 100.0                        |

La presente solicitud esta basada en una solicitud de patente Japonesa (Solicitud de Patente Japonesa 2009-082521) presentada el 30 de Marzo de 2009, y una Solicitud de Patente Provisional Norteamericana (61/16453), y los contenidos de las mismas se incorporan en la presente como referencia.

#### Campo de Aplicación industrial

La presente invención es capaz de proporcionar un método para manufacturar un liposoma con una alta estabilidad de retención del compuesto activo con una alta relación de atrapamiento.

La composición de liposoma de la presente invención se utiliza favorablemente en aplicaciones terapéuticas a través del efecto farmacológico de la eribulina o su sal farmacológicamente permisible.

### **REIVINDICACIONES**

1. Una composición de liposoma, caracterizada porque contiene liposoma, y que contiene un compuesto activo en la fase interna de liposoma, en donde el compuesto activo es eribulina o su sal farmacológicamente permisible.
2. La composición de liposoma de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la composición de liposoma está en forma sólida o líquida.
3. La composición de liposoma de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque la fase interna de liposoma además contiene sal de amonio.
4. La composición de liposoma de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque la concentración de la sal de amonio es 10 mM o más alta.
5. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la fase interna de liposoma además contiene sal, ácido, base y/o aminoácido.
6. La composición de liposoma de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada porque la concentración de la sal es 1 a 300 mM.
7. La composición de liposoma de conformidad con la reivindicación 5 o 6, caracterizada porque la concentración del ácido es 1 a 300 mM.
8. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizada porque la concentración del aminoácido es 1 a 300 mM.
9. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, caracterizada porque la concentración de la base es 1 a 300 mM.

10. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque la concentración del compuesto activo es 0.01 a 300 mg/mL.
11. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada porque el compuesto activo es mesilato de eribulina.
12. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada porque la fase interna de liposoma además contiene sulfato de amonio, ácido cítrico y un compuesto activo.
13. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizada porque la fase externa de liposoma contiene azúcar, electrolito y/o aminoácido.
14. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizada porque la fase externa de liposoma contiene azúcar, electrolito y aminoácido.
15. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, caracterizada porque la concentración del azúcar es 2 a 20%.
16. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizada porque la concentración del aminoácido es 1 a 300 mM.
17. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizada porque la fase externa de liposoma contiene sacarosa o cloruro de sodio, e histidina.
18. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizada porque la fase interna de liposoma sustancialmente no contiene ciclodextrina.

19. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizada porque el liposoma contiene fosfatidilcolina hidrogenada.
20. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizada porque el liposoma contiene colesterol.
21. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizada porque el liposoma contiene condensado de metoxipolietilenglicol.
22. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicación 21, caracterizada porque el condensado de metoxipolietilenglicol es condensado de diestearoilfosfatidil etanolamino polietilenglicol.
23. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, caracterizada porque el liposoma contiene fosfatidilcolina hidrogenada, colesterol y condensado de diestearoilfosfatidil etanolamino polietilenglicol.
24. La composición de liposoma de conformidad con la reivindicación 23, caracterizada porque contiene 10 a 80% de la fosfatidilcolina hidrogenada, 1 a 60% del colesterol y 0 a 50% del condensado de diestearoil-fosfatidil etanolamino polietilenglicol.
25. La composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, caracterizada porque el liposoma contiene fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol y polietilenglicol 2000-fosfatidiletanolamina.
26. Un método de manufactura de la composición de liposoma de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, caracterizado porque incluye:

una etapa en la cual se proporciona un líquido de dispersión de liposoma que contiene liposoma;

una etapa en la cual el líquido de dispersión de liposoma se mezcla con el compuesto activo; y

una etapa en la cual el compuesto activo se introduce en la fase interna de liposoma del líquido de dispersión de liposoma.

27. El método de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el líquido de dispersión de liposoma sustancialmente no contiene sal de amonio en la fase externa de liposoma.
28. El método de conformidad con la reivindicación 26 o 27, caracterizado porque el pH de la fase externa de liposoma del líquido de dispersión de liposoma es 3 a 10.
29. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, caracterizado porque el pH de la fase externa de liposoma del líquido de dispersión de liposoma es 7 a 10.
30. El método de conformidad con la reivindicación 28 o 29, caracterizado porque el pH es el pH de la fase externa de liposoma del líquido de dispersión de liposoma en la etapa en la cual se mezcla el líquido de dispersión de liposoma y el compuesto activo.
31. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, caracterizado porque
  - la etapa en la cual se proporciona el líquido de dispersión de liposoma incluye: una etapa en la cual se proporciona la solución preparatoria de liposoma que contiene liposoma y que contiene sal de amonio en la fase interna de liposoma y la parte interna de liposoma; y
  - una etapa en la cual la fase externa de liposoma de la solución preparatoria de liposoma se sustituye o se diluye.
32. El método de conformidad con la reivindicación 31, caracterizado porque la etapa en la cual la fase externa de liposoma se sustituye o se diluye es una etapa en la cual el pH de la fase externa de liposoma se hace más

alto que el pH de la fase interna en el liposoma.

33. El método de conformidad con la reivindicación 31 o 32, caracterizado porque la etapa en la cual la fase externa de liposoma se sustituye o se diluye es una etapa en la cual la diferencia entre el pH de la fase interna de liposoma y el pH de la fase externa de liposoma es 1 a 5.
34. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 33, caracterizado porque el pH de la fase interna de liposoma es 3 a 9.
35. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, caracterizado porque el pH de la fase interna de liposoma es 4 a 9.
36. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 35, caracterizado porque el pH de la fase interna de liposoma es 5 a 8.
37. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 36, caracterizado porque la fase externa de liposoma es una solución que contiene electrolito en la etapa en la cual se introduce el compuesto activo.
38. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 37, caracterizado porque el líquido de dispersión de liposoma sustancialmente no contiene ciclodextrina.
39. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 38, caracterizado porque además contiene una etapa en la cual se neutraliza el pH de la fase externa de liposoma.

## RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se divulga una composición de liposoma novedosa que contiene eribulina o una sal farmacológicamente aceptable de la misma. También se divulga un método para producir la composición de liposoma.

FIG. 1

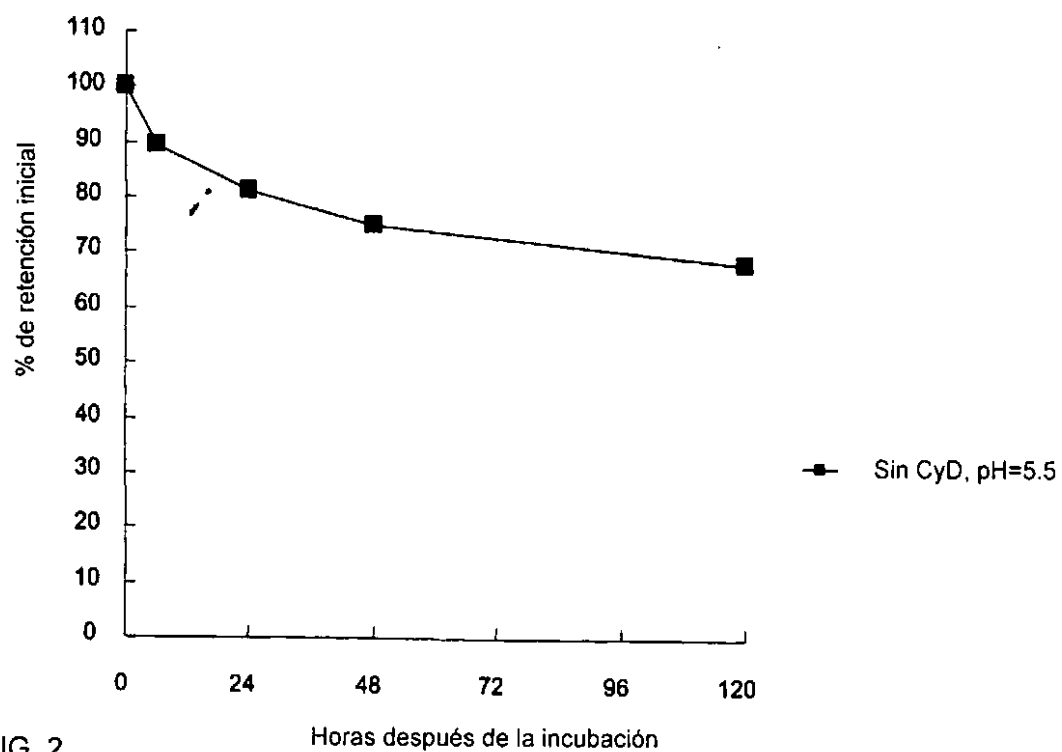
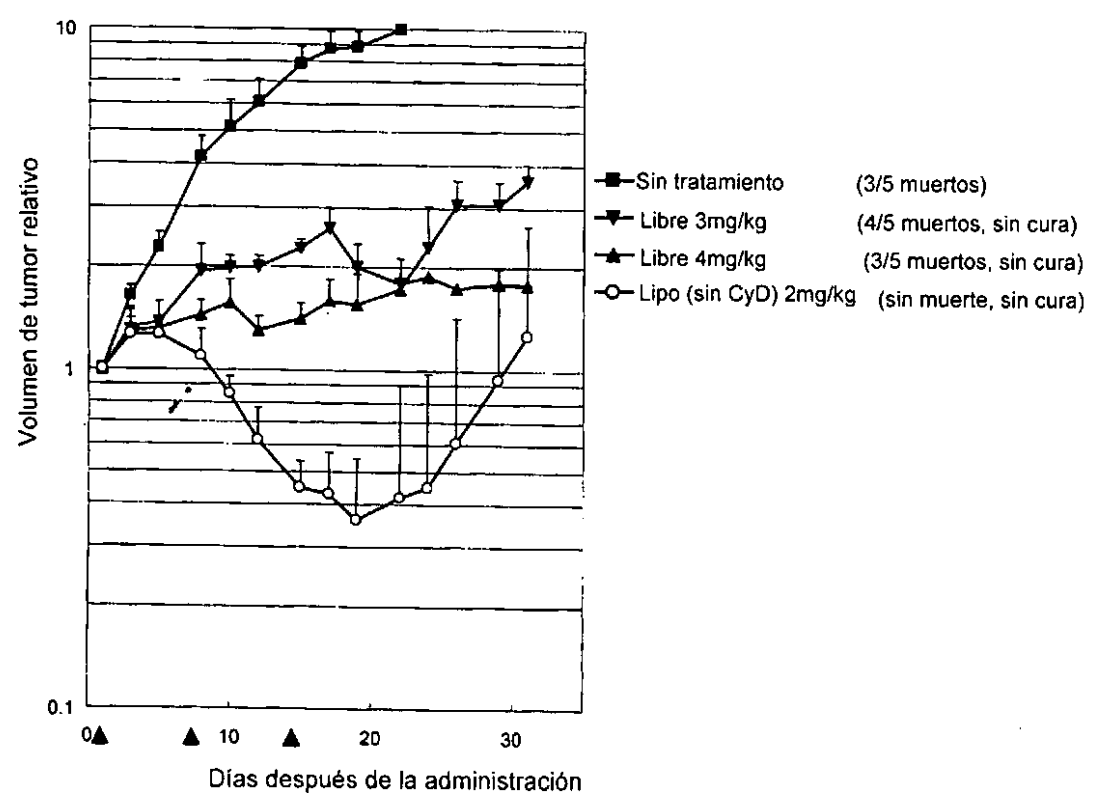
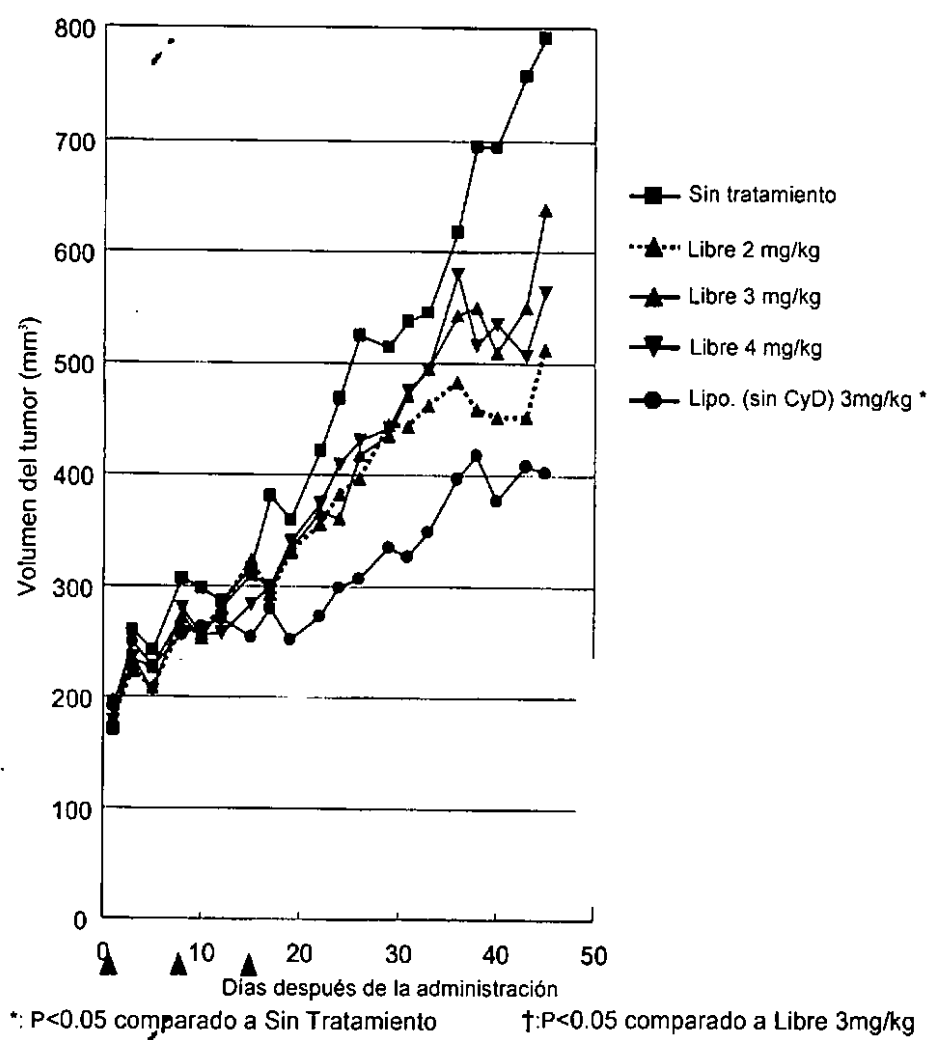


FIG. 2



2/2

FIG. 3



DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF  
PATENT APPLICATION

DOCUMENTO DE TRASPASO DE  
SOLICITUD DE PATENTE

ASSIGNMENT

CESION

The Undersigned

Los Suscritos

Hiroshi KIKUCHI,  
Kenji HYODO and  
Hiroshi ISHIHARA

acting as Inventors

en calidad de Inventores

of Colombian Patent Application No.

de la solicitud de patente en Colombia No.

Titled: Liposome Composition

Titulada:

with domicile in  
c/o Tsukuba Research Laboratories, EISAI  
CO., LTD., 1-3, Tokodai 5-chome, Tsukuba-shi,  
Ibaraki 300-2635, Japan

con domicilio en

hereby declare that they assign all rights of  
ownership as well as all rights and privileges  
relating thereto without exception over the  
following patent application in Colombia:  
No.

declaran por el presente documento que  
ceden todos los derechos de propiedad que le  
correspondan, así como las prerrogativas, sin  
excepción alguna, sobre la siguiente solicitud  
de patente en Colombia No.

Titled: Liposome Composition

Titulada:

to Eisai R&D Management Co., Ltd.

a

domiciled in  
6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku, Tokyo  
112-8088, Japan

domiciliada en

The assignor and the assignees sign this  
document as proof of their acceptance of the  
assignment.

Los cedentes y el cesionario firman este  
documento como prueba de su aceptación de  
la cesión.

Given and signed on the <sup>0<sup>rd</sup></sup> day of *August*  
of 2011

Dado y firmado a los        días del mes de  
de 2011

Signature of Assignor

Firma del Cedente

*Hiroshi Kikuchi*  
Hiroshi KIKUCHI

*Kenji Hyodo*  
Kenji HYODO

*Hiroshi Ishihara*  
Hiroshi ISHIHARA

Signature of Assignee

Firma del Cesionario

*Nobuo Deguchi*  
Nobuo Deguchi  
President



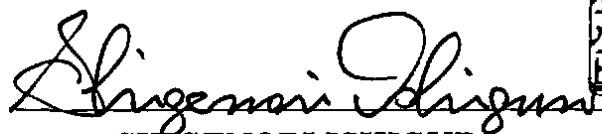
Registered No. 0905

## NOTARIAL CERTIFICATE

This is to certify that MINAKO SAITO, an agent of HIROSHI KIKUCHI, KENJI HYODO, HIROSHI ISHIHARA and NOBUO DEGUCHI, President of EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD., has stated in my very presence that said HIROSHI KIKUCHI, KENJI HYODO, HIROSHI ISHIHARA and NOBUO DEGUCHI acknowledged themselves to have signed the attached document.

Dated this 7<sup>th</sup> day of September, 2011.



  
SHIGENORI ISHIGURO



Notary

1-1-1 Shimbashi, Minato-ku, Tokyo, Japan  
Tokyo Legal Affairs Bureau



平成23年登簿第 0905 号  
認 証

69

添付書面の作成者である 菊池寛、兵頭健治、石原比呂之 及び エーザ  
イ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社 代表取締役 出口宣夫  
の代理人 斉藤美菜子 は、本職に対し、前記4名が各自その署名を自認し  
ている旨、陳述した。



よって、これを認証する。  
平成23年 9 月 7 日、本公証人役場において  
東京都港区新橋1丁目1番1号  
東京法務局所属

公 証 人  
Notary

石黒重徳 SHIGENORI ISHIGURO

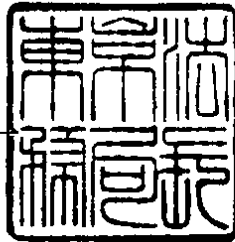
証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、  
真実のものであることを証明する。

平成23年 9 月 7 日

東京法務局長

相澤恵



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN  
This public document
2. has been signed by SHIGENORI ISHIGURO
3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau
4. bears the seal/stamp of SHIGENORI ISHIGURO, NOTARY  
Certified
5. at Tokyo
6. 9/7/2011
7. by the Ministry of Foreign Affairs
8. 11- NO 029595
9. Seal/stamp:
10. Signature



K. Oyabe

Kazutoyo OYABE

For the Minister for Foreign Affairs

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de Cesión a **EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.**, firmado por los cedentes y el cesionario.

---

Certificado No. 0905

### CERTIFICADO NOTARIAL

La presente certifica que MINAKO SAITO, un agente de HIROSHI KIKUCHI, KENJI HYODO, HIROSHI ISHIHARA y NOBUO DEGUCHI, Presidente de EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD., ha declarado en mi presencia que dichos HIROSHI KIKUCHI, KENJI HYODO, HIROSHI ISHIHARA y NOBUO DEGUCHI reconocieron haber firmado el documento adjunto.

Septiembre 7, 2011

\_\_\_\_\_  
(firma)  
SHIGENORI ISHIGURO  
Notario  
1-1-1 Shimbashi, Minato-ku  
Tokio Japón  
Oficina de Asuntos Legales de Tokio

Hay un sello que dice:  
OFICINA DE ASUNTOS LEGALES DE TOKIO  
NOTARIO  
1-1-1 Shimbashi, Minato-ku  
Tokio, Japón

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: JAPÓN

Este documento público

2. ha sido firmado por SHIGENORI ISHIGURO

3. actuando en capacidad de NOTARIO DE LA OFICINA DE ASUNTOS  
LEGALES DE TOKIO

4. lleva el sello/timbre de SHIGENORI ISHIGURO, NOTARIO

CERTIFICADO

5. en Tokio

6. Septiembre 7, 2011

7. por el Ministro de Relaciones Exteriores

8. 11- No. 029595

9. Sello/timbre

[Sello]

MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES  
JAPÓN

10. Firma

(firma)

Kazutoyo OYABE

Para el Ministro de Relaciones Exteriores

Brigard & Castro  
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros) EISAI R&D Management Co., Ltd.

I (We) EISAI R&D Management Co., Ltd.

domiciliado(s) en 6-10, Koishikawa, 4-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, Japan

domiciled in 6-10, Koishikawa, 4-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, Japan

Nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales, lemas comerciales y enseñanzas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio y/o dirección; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names, slogans and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name, domicile and address related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las demás facultades legales necesarias.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 71-21, Torre B, Piso 4, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO, domiciled in Carrera 7 No. 71-21, Torre B, Piso 4, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Este poder se expide en relación a la solicitud de patente en Colombia No. 04 045751, titulada: PREPARATION COMPOSITIONS CONTAINING ACID-UNSTABLE PHYSIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

This power of attorney is granted in relation to Colombian Patent Application No. 04 045 751, titled: PREPARATION COMPOSITIONS CONTAINING ACID-UNSTABLE PHYSIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

Otorgado y firmado en

Granted and signed in Tokyo, Japan

hoy de de 200\_

this 14<sup>th</sup> day of Dec. 2006

Firma

Signature Kentaro Yoshimatsu

Nombre: Kentaro Yoshimatsu  
Cargo: Presidente

Name: Kentaro Yoshimatsu  
Title: President



Registered No. 0163

# NOTARIAL CERTIFICATE

This is to certify that MINAKO SAITO, an agent of KENTARO YOSHIMATSU, President of EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD., who has been authorized to grant Power of Attorney on behalf of said company organized and existing according to the laws of Japan, located at 6-10, Koishikawa, 4-chome, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, has stated in my very presence that said KENTARO YOSHIMATSU acknowledged himself to have signed the attached document.

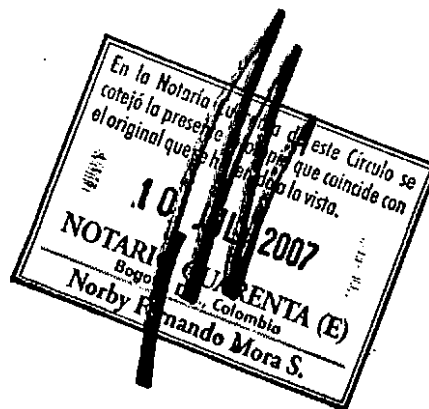
Dated this 19<sup>th</sup> day of February, 2007.



*Shigenori Ishiguro*  
SHIGENORI ISHIGURO

Notary

1-1-1 Shimbashi, Minato-ku, Tokyo, Japan  
Tokyo Legal Affairs Bureau.





添付書面の作成者である エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジ  
メント株式会社 代表取締役 吉松 賢太郎 の 代理人 斉藤美菜子 は  
本職に対し、前記 吉松 賢太郎 がその署名を自認している旨、陳述  
した。



よって、これを認証する。  
平成19年 2 月 19 日、本公証人役場において  
東京都港区新橋 1 丁目 1 番 1 号  
東京法務局所属

公 証 人  
Notary

石黒重徳

SHIGENORI ISHIGURO



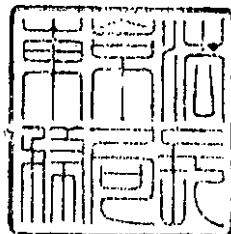
証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、  
真実のものであることを証明する。

平成19年 2 月 19 日

東京法務局長

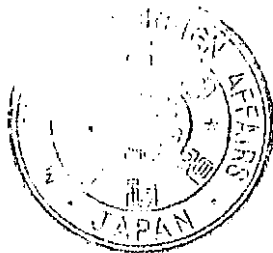
戸田信久



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

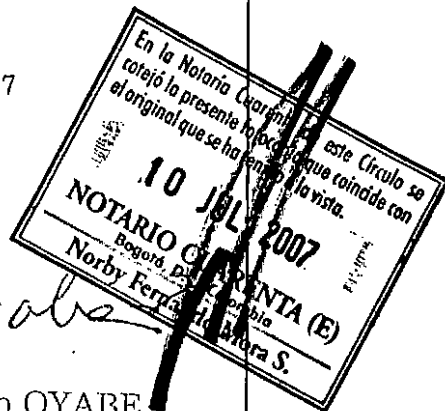
1. Country: JAPAN  
This public document
2. has been signed by SHIGENORI ISHIGURO
3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau
4. bears the seal/stamp of
5. at Tokyo
6. Certified 2/19/2007
7. by the Ministry of Foreign Affairs
8. 07- N<sup>o</sup> 011858
9. Seal/stamp:
10. Signature



10. Signature

Kazutoyo OYABE

For the Minister for Foreign Affairs



75

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.** con domicilio en 6-10, Koishikawa, 4-chome, Bunkyo-ku, Tokio, Japón

---

Registro No. 0163

### CERTIFICADO NOTARIAL

Esto es para certificar que MINAKO SAITO, un agente de KENTARO YOSHIMATSU, Presidente de EISAI R&d MANAGEMENT CO., LTD., quien ha sido autorizado para otorgar Poder de Abogado en representación de dicha compañía organizada y existente de acuerdo con las leyes del Japón, localizada en 6-10, Koishikawa, 4-chome, Bunkyo-ku, Tokio, Japón, ha indicado en mi presencia que dicho KENTARO YOSHIMATSU reconoció haber firmado el documento adjunto.

Fechado este 19 de Febrero, 2007.

Hay un sello que dice:

Tokyo  
Agencia de Asuntos Legales  
**Notario**  
1-2 SHIMBASHI MINATO KU  
TOKYO JAPON

(firma)  
\_\_\_\_\_  
**SHIGENORI ISHIGURO**  
Notario  
1-1-1 Shimbashi, Minato-ku, Tokyo, Japón  
Agencia de Asuntos Legales de Tokyo



**APOSTILLA**  
(Convención de la Haya de Octubre 5 de 1961)

2. País: Japón

Este documento público

6. ha sido firmado por **SHIGENORI ISHIGURO**

7. actuando en capacidad de Notario de la Agencia de Asuntos Legales de Tokyo

8. lleva el sello/timbre de

Certificado

9. en Tokio

6. 2/19/2007

10. por el Ministerio de Relaciones Exteriores

11. 06- No. 011858

12. Sello/timbre:  
hay un sello que dice:

10. Firma

MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES

(firma)

JAPÓN

Kazutoyo OYABE  
Para el Ministro de  
Relaciones Exteriores



PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE I

☐  
☐  
☐  
☐  
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒  
☒  
☒  
☒

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐  
☐  
☐  
☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐  
☐  
☐  
☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐