



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

DCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

- PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL -

21. EXPEDIENTE No.

06-120944

54. TÍTULO

FORMULACION DE IRINOTECAN

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K31/00

71. SOLICITANTE

KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA

DOMICILIO

1-19, Higashi-shinbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8660,
JAPON

74. APODERADO

DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

22. BOGOTÁ, D. C.,

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: KABUSHIKI KAISHA YAKULT
HONSHADirección: 1-19, Higashi-shinbashi 1-chome,
Minato-ku, Tokyo 108-8880, JAPON

Nacionalidad o Domicilio: Tokyo, JAPON

Lugar de Constitución: JAPON

Teléfono: Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO (74)

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono: 610 7420 Fax: 610 0708

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número 39779.654 TPA 70,819

④

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: (Ver ANEXO # 1)

Dirección:

Nacionalidad o Domicilio:

⑤

PCT (88)

Solicitud Internacional No. PCT/JP2006/009253

Fecha 31/05/2006

Publicación Internacional No. WO 2006/117878

Fecha 15/12/2005

⑥

Título (54)

FORMULACION DE IRINOTECAN

⑦

Clasificación Internacional (51)

A61K 31/4745, 9/127, 47/04, 47/18, 47/24, 47/30, A61P 35/00

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

JP

01/08/2004

2004-163742

⑨

Comprobante de pago No.

06-85,520

Fecha

Noviembre 3, 2006

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

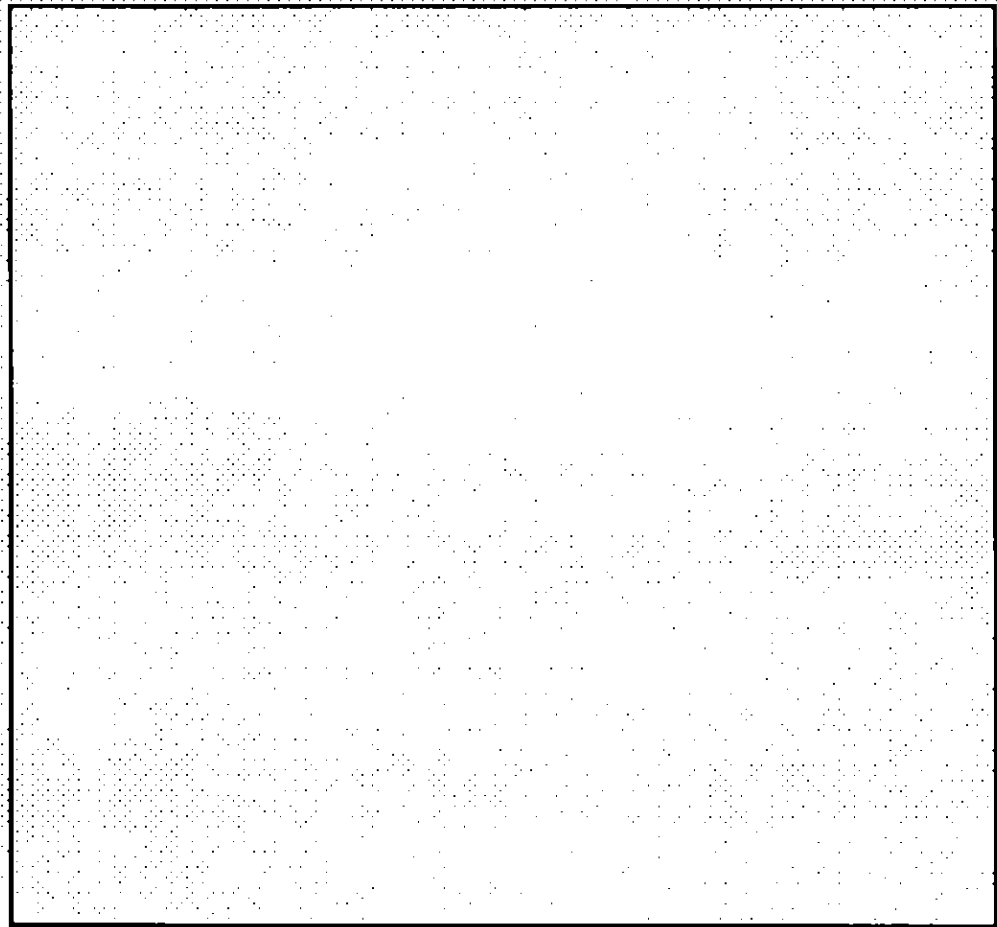
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del 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.
- ☒ Otros Tarjeta Propietario, Tarjeta Temática y Extracto para la Publicación

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
FIRMA: Margarita Castellanos
C.C. No. 39.779.854 Uuaquén - TPA 70.819 C.S.J.

30 NOV. 2006

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

ANEXO # 1

INVENTOR(ES) (72)

	NOMBRE	DIRECCION	NACIONALIDAD O DOMICILIO
1	KEISUKE YOSHINO	c/o Terumo Kabushiki Kaisha, 1500, Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun Kanagawa 259-0151, JAPON	JAPONES
2	SHIGENORI NOZAWA	c/o Terumo Kabushiki Kaisha, 1500, Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun Kanagawa 259-0151, JAPON	JAPONES
3	MASASHI ISOZAKI	c/o Terumo Kabushiki Kaisha, 1500, Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun Kanagawa 259-0151, JAPON	JAPONES
4	SEIGO SAWADA	c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, 1-19, Higashi-shinbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8660, JAPON	JAPONES
5	IKUO KATO	c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, 1-19, Higashi-shinbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8660, JAPON	JAPONES
6	TAKESHI MATSUZAKI	c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, 1-19, Higashi-shinbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8660, JAPON	JAPONES

6086
4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-120944- -00000-0000
Fecha: 2006-11-30 14:12:49 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE Y
Via: 376 FASE NACIONAL
Mod: 11 REPRESENTACION Form: 150

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 85,520
FECHA : NOVIEMBRE 3 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	50962564	03/11/2006	5,933,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. REMITISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50000-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005年12月15日 (15.12.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/117878 A1(51) 国際特許分類: A61K 31/4745, 9/127,
47/04, 47/18, 47/24, 47/30, A61P 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/009953

(22) 国際出願日: 2005年5月31日 (31.05.2005)

(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2004-163742 2004年6月1日 (01.06.2004) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): テルモ株式会社 (TERUMO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番1号 Tokyo (JP). 株式会社ヤクルト本社 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19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): 吉野 敬亮 (YOSHINO, Keisuke) [JP/JP]; 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 野沢 敬典 (NOZAWA, Shigenori) [JP/JP]; 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 磯崎 正史 (ISOZAKI, Masashi) [JP/JP]; 〒2590151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内 Kanagawa (JP). 澤田 誠吾 (SAWADA, Seigo) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 加藤 豊雄 (KATO, Ikuo) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区

東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 松崎 健 (MATSUZAKI, Takeshi) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 渡辺 望徳, 外(WATANABE, Mochitoshi et al.); 〒1010032 東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナカイビル3階 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, 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), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: IRINOTECAN PREPARATION

(54) 発明の名称: イリノテカン製剤

(57) Abstract: An irinotecan preparation having irinotecan and/or a salt thereof highly carried by a closed vesicle carrier, which exhibits a strikingly prolonged retention in blood as compared with that of conventional irinotecan liposome preparations and is capable of being present in blood for a prolonged period of time. There is provided an irinotecan preparation comprising closed vesicles formed of a lipid membrane wherein irinotecan and/or a salt thereof is sealed in a concentration of at least 0.07 mol/mol (medicine mol/total membrane lipid mol). The irinotecan preparation preferably has an ion gradient between an inner water phase and an outer water phase within the closed vesicles. The closed vesicles are preferably liposomes, and the liposomes preferably have only the external surface thereof modified with a surface modifier containing a hydrophilic polymer.

(57) 要約: 閉鎖小胞担体にイリノテカンおよび/またはその塩を高担持し、従来公知のイリノテカンリポソーム製剤に比べて血中滞留性が飛躍的に向上し、長期間血中に存在することができるイリノテカン製剤の提供。脂質膜で形成される閉鎖小胞に、イリノテカンおよび/またはその塩を、少なくとも0.07 mol/mol (薬剤mol/膜脂質mol) の濃度で内封したイリノテカン製剤。イリノテカン製剤は、好ましくは閉鎖小胞の内水相と外水相との間にイオン勾配を有する。閉鎖小胞は好ましくはリポソームであり、該リポソームは好ましくは外表面のみが親水性高分子を含む表面修飾剤で修飾されている。

WO 2005/117878 A1

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA DE ACUERDO CON EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

(PCT)



(19) ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional:
15 de diciembre de 2005 (15.12.2005)

(10) Número de Publicación Internacional
WO/2005/117878 A1

(51) Clasificación de Patente Internacional⁷: A61K 31/4745 (2006-01), A61K 47/04 (2006-01), A61K 47/18 (2006-01), A61K 47/24 (2006-01), A61K 47/30 (2006-01), A61K 9/127 (2006-01), A61K 35/00 (2006-01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/JP2005/009953

(22) Fecha de Presentación Internacional: 31 de mayo de 2005 (31.05.2005)

(25) Idioma de Presentación: Japonés (JA)

(26) Idioma de Publicación: Japonés (JA)

(30) Datos de Prioridad:
2004-163742 01 de junio de 2004 (01.06.2004) JP

(71) Solicitantes: TERUMO KABUSHIKI KAISHA [JP/JP]; 44-1, Hatagaya 2-chome, Shibuya-ku, Tokyo, 1510072 (JP) (todos excepto US). KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA [JP/JP]; 1-19, Higashi Shimbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo, 1058660 (JP) (todos excepto US), YOSHINO, Katsuke [JP/JP]; c/o Terumo Kabushiki Kaisha, 1500, Inokuchi, Nakai-machi, Ashgarakamigun, Kanagawa, 2590151 (JP) (únicamente US). NOZAWA, Shigenori [JP/JP] c/o Terumo Kabushiki Kaisha, 1500, Inokuchi, Nakai-machi, Ashgarakamigun, Kanagawa, 2590151 (JP) (únicamente US). ISOZAKI, Masashi [JP/JP]; c/o Terumo Kabushiki Kaisha, 1500, Inokuchi, Nakai-machi, Ashgarakamigun, Kanagawa, 2590151 (JP) (únicamente US). SAWADA, Seigo [JP/JP]; c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, 1-19, Higashi Shimbashi 1-chome, Minato-Ku, Tokyo, 1058660 (JP) (únicamente US). KATO, Ikuo [JP/JP]; c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, 1-19, Higashi Shimbashi 1-chome, Minato-Ku, Tokyo, 1058660 (JP) (únicamente US). MATSUZAKI, Takeshi [JP/JP]; c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, 1-19, Higashi Shimbashi 1-chome, Minato-Ku, Tokyo, 1058660 (JP) (únicamente US).

(72) Inventores: YOSHINO, Katsuke [JP/JP]; c/o Terumo Kabushiki Kaisha, 1500, Inokuchi, Nakai-machi, Ashgarakamigun, Kanagawa, 2590151 (JP). NOZAWA, Shigenori [JP/JP] c/o Terumo Kabushiki Kaisha, 1500, Inokuchi, Nakai-machi, Ashgarakamigun, Kanagawa, 2590151 (JP). ISOZAKI, Masashi [JP/JP]; c/o Terumo Kabushiki Kaisha, 1500, Inokuchi,

(54) Título: FORMULACIÓN DE IRINOTECAN

(57) Resumen: Una preparación de Irinotecan que tiene Irinotecan y/o una sal del mismo altamente portado por un portador vesicular cerrado, que muestra una retención notablemente prolongada en la sangre, como se comparó con aquella de las preparaciones de liposoma de Irinotecan convencionales y es capaz de estar presente en la sangre durante un periodo de tiempo prolongado. Se proporciona una preparación de Irinotecan que comprende vesículas cerradas formadas de una membrana de lípido en donde el Irinotecan y/o una sal del mismo se sellan en una concentración de al menos 0.07 mol/mol (mol de medicina/mol de lípidos totales de la membrana). La preparación de Irinotecan preferiblemente tiene un gradiente iónico entre una fase acuosa interna y una fase acuosa externa dentro de las vesículas cerradas. Las vesículas cerradas son preferiblemente liposomas, y los liposomas preferiblemente tienen sólo la superficie externa del mismo modificado con un modificador de superficie que contiene un polímero hidrofílico.

Nakai-machi, Ashgarakamigun, Kanagawa, 2590151 (JP). SAWADA, Seigo [JP/JP]; c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, 1-19, Higashi Shimbashi 1-chome, Minato-Ku, Tokyo, 1058660 (JP). KATO, Ikuo [JP/JP]; c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, 1-19, Higashi Shimbashi 1-chome, Minato-Ku, Tokyo, 1058660 (JP). MATSUZAKI, Takeshi [JP/JP]; c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, 1-19, Higashi Shimbashi 1-chome, Minato-Ku, Tokyo, 1058660 (JP).

(74) Agente: WATANABE, Mochitoshi; Hayakawa-tonakai Bldg. 3F, 12-5, Iwamoto-cho 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1010032 (US).

(81) Estados Designados (a menos que se indique de otra manera para cada clase de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que se indique de otra manera para cada clase de protección regional disponible): Organización de Propiedad Intelectual Regional Africana (ARIPO) (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Organización de Patente Euroasiática (EAPO) (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Oficina de Patente Europea (EPO) (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Organización de Propiedad Intelectual Africana (OAPI) (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada
- Sin el reporte de búsqueda internacional y para ser republicado después de la recepción de este reporte.

Para los códigos de dos letras, y otras abreviaciones, referidas de la "Guidance Notes on codes and Abbreviations" aparecen al comienzo de cada edición regular de la Gaceta PCT

WO 2005/117878 A1

FORMULACIÓN DE IRINOTECAN

Campo Técnico

La presente invención se refiere a una formulación
5 de irinotecan que incluye un portador vesicular cerrado que
incorpora irinotecan y/o una sal del mismo en una
concentración elevada, y a una composición farmacéutica que
lo contiene.

10 Antecedentes de la Técnica

Una categoría de productos farmacéuticos para ser
empleados para el tratamiento del cáncer es un inhibidor de
topoisomerada, y ejemplos del mismo incluyen camptotecina.
La camptotecina es un penta alcaloide cíclico, que ha sido
15 extraído y aislado de Camptotheca acuminata (una planta de
China) por Wall et. Al. (USA) in 1966 (adm. Chem. Soc., 94
(1966), 388), y del cual se descubrió que tenía una elevada
actividad antineoplásica y una amplio espectro
antineoplásico. Un agente de quimioterapia de cáncer
20 convencional ejercen una actividad antineoplásica mediante la
inhibición de topoisomerasa II, mientras que la camptotecina
inhibe una función enzimática de la topoisomerasa que cumple
una función entre la replicación del ADN, en la reparación,
en la recombinación y en la transcripción mediante la
25 inhibición de la topoisomerasa I.

La camptotecina plantea algunos problemas en el uso como fármaco. Entre ellos, con respecto a la insolubilidad en agua, se han propuesto algunos análogos de camptotecina solubles en agua, cada uno de ellos mejorado en términos de insolubilidad (JP 03-4077 B). En particular, el clorhidrato de irinotecan (CPT-11), que es un derivado de camptotecina soluble en agua y que ha sido presentado en el mercado en 1994 en Japón, es un profármaco y ejerce una elevada actividad antineoplásica, por lo cual era sumamente esperado en los campos clínicos. Después de la administración, el clorhidrato de irinotecan, que es un profármaco se metaboliza en SN-38 que es un metabolito activo, y ejerce una actividad antineoplásica.

Sin embargo, cuando se administra irinotecan y una sal del mismo, se producen graves efectos secundarios tales como disfunción de la médula ósea y trastornos gastrointestinales. Por lo tanto, el uso del mismo está severamente restringido. Además, existe el problema en el sentido de que disminuye la actividad antineoplásica por hidrólisis de un anillo α -hidroxilactona debido a la sensibilidad en un ambiente acuoso, que es único para la camptotecina y un análogo del mismo.

Para resolver los problemas anteriores y llevar a cabo un óptimo tratamiento del cáncer usando un análogo de camptotecina como antimetabolito específico del ciclo

celular, es necesario mantener la concentración del fármaco por un largo período de tiempo. Sin embargo, existe el hecho de que dicho fármaco tiene una vida media tan corta como varias horas después de administración intravenosa o administración subcutánea. El fármaco es útil como agente de control de liberación que puede usarse para liberar un agente farmacéutico que tiene una concentración terapéutica. Una modalidad para resolver estos problemas, libertar un análogo de camptotecina estable y eficazmente a un sitio objetivo con una lesión, y ejercer una actividad antineoplásica en un sitio objetivo con una lesión, es el que incorpora el fármaco a un portador que tiene una forma de vesícula cerrada. Algunas propuestas sobre la formulación de un liposoma, incluyendo camptotecina, han sido ya formuladas. Por ejemplo, se ha informado que cuando se incluye camptotecina en una membrana de liposoma, se suprime la hidrólisis de un anillo de α -hidroxilactona (JP 9-504517 A; Tomas G. Burke et al., Biochemistry, 32 (1993), 5352-5364). Además, se ha descrito un método para conseguir que una membrana de liposoma contenga al SN-38 mismo, que es un cuerpo principal activo de clorhidrato de irinotecan (W.Gao et al. J. of Chromatography B, 791 (2003), 85-92; Joshua Williams et al., J. of Controlled Release, 91 (2003), 167-172. Sin embargo, el SN-38 es difícil de estabilizar en una membrana de liposoma y desaparece rápidamente en la sangre, de modo que es difícil

mantener la concentración de S-38 en el plasma por un periodo de tiempo prolongado.

Se ha informado también un ejemplo de manufactura basado en un método habitual en el cual el clorhidrato de irinotecan (un derivado soluble en agua) queda encerrado en un liposoma por el método de carga pasiva, y es estabilizado fijándolo en la membrana de bicapa de lípidos, electrostáticamente

Documento de Patente 1: JP 3-4077 B

10 Documento de Patente 2 JP 9-504517 A

Documento de No-Patente 1: Am.Chem.Soc., 97(1996), 388

Documento de No-Patente 2: Tomas G. Burke et al., Biochemistry, 32 (1993), 5352-5364

15 Documento de No-Patente 3: W. Gao et al., J. of Chromatography B, 791 (2003) 85-92

Documento de No-Patente 4: Joshua Williams et al., J. of Controlled Release, 91 (2003), 167-172

20 Documento de No-Patente 5: Yasuyuki Sazuka et al. Cancer Letter 127 (1998), 99-106

Descripción de la Invención

Problemas que deben ser Resueltos por la Invención

La cantidad de clorhidrato de irinotecan que se incorpore en una liposoma de acuerdo con el método descrito anteriormente de encapsulación de clorhidrato de irinotecan

25

el método de carga pasiva que ha sido ya manifestado, es de aproximadamente 0.05 (fármaco (mol)/lípidos total (mol)). Con dicha cantidad incorporada, la concentración de clorhidrato de irinotecan en el plasma y la concentración de SN-38 que es un metabolito activo del mismo, son apenas mantenidos por un tiempo prolongado, y dichas cantidades no son suficientes para los efectos clínicos. Aunque la capacidad de retención del clorhidrato de irinotecan en la sangre mejora mediante la formación de liposomas, la concentración de SN-38 que es un metabolito activo en el plasma se mantiene apenas por un tiempo prolongado, debido a que la velocidad de desaparición desde la sangre es todavía rápida.

No se ha informado todavía sobre una formulación que contenga una cantidad para encapsulación clínicamente apropiada/suficiente de irinotecan (un profármaco) y/o una sal del mismo en una vesícula cerrada, y que existe en la sangre en un estado de hidrólisis suprimida de un anillo de α -hidroxilactona por un período de tiempo prolongado, para mantener la concentración de SN-38 que es un metabolito activo en el plasma, con el fin de mantener la concentración de SN-38 que es un metabolito activo de clorhidrato de irinotecan en el plasma por un tiempo prolongado.

En vista de tales circunstancias, un objeto de la presente invención es el de proveer, como formulación que tiene una cantidad de encapsulación de fármacos suficientes

para efectos clínicos, una formulación de irinotecan capaz de contener irinotecan y/o una sal del mismo en una vesícula cerrada en una elevada eficiencia de encapsulación de por lo menos 0.07 (fármaco (mol)/lípidos total (mol)) y de mantener la concentración de SN-38 que es un metabolito activo del clorhidrato de irinotecan en el plasma por un periodo de tiempo prolongado.

Medios para Resolver los Problemas

En la presente invención se han llevado a cabo extensos estudios para alcanzar los objetivos antes descritos. Como resultado, se han efectuado los siguientes descubrimientos: cuando el método de carga remota basado en un gradiente iónico está particularmente seleccionado como método de encapsulación de fármacos para irinotecan y/o una sal del mismo en una vesícula cerrada (se forma un gradiente iónico en el interior/exterior, de la vesícula cerrada, y el fármaco se deja penetrar a través de la membrana de la vesícula cerrada para introducir el fármaco), el fármaco puede ser encapsulado a una concentración elevada, que rara vez se logra con el método de carga pasiva convencional, y la capacidad de retención en la sangre mejora drásticamente en comparación con un liposoma, preparado con un método convencional, con el resultado de que la concentración de 7-etil-10-hidroxi camptotecina (SN-38) (que es un metabolito

activo del clorhidrato de irinotecan) en el plasma, puede mantenerse constante por un período de tiempo prolongado. Sin embargo, se hicieron los siguientes descubrimientos: cuando se selecciona el método de carga remota, la estabilidad de la formulación a 37°C y la estabilidad de la formulación a largo término a 4°C, puede mejorar enormemente. Por lo tanto, se ha confirmado que puede obtenerse una formulación que incluya una vesícula cerrada en la cual este encerrado irinotecan con una eficiencia de encapsulación de 0.07 (fármaco (mol)/lípidos totales (mol)), que es una cantidad de encapsulación de fármacos suficientes para un efectos clínico. No se ha informado sobre una formulación que incluya una vesícula cerrada en la cual el irinotecan y/o una sal del mismo esté encerrada a dicha concentración y que pueda mantener la concentración de SN-38 (que es un metabolito activo del clorhidrato de irinotecan) en el plasma, por un período de tiempo prolongado. Por consiguiente, para lograr los objetivos antes descritos, la presente invención provee lo siguiente.

(1) Una formulación de irinotecan que incluye una vesícula cerrada formada por una membrana lipídica, en la cual el irinotecan y/o un sal del mismo está encerrada en una concentración de por lo menos 0.07 mol/mol (mol de fármaco/mol de lípido total de la membrana).

En un aspecto preferible, una formulación de

irinotecan incorpora el fármaco en una concentración más elevada que por lo menos 0.1 mol de fármaco/mol de lípido.

El tamaño de partícula promedio de una formulación de irinotecan de la presente invención es preferiblemente de 5 0.02 a 250 μm .

En la presente invención, el irinotecan y/o una sal del mismo, pueden encapsularse en una vesícula cerrada en una concentración elevada mediante por ejemplo el siguiente método de carga remota usando un gradiente iónico.

10 (2) La formulación de irinotecan de acuerdo con el artículo (1), donde la formulación de irinotecan tiene un gradiente iónico entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa de la vesícula cerrada. Mediante el uso del gradiente iónico descrito, el irinotecan y/o una sal del 15 mismo puede incorporarse a la vesícula cerrada en un estado de ionización en la concentración

(3) La formulación de irinotecan de acuerdo con el ítem (2), donde el gradiente iónico es un gradiente de concentración protónica que tiene un gradiente de pH donde el 20 valor de pH de la fase acuosa interna es inferior a un valor de pH de la fase acuosa externa.

(4) La formulación de irinotecan de acuerdo con el ítem (3), donde el gradiente de pH se forma mediante un gradiente de concentración de un ión amonio y/o un gradiente 25 de concentración de un compuesto orgánico que tiene un grupo

amino capaz de ser protonado. Por ejemplo, en el caso en el cual la concentración de ión amonio en la fase acuosa interna es más elevada que la de la fase acuosa externa, puede formarse un gradiente de pH en el cual el valor de pH de la
5 fase acuosa interna es inferior al valor de pH de la fase acuosa externa.

(5) La formulación de irinotecan de acuerdo con cualquiera de los ítems (1) a (4), donde la vesícula cerrada es un liposoma formado por una membrana de una capa de
10 lípidos que contiene un fosfolípido como componente de membrana principal.

En el ítem (5) anterior, preferiblemente es un aspecto en el que el componente de membrana principal es un fosfolípido que tiene una temperatura de transición de fase
15 de 50°C o mas.

Ejemplos específicos preferibles del fosfolípido incluyen un fosfolípido hidrogenado y/o un esfingofosfolípido.

(6) El liposoma puede contener adicionalmente un
20 lípido distinto del fosfolípido y/o un agente modificador de superficie.

Como el otro lípido, es preferible colesterol.

Los ejemplos preferibles del agente modificador de superficie incluyen un derivado polimérico hidrofílico.
25 Ejemplos específicos del polímero hidrofílico incluyen un

polietilenglicol que tiene un peso molecular de 500 a 10,000 daltons, que puede ser introducido como fosfolípido o derivado colesterol.

(7) La formulación de irinotecan de acuerdo con el
5 ítem (6), donde únicamente la superficie extrema del liposoma está preferiblemente modificada con un polímero hidrofílico en un aspecto en el cual el derivado polimérico hidrofílico está contenido como agente modificador de superficie.

(8) Un aspecto en el cual la formulación de
10 irinotecan de acuerdo con el ítem (6) o (7) contiene un compuesto que tiene un grupo funcional básico como agente modificador de superficie, también es preferible.

Ejemplos particularmente preferibles del compuesto que tienen un grupo funcional básico incluyen sal de
15 clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina.

(9) Una composición farmacéutica que incluye la formulación de irinotecan de acuerdo con cualquiera de los ítems (1) a (8).

(10) Un método profiláctico y/o terapéutico de una
20 enfermedad, que incluye administrar una cantidad profiláctica y/o terapéuticamente eficaz de la formulación de irinotecan de acuerdo con cualquiera de los ítems (1) a (8) a un huésped.

(11) Un método para liberar una cantidad eficaz de
25 irinotecan y/o una sal del mismo en un huésped, que incluye

administrar la formulación de irinotecan de acuerdo con uno cualquiera de los ítems (1) a (8) al huésped.

(12) Un método para exponer una cantidad eficaz de irinotecan y/o una sal del mismo a un sitio objetivo, que
5 incluye administrar la formulación de irinotecan de acuerdo con cualquiera de los ítems (1) a (8) al huésped.

Efectos de la Invención

Una formulación de irinotecan para ser provista en
10 la presente invención comprende irinotecan y/o una sal del mismo en una cantidad encapsulada de por lo menos 0.07 (fármaco (mol)/lípidos totales (mol)) e incluye el fármaco en una concentración elevada suficiente para un efecto clínico. Tal como se describió en los ejemplos siguientes, una
15 formulación de irinotecan de la presente invención mejora drásticamente a la capacidad de retención en la sangre, en comparación con una formulación de liposoma de irinotecan convencionalmente conocida, de manera que puede existir en la sangre por un período de tiempo prolongado. Además, la
20 formulación tiene una estabilidad de formulación drásticamente mejorada a 37°C y una estabilidad de formulación a largo término a 4°C.

Breve Descripción de los Dibujos

25 [Figura 1] Esta es una gráfica que muestra los

resultados (régimen de liberación) de un ensayo de estabilidad acelerada de la formulación a 37°C para la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 1.

[Figura 2] Esta es una gráfica que muestra los
5 resultados (régimen de liberación) de un ensayo de estabilidad acelerada de la formulación a 37°C para la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 3.

[Figura 3] Esta es una gráfica que muestra los
resultados (tamaño de partícula) de un ensayo de estabilidad
10 acelerada de la formulación a 37°C para la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 3.

[Figura 4] Esta es una gráfica que muestra las
concentraciones de clorhidrato de irinotecan en el plasma en
cada tiempo de extracción de sangre después de inyección en
15 un ensayo sobre la capacidad de retención en la sangre.

[Figura 5] Esta es una gráfica que muestra la
relación entre el valor de pH de una fase acuosa externa y la
eficiencia de encapsulación de CPT-11 (%) o la relación
existente en la forma circular abierta (%).

20 [Figura 6] Esta es una gráfica que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 8 de la presente invención mediante el cambio del volumen presunto del tumor a lo largo del tiempo.

[Figura 7] Esta es una gráfica que muestra el
25 efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 preparada en

el Ejemplo 8 de la presente invención mediante el cambio de peso corporal del ratón.

[Figura 8] Esta es una gráfica que muestra la transición de la concentración total de CPT-11 en el plasma de la sangre en un experimento farmacocinético en el Ejemplo 8.

[Figura 9] Esta es una gráfica que muestra la transición de la concentración de CPT-11 liberado por liposomas en el plasma de la sangre en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 8.

[Figura 10] Esta es una gráfica que muestra la transición de la concentración de SN-38 en el plasma de la sangre en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 8.

[Figura 11] Esta es una gráfica que muestra la transición de la concentración de SN-38G en el plasma de la sangre en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 8.

[Figura 12] Esta es una gráfica que muestra la hemotoxicidad (linfocitos) de la preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 8.

[Figura 13] Esta es una gráfica que muestra la hemotoxicidad (neutrófilos) de la preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 8.

[Figura 14] Esta es una gráfica que muestra el

efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 9 mediante el cambio del volumen presunto del tumor a lo largo del tiempo.

[Figura 15] Esta es una gráfica que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 9 mediante el cambio de peso corporal del ratón.

[Figura 16] Esta es una gráfica que muestra a la transición de la concentración total de CPT-11 en el plasma de la sangre en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 9.

[Figura 17] Esta es una gráfica que muestra la transición de la concentración de CPT-11 liberado por liposomas en el plasma de la sangre en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 9.

[Figura 18] Esta es una gráfica que muestra la transición de la concentración de SN-38 en el plasma de la sangre en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 9.

[Figura 19] Esta es una gráfica que muestra la transición de la concentración de SN-38G en el plasma de la sangre en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 9.

[Figura 20] Esta es una gráfica que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 mediante el cambio del volumen presunto del tumor a lo largo del tiempo

en el Ejemplo 10.

[Figura 21] - Esta es una gráfica que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 mediante el cambio de peso corporal del ratón en el Ejemplo 10.

5 [Figura 22] - Esta es una gráfica que muestra la transición de la concentración de CPT-11 en el plasma de la sangre en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 10.

10 [Figura 23] - Esta es una gráfica que muestra la transición de la concentración de SN-38 en el plasma de la sangre en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 10.

15 [Figura 24] Esta es una gráfica que muestra la transición de la concentración de SN-38G en el plasma de la sangre en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 10.

20 [Figura 25] Esta es una gráfica que muestra la transición de la concentración de CPT-11 en tumores en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 10.

[Figura 26] Esta es una gráfica que muestra la transición de la concentración de SN-38 en tumores en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 10.

25 [Figura 27] - Esta es una gráfica que muestra la

transición de la concentración de SN-38G en tumores en un experimento farmacocinético de la preparación de CPT-11 en el Ejemplo 10.

[Figura 28] Esta es una gráfica que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 mediante el cambio del volumen presunto del tumor a lo largo del tiempo en el Ejemplo 12.

[Figura 29] Esta es una gráfica que muestra el efecto antitumoral de la preparación de CPT-11 mediante el cambio de peso corporal del ratón en el Ejemplo 12.

Mejor Modo de Llevar a Cabo la Invención

A continuación, la presente invención se describirá en forma más detallada.

El irinotecan es un compuesto que tiene un esqueleto de camptotecina y está representado por el nombre químico de (+)-(4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4-piperidino-piperidino)carboniloxi]-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,14(4H, 12H)-diona. El irinotecan y/o una sal del mismo es un agente antineoplásico y es una sustancia soluble en agua usada como sal de clorhidrato (irinotecan·HCl clorhidrato) tal como se muestra a continuación. En la presente memoria, el término "irinotecan y/o una sal del mismo" se menciona algunas veces como "irinotecan" o "fármaco". Aunque, el término "sal de clorhidrato de

irinotecan" de

irinotecan" · HCl · 3H₂O

[E

Chemical structure of irinotecan hydrochloride trihydrate. The structure shows a 1,4-bis(piperidin-1-yl)piperidine moiety linked via an ester bond to the 4-position of a 2,4-dihydroquinolin-3(1H)-one. The quinoline ring has an ethyl group at position 2 and a hydroxyl group at position 3. The lactone ring of the quinolinone has an ethyl group and a hydroxyl group at the 1-position. The hydroxyl group at position 3 is shown with a dashed bond to the ethyl group, indicating a specific stereochemistry. The entire molecule is shown as a hydrochloride salt with three water molecules of hydration.

5 La presente invención provee una formulación de irinotecan que incluye una vesícula (portador) cerrada, formada por una membrana de lípido, donde el irinotecan y/o una sal del mismo antes descritos están encerrados con una elevada eficiencia de encapsulación de 0.07 mol/mol (de 10 fármaco mol/de lípido total de la membrana) o más.

La vesícula cerrada no está particularmente limitada y puede tener varias formas con la condición de que tenga una estructura capaz de contener un fármaco. Puede emplearse un liposoma, una microesfera lípida, una
15 monopartícula o similares, que tengan una función potencial capaz de encapsular el fármaco en la misma en una concentración elevada. Entre éstos, un ejemplo de una forma particularmente preferida es el liposoma.

A continuación, se efectuará una descripción
20 tomando como ejemplo un aspecto en el cual un portador de una
formulación de irinotecan de la presente invención es un
liposoma particularmente preferido.

Un liposoma está compuesto por una membrana de una bicapa de fosfolípidos y es una vesícula cerrada que tiene una estructura que forma un espacio separado del área externa

a través de la membrana que se forma en base a caracteres polares de grupos hidrofóbicos y grupo hidrofílicos del lípido, y una fase acuosa (fase acuosa interna) incluida en el espacio de la vesícula. Se forma una formulación de liposoma usando el liposoma que incorpora una droga como un portador.

El "fosfolípido" es un componente principal de una biomembrana y es una sustancia anfipática, y la molécula tiene un grupo hidrofóbico compuesto por un grupo alquilo de cadena larga y un grupo hidrofílico compuesto por un grupo fosfato. Ejemplos del fosfolípido incluyen fosfatidilcolina (=lecitina), fosfatidilglicerol ácido fosfatídico, fosfatidil etanolamina, fosfatidilcerina, fosfatidilinositol, y un esfingofosfolípido tal como esfingomielina, un fosfolípido natural o sintético tal como una cardiolipina o un derivado de los mismos y un compuesto que ha sido hidrogenado de acuerdo con un método convencional. A continuación el término "fosfolípido" se denominará algunas veces fosfolípidos para abarcar los mismos.

Entre aquellos se prefiere un fosfolípido hidrogenado tal como fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), esfingomielina (SM), y similares.

Como componente de membrana principal, puede contener una especie única de fosfolípido o varias especies de fosfolípidos.

En un liposoma, se usa preferiblemente como componente principal de membrana un fosfolípido que tenga una temperatura de transición de fase más elevada que la temperatura del cuerpo (35 a 37°C), para que no pierda
5 fácilmente un fármaco encapsulado durante un período de almacenamiento, o en un cuerpo tal como sangre. Además, en el caso de manufacturar dicho liposoma, este es algunas veces expuesto a una temperatura más elevada que la temperatura del cuerpo. Es decir, el liposoma se manufactura algunas veces
10 bajo una condición de temperatura de aproximadamente 50 a 70°C, por ejemplo aproximadamente 60°C, y el efecto del calor sobre la formación del liposoma aumenta, de manera que preferiblemente se usará un componente principal de membrana que tenga una temperatura de transición de fase más elevada
15 que aquellas temperaturas.

Específicamente, el material de membrana principal es preferiblemente un fosfolípido que tiene un punto de transición de fase de 50°C o más.

El liposoma puede contener otro componente de la
20 membrana conjuntamente con el componente principal de membrana antes descrito. Por ejemplo, se prefiere que un liposoma contenga un lípido distinto de un fosfolípido o un derivado del mismo (a continuación, denominado algunas veces otros lípidos), y que la membrana se forme de un lípido mixto
25 conjuntamente con el fosfolípido antes descrito.

El término "lípidos distintos de un fosfolípido" significa un lípido que tiene un grupo hidrofóbico compuesto por un grupo alquilo de cadena larga o similares en su molécula y que no contenga ningún grupo fosfato en su molécula. Ejemplos del mismo incluyen, pero no están particularmente limitados a, glicéroglicolípidos, esfingoglicolípidos, y esteroides tales como colesterol (descrito a continuación como un agente estabilizador), y un derivado del mismo tal como un producto hidrogenado. Ejemplos del derivado de colesterol incluyen esteroides donde cada uno tiene un anillo ciclopentanohidrofenantreno, y entre los ejemplos específicos del mismo se incluyen, pero no están particularmente limitados a, colesterol.

El lípido mixto puede contener una especie sola o varias especies de los otros lípidos.

La velocidad de liberación de la formulación de irinotecan en el plasma puede regularse mediante la cantidad de colesterol. Para disminuir la velocidad de liberación a un nivel bajo, la formulación contiene colesterol en una proporción de 0 a 21% mientras que para aumentar la velocidad de liberación a un nivel alto, la formulación contiene colesterol en una proporción de 30 a 50 % en moles preferiblemente 40 a 50 % en moles.

Un liposoma en la presente invención puede mantener la estructura de membrana anteriormente descrita junto con el

lípidos formadores de membrana antes descritos y puede contener otros componentes de membrana capaces de ser contenidos en el liposoma sin apartarse de los objetos de la presente invención. Ejemplos de los otros componentes de membrana incluyen un agente modificador de superficie para proveer una característica propuesta para un componente de membrana portadora mediante el cambio de una propiedad física del lípido. Ejemplos del agente modificador de superficie incluyen, pero no están particularmente limitados a, una sustancia cargada como un derivado de un polímero hidrofílico, un derivado de un polisacárido soluble en agua y similares.

Ejemplos de las sustancias cargadas incluyen, pero no están particularmente limitadas a, un compuesto que tiene un grupo funcional básico tal como un grupo amino, un grupo amidinio o un grupo guanidino; un compuesto que tiene un grupo funcional ácido; y similares.

Ejemplos del compuesto básico incluyen DOTMA descrito en JP 61-161246 A, un DOTAP descrito en JP 05-508626 A, un transfectam descrito en JP 02-292246 A, TMAG descrito en JP 04-108391 A, sal de clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina descrito en la WO 97/42166, y similares, DOSPA, TfxTM-50, DDAB, DC-CHOL, y DMRIE.

Ejemplos del compuesto que tiene el grupo funcional ácido incluyen: un ácido graso tal como un ácido oleico;

ácido esteárico; gangliosidas que tienen un ácido siálico tal como gangliosida GM1 y gangliosida GM3; un surfactante ácido a base de amino ácido tal como N-acil-L glutamina, y similares.

5 En el caso de que la sustancia cargada antes descrita sea una sustancia que incluye un compuesto que tiene un grupo funcional básico unido a un lípido, se denominará un lípido cationizado. La porción lípida del lípido cationizado es estabilizada en una bicapa de lípidos de un liposoma, y la
10 porción del grupo funcional básico puede existir sobre la superficie de la membrana de la bicapa del lípido del portador (en la superficie externa de la membrana y/o en la superficie interna de la membrana). La modificación de la membrana con un lípido cationizado permite mejorar la
15 capacidad de adhesión o similares entre la membrana de liposomas y las células.

 Ejemplos de polisacáridos solubles en agua incluyen pero están particularmente limitados a polisacáridos solubles en agua tales como ácido glucorónico, ácido siálico,
20 dextrano, pululan, amilosa, amilpectina, quitosan, manan, ciclodextrina, pectina, y carragenina. Un ejemplo de un derivado polisacárido soluble en agua incluye un glicolípido o similares.

 Ejemplos de polímeros hidrofílicos incluyen pero no
25 están particularmente limitados a polietilenglicol, Ficoll,

alcohol polivinílico, un copolímero alternado de estirena-anhídrido maleico, un copolímero alternado de éter-anhídrido maleico, polivinil pirrolidona, éter polivinil metílico, polivinil metil oxazolína, polietil oxazolína,
5 polihidroxipropil oxazolína, polihidroxipropil metacrilamida, polidimetil acrilamida, metacrilato de polihidroxipropilo, acrilato de polihidroxietilo, hidroximetil celulosa, hidroxietil celulosa, poliasparto amida, y poliamino ácido sintético.

10 El polímero hidrofílico preferiblemente tiene una estructura para modificar un liposoma. En particular, un extremo de la cadena polimérica tiene preferiblemente la estructura. Es decir, se prefiere que el polímero hidrofílico que se usa para la modificación, incluya una porción de
15 cuerpo principal del polímero hidrofílico y una porción estructural para modificar un liposoma. En caso de que la estructura sea una porción hidrofóbica tal como un lípido, la porción de cuerpo principal del polímero hidrofílico se fija de manera de proyectarse desde la superficie externa del
20 liposoma de modo que la porción hidrofóbica quede insertada en la membrana del liposoma, mientras que en el caso en el que la estructura sea un grupo funcional reactivo capaz de unirse covalentemente a un componente de membrana del liposoma, la porción del cuerpo principal del polímero
25 hidrofílico se fija de manera que se proyecte desde la

superficie externa del liposoma mediante un enlace covalente a un componente de la membrana de liposomas tal como un fosfolípido expuesto en la superficie externa del liposoma.

A continuación, se describirá un compuesto
5 hidrofóbico para usarlo en la formación de un compuesto polimérico hidrofóbico de polímero hidrofílico, mediante un enlace a una porción de cuerpo principal de un polímero hidrofílico.

El compuesto hidrofóbico no está particularmente
10 limitado. Ejemplos del mismo incluyen un compuesto que tiene una región hidrofóbica (compuesto hidrofóbico). Ejemplos del compuesto hidrofóbico incluyen: un fosfolípido y otro lípido tal como un esteroide que forman un lípido mixto descrito a continuación; un alcohol alifático de cadena larga; un éster
15 de ácido graso de glicerina; y similares. Entre éstos, un fosfolípido es un aspecto preferible. Además, el compuesto hidrofóbico puede tener un grupo funcional reactivo. Un enlace formado mediante el grupo funcional reactivo es convenientemente un enlace covalente, y un ejemplo específico
20 del mismo incluye pero no está particularmente limitado a un enlace amida, un enlace éster, un enlace éter, un enlace sulfuro o un enlace disulfuro.

Una cadena de acilo incluida en el fosfolípido es conveniente un ácido graso saturado. La longitud de cadena de
25 la cadena acilo es convenientemente C_{14} a C_{20} , más

convenientemente C_{16} a C_{18} . Ejemplos de la cadena acilo incluyen dipalmitoílo, diestearoílo y palmitoilestearoílo.

Un fosfolípido no está particularmente limitado. Por ejemplo, como fosfolípido, puede usarse uno que tenga un
5 grupo funcional capaz de reaccionar con el polímero hidrofílico. Ejemplos específicos de dichos fosfolípidos que tienen un grupo funcional capaz de reaccionar con un polímero hidrofílico incluyen fosfatidil etanolamina que tiene grupos amino, fosfatidilglicerol que tiene grupos hidroxil y
10 fosfatidilserina que tiene grupos carboxil. Es un aspecto preferible usar la fosfatidil etanolamina antes descrita.

Un derivado polímero hidrofílico-lípido está compuesto por el polímero hidrofílico y el lípido antes descritos. La combinación del polímero hidrofílico y el
15 lípido antes descritos no están particularmente limitada. Dependiendo del propósito, puede emplearse una combinación apropiada. Ejemplos de la misma incluyen un derivado polimérico hidrofílico formado por la unión de por lo menos un miembro seleccionado de un fosfolípido, otros lípidos
20 tales como esteroles, alcohol alifático de cadena larga, y éster de ácido graso de glicerina, con por lo menos un miembro seleccionado de PEG, PG y PPG. Ejemplos específicos del mismo incluyen un polioxipropileno alquilo, en particular, es un aspecto preferible que en el caso en el que
25 el polímero hidrofílico es polietilenglicol (PEG), se

seleccione un fosfolípido o un colesterol como lípido. Ejemplos de un derivado PEG-lípido formado por dicha combinación incluyen un derivado PEG-fosfolípido o un derivado PEG-colesterol.

5 Para el derivado polímero hidrofílico-lípido, puede seleccionarse un derivado cargado positivamente, negativamente o neutralmente, mediante la selección del lípido. Por ejemplo, en el caso en el cual DSPE es seleccionado como lípido, el derivado lípido exhibe una carga
10 negativa mediante el efecto de los grupos fosfato, mientras que en el caso en el que el colesterol es seleccionado como lípido, el derivado lípido exhibe una carga neutra. El lípido puede seleccionarse dependiendo del propósito.

 El peso molecular de PEG no está particularmente
15 limitado. En general el peso molecular de PEG es de 500 a 10.000 daltons preferiblemente 1.000 a 7.000 daltons, y más preferiblemente 2.000 a 5.000 daltons.

 El peso molecular de PG no está particularmente limitado. En general el peso molecular de PG es 100 a 10.000
20 daltons, preferiblemente 200 a 7.000 daltons, y más preferiblemente 400 a 5.000 daltons.

 El peso molecular de PPG no está particularmente limitado. En general el peso molecular de PPG es 100 a 10.000 daltons preferiblemente 200 a 7.000 daltons y más
25 preferiblemente 1.000 a 5.000 daltons.

Entre éstos, un aspecto preferible es un derivado PEG-fosfolípido. Ejemplos del derivado PEG-fosfolípido incluyen polietilenglicol-deasteroil-fosftidil etanolamina (PEG-DSPE). El PEG-DSPE es preferible debido a que es un
5 compuesto para propósitos generales y es fácilmente obtenible.

El polímero hidrofílico antes descrito puede usarse solo o pueden usarse dos o más de los polímeros en combinación.

10 Dicho derivado polímero hidrofílico-lípido puede manufacturarse mediante un método convencionalmente conocido. Ejemplos de un método para sintetizar un derivado PEG-fosfolípido que es un ejemplo del derivado polímero hidrofílico-lípido incluyen un método para la reacción de PEG
15 con un fosfolípido que tiene un grupo funcional capaz de reaccionar con PEG, usando un catalizador. Ejemplos del catalizador incluyen cloruro cianúrico, carbodiimida, anhídrido ácido y glutaraldehído. El grupo funcional antes descrito está unido covalentemente a PEG mediante dicha
20 reacción, para proporcionar de esta manera un derivado PEG-fosfolípido.

En un liposoma que ha sido sometido a una modificación de superficie mediante el uso de un derivado de polímero hidrofílico-lípido cuando se previene la absorción
25 de una proteína oxonina o similares en el plasma en la

superficie del liposoma, se mejora la estabilidad del liposoma en la sangre, puede evitarse la captura mediante RES, y puede mejorar la capacidad de liberación del fármaco a un tejido o célula que constituyen el objetivo de la liberación del fármaco.

La relación modificada de un lípido de membrana (lípido total) mediante el derivado polímero hidrofílico-lípido antes descrito, se efectúa de manera que el régimen al lípido de la membrana será de generalmente 0.1 a 20 % en moles, preferiblemente 0.1 a 5% en moles, más preferiblemente 0.5 a 5 % en moles.

Cabe observar que en la presente invención, el término "lípidos totales" significa los lípidos totales que forman una membrana, distintos del derivado polímero hidrofílico-lípido. Específicamente, se incluyen fosfolípidos y otros lípidos (incluyendo colesterol), se incluye adicionalmente un agente modificador de superficie en el caso en el que se incluye un agente modificador de superficie distinto del derivado polímero hidrofílico-lípido, pero no se incluye un fosfolípido tal como una fosfatidil etanolamina (PE) o colesterol, que están incluidos en el derivado polímero hidrofílico-lípido.

En la presente invención, la modificación de la membrana del liposoma mediante el derivado polímero hidrofílico-lípido (PEG-PE) antes descrito puede efectuarse

mediante la distribución de un polímero hidrofílico (PEG) tanto en el interior como en el exterior de la bicapa de membrana del lípido, o mediante distribución selectiva en la membrana exterior. Específicamente, en la preparación de una

5 formulación de liposoma descrita a continuación, el liposoma puede formarse después de mezclar un lípido formador de liposoma y PEG-PE uniformemente (pre-introducción). El PEG-PE puede introducirse después de formar el liposoma mediante un método convencional usando un lípido mixto obtenido por

10 mezcla de los lípidos formadores de liposomas que no contienen PEG-PE (post-introducción), pero es particularmente preferible un liposoma formado mediante la modificación selectiva de superficie de únicamente la capa externa de la membrana de bicapa de lípidos, por modificación de la

15 superficie de la membrana con un polímero hidrofílico desde la parte exterior después de formar un liposoma no modificado compuesto por la bicapa de lípidos (post-introducción). En este caso, cuando se usa un derivado polímero hidrofílico-lípido como agente modificador para introducir un polímero

20 hidrofílico, la porción polimérica hidrofílica se mantiene en un estado que se proyecta hacia la parte exterior, y la porción lipídica, que es una porción hidrofóbica, se mantiene en un estado estable mediante la entrada de la membrana de bicapa de lípidos del liposoma, de manera que puede formarse

25 un liposoma que tiene la superficie externa de la capa de la

bicapa de lípidos sobre la cual hay una unión de polímero hidrofílico al lípido y se distribuye.

Después de la etapa de formación de liposoma, ocurre una desestabilización tal como una agregación en el
5 liposoma que depende de la temperatura o del tiempo. Dicha desestabilización es diferente según la composición del lípido del liposoma, de modo que se sabe que la temperatura o el tiempo son diferentes de acuerdo a la composición del lípido. Para evitar la desestabilización que es diferente de
10 acuerdo con la composición del lípido, es conveniente establecer una etapa de modificación del polímero hidrofílico después de la etapa de formación del liposoma.

El momento de agregar un polímero hidrofílico en una etapa de adición de polímero hidrofílico, es
15 convenientemente cerca de inmediatamente después de la etapa de formación del liposoma. Específicamente, el tiempo está comprendido preferiblemente dentro de 180 minutos porque el efecto del calor sobre los componentes de la membrana o las sustancias encerradas es pequeño. El tiempo está
20 preferiblemente comprendido dentro los 120 minutos, más preferiblemente dentro de los 45 minutos, más convenientemente inmediatamente después de la etapa de formación del liposoma. Más específicamente, después de la etapa de formación del liposoma, el dispersante de liposoma
25 puede verse directamente a una solución polimérica

hidrofílica. Mientras tanto, puede adoptarse un método de adición de una solución polimérica hidrofílica al dispersante liposoma después de la etapa de formación del liposoma. Además puede adoptarse también un método para decantar el
5 dispersante liposoma y la solución polimérica hidrofílica simultáneamente en otro contenedor para la mezcla. En este caso, desde el punto de vista de la uniformidad de concentración y uniformidad de temperatura, es conveniente agregar una etapa de agitación mediante un dispositivo
10 agitador o similar.

Después de la adición de un polímero hidrofílico en una etapa de modificación del polímero hidrofílico, la mezcla se agita convenientemente con calentamiento por un período de tiempo predeterminado a una temperatura de transición de fase
15 o superior. El tiempo de la agitación con calentamiento es de 0 a 120 minutos, preferiblemente de 0 a 60 minutos, y más preferiblemente de 0 a 45 minutos.

Contrariamente a los métodos antes descritos, un liposoma que contiene un lípido formador de membrana tal como
20 un fosfolípido que tiene un grupo funcional reactivo es manufacturado por un método convencional, y luego se agrega un PEG de extremo activado al líquido externo del liposoma para unirlo a un lípido formador de membrana tal como un fosfolípido que tiene el grupo funcional para manufacturar de
25 esta manera un liposoma.

A diferencia de los métodos antes descritos, los componentes antes descritos se mezclan, y la mezcla se descarga a una presión elevada mediante un emulsionador de tipo de descarga de alta presión, para proporcionar un
5 liposoma. Este método ha sido específicamente descrito en "Liposome in Life Science" (Terada, Yoshimura, et al.; Springer-Verlag Tokio (1992)), que se incorpora aquí como referencia.

En el caso anteriormente descrito, para dimensionar
10 el liposoma hasta un tamaño predeterminado, se encuentran disponibles ciertas técnicas (editado por G. Gregoriadis "Liposome · Technology Liposome Preparation and Related Techniques" 2nd edición, Vol. I-III, CRC Press), que se incorpora aquí como referencia.

15 Como estructura de membrana de lípidos de un liposoma, se conocen estructuras de membrana tales como vesículas unilaminares (pequeña vesícula unilaminar (SUV) o vesículas unilaminares grandes (LUV)), capa de lípidos y una vesícula multilaminar (MLV) que incluye una pluralidad de
20 capas de lípidos.

Aunque un liposoma de acuerdo con la presente invención puede estar compuesto por cualquier estructura de membrana, preferiblemente es un liposoma compuesto por una vesícula unilaminar, y específicamente es preferible un
25 liposoma LUV.

Un dispersante liposoma puede formarse en una forma unilaminar haciéndolo pasar forzosamente a través de un filtro varias veces usando un extrusor. En general, se usan dos o más especies de filtros que tienen diferentes tamaños de poros (un filtro que tiene un tamaño de poro más grande que un tamaño de poro predeterminado y un filtro para obtener finalmente un tamaño de poro predeterminado). Cuantas más veces pasan por filtros que tienen diferentes tamaños de poros usando un extrusor, más alto será el régimen de formación unilaminar, de modo que el producto resultante se considerará como un liposoma prácticamente compuesto por una vesícula unilaminar. El liposoma prácticamente compuesto por una vesícula unilaminar específicamente significa un liposoma que tiene una vesícula unilaminar en la que el régimen de vesícula unilaminar para todos los portadores (vesículas) que forman la formulación de liposoma puede ser de 50% o más, preferiblemente 80% o más.

En el liposoma anteriormente descrito, las cadenas del polímero hidrofílico en su superficie externa están distribuidas hacia la parte exterior del liposoma, mientras que la superficie lateral a la fase acuosa interna de la capa interna de la bicapa de lípidos no está modificada, de modo que las cadenas del polímero hidrofílico no están sustancialmente distribuidas en la fase acuosa interna. En el caso de un liposoma que tiene la estructura de distribución,

la estabilidad de la membrana puede mantenerse en comparación con un liposoma que tiene los polímeros hidrofílicos distribuidos en ambos lados de las capas interna y externa de la membrana de bicapa incluso si el valor de pH de la fase acuosa interna es bajo. Además, puede obtenerse un efecto de estabilidad en la sangre incluso si la cantidad total de polímeros hidrofílicos es pequeña en comparación con un liposoma que tiene los polímeros distribuidos en ambos lados de las capas interna y externa de la membrana de bicapa.

10 Cabe observar que el término "capacidad de retención en la sangre" se refiere a una propiedad que significa que un fármaco encerrado en un portador está presente en la sangre. Cuando el fármaco es liberado del portador, desaparece rápidamente el fármaco de la sangre y
15 afecta un sitio expuesto al fármaco. Puede administrarse un fármaco que tiene excelente capacidad de retención en la sangre, a una dosis más pequeña.

 Un portador de la presente invención puede estar en forma de una esfera o en una forma similar. El tamaño de
20 partícula del mismo no está particularmente limitado pero es de 0.02 a 250 μm , preferiblemente de 0.03 a 0.4 μm , más preferiblemente de 0.05 a 0.2 μm . El diámetro exterior de la partícula es un valor promedio del diámetro de todas las partículas de una formulación de liposoma, que se determina
25 por el método dinámico de dispersión de luz. Específicamente,

la determinación puede llevarse a cabo usando Zetasizer (Malven Instruments 3000HS o S ZEM 5002).

Una formulación de irinotecan de la presente invención puede contener adicionalmente un estabilizador y/o
5 antioxidante farmacéuticamente aceptables dependiendo de su vía de administración. Ejemplos del estabilizador incluyen, pero no están particularmente limitados a, sacáridos tales como glicerol y sucrosa. Ejemplos del antioxidante incluyen, pero no están particularmente limitados a, ácido ascórbico,
10 ácido úrico, homólogos de tocoferol (por ejemplo, vitamina E) y similares. Existen cuatro isómeros de tocoferol (α , β , γ y δ), todos los cuales pueden usarse en la presente invención.

La formulación de irinotecan puede contener adicionalmente un aditivo farmacéuticamente aceptable
15 dependiendo de su vía de administración. Ejemplos del aditivo incluyen agua, solución salina fisiológica, solvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polímero carboxivinílico, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilato de sodio,
20 alginato de sodio, dextrano soluble en agua, almidón de sodio carboximetilo, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantano, goma acacia, caseína, gelatina, agar, diglicerina, propilenglicol, polietilenglicol, petrolato, parafina, alcohol esteárico, ácido esteárico, albúmina de suero humano
25 (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, PBS, un polímero

biodegradable, un medio libre de suero, un surfactante aceptable como aditivo farmacéutico, un buffer de pH fisiológico aceptable en un cuerpo vivo, o similares. El aditivo que se usa no está limitado, pero puede seleccionarse
5 entre los aditivos anteriormente descritos dependiendo de su forma de dosificación en forma apropiada o en combinación con otro aditivo.

En la presente invención, puede proveerse como composición farmacéutica una formulación de irinotecan que
10 contiene dichos aditivos. Una composición farmacéutica de la presente invención puede almacenarse mediante un método general, por ejemplo, en un refrigerador a una temperatura de 0 a 8°C o a temperatura ambiente de 1 a 30°C.

En la presente invención, un liposoma tiene una
15 forma que encierra CPT-11. Se sabe que un anillo de α -hidroxi lactona en el CPT-11 se hidrolizará a un rango de pH superior a la condición neutra. Por lo tanto, en el liposoma de la presente invención, la fase acuosa interna del liposoma es necesaria
20 para mantener un pH ácido para suprimir la hidrólisis del anillo α -hidroxi lactona independientemente de si se toma el CPT-11 en la bicapa de lípidos o en la fase acuosa interna.

Se sabe que generalmente un lípido se hidroliza dependiendo de la temperatura o el valor del pH. En
25 particular, se sabe que los carboxilatoésteres de ácido graso

en las posiciones sn-1 y sn-2 son fácilmente hidrolizadas y descompuestas hasta un lisolípido y un ácido graso (Grit et al., Chem. Phys. Lipids 64, 3-18, 1993). Dichos productos descompuestos alteran la composición convencional de la membrana del lípido, y aumenta la permeabilidad de la membrana del lípido, lo cual da como resultado un deterioro de la estabilidad del liposoma. Por lo tanto, cuando la fase acuosa interna se mantiene ácida, el pH en la fase acuosa externa es convenientemente aproximadamente neutral desde el punto de vista de la estabilidad del lípido.

Una situación en la que estas dos condiciones contrarias están más severamente restringidas es la etapa de introducción de un fármaco. En la etapa de introducción del fármaco, es necesario calentar la mezcla hasta por lo menos una temperatura de transición de fase de la membrana del lípido, que promueve significativamente la hidrólisis del lípido. Con el fin de suprimir la hidrólisis del lípido, es conveniente establecer el pH en la fase acuosa externa hasta aproximadamente neutralidad. Sin embargo, cuando el pH de la fase acuosa externa se fija hasta aproximadamente neutralidad, se promueve la hidrólisis de un anillo de α -hidroxi lactona en CPT-11. En vista de estas dos condiciones contrarias, el valor del pH en la fase acuosa externa en la etapa de introducción del fármaco, es preferiblemente de 4.0 a 8.0, más preferiblemente de 4.0 a 7.0, y más

preferiblemente de 5.0 a 7.0.

Para completar una formulación de irinotecan altamente incorporada de acuerdo con la presente invención, se forma un liposoma portador, y luego se lleva a cabo un
5 método denominado método de carga remota para introducir el fármaco usando un gradiente iónico interior/exterior de la membrana del liposoma. El método de carga remota puede usarse para un fármaco común capaz de existir en un estado de carga en el caso en el cual el fármaco se disuelve en un medio
10 acuoso apropiado. Cuando se forma un gradiente iónico interno/externo del liposoma, el fármaco puede encapsularse para penetrar la membrana del liposoma dependiendo del gradiente formado.

Ejemplos de un gradiente iónico formado a través de
15 la membrana del liposoma incluyen un gradiente de concentración de Na^+/K^+ . Una técnica para agregar un fármaco a un liposoma previamente formado mediante el método de carga remota para un gradiente de concentración de Na^+/K^+ se describe en la patente norteamericana 5.077.056 (que se
20 incorpora aquí como referencia), lo cual puede llevarse a cabo con referencia a la descripción.

En la presente invención, preferiblemente los ejemplos del gradiente iónico incluyen un gradiente de concentración de protones, y se ejemplifica un modo de un
25 gradiente de pH formado mediante el establecimiento del valor

de pH del interior de la membrana (fase acuosa interna) más bajo que el valor de pH de la parte externa de la membrana (fase acuosa externa). Específicamente, el gradiente de pH puede formarse en base a un gradiente de concentración de ión amonio y/o un gradiente de concentración de un compuesto orgánico que tiene un grupo amino capaz de ser protonado.

Un ejemplo específico de un método de encapsulación de un fármaco (irinotecan o una sal del mismo) en un liposoma usando el gradiente de concentración de ión amonio, se describirá a continuación. En primer lugar, se forma previamente un liposoma en un buffer acuoso que contiene 0.1 a 0.3 M de una sal de amonio, y se intercambia el medio externo por un medio que no contiene iones amonio (por ejemplo, una solución de sucrosa), para formar de este modo un gradiente de ión amonio en el interior/exterior de la membrana del liposoma. Los iones amonio interiores están equilibrados con amoníaco y protones, y el amoníaco penetra la membrana del lípido y se dispersa para eliminar el amoníaco del interior del liposoma. Con la eliminación de amoníaco, la porción equilibrada en el liposoma pasa a la formación de protones. Como resultado, se acumulan protones en el liposoma, y se forma un gradiente de pH en el interior/exterior del liposoma. Cuando se agrega un fármaco a un dispersante liposoma que tiene dicho gradiente de pH, el fármaco está encerrado en el liposoma.

Una sal de amonio capaz de formar un gradiente de concentración de ión amonio incluye, pero no está particularmente limitada a, sulfato de amonio, hidróxido de amonio, acetato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, citrato de amonio, succinato de amonio, lactobionato de amonio, carbonato de amonio, tartrato de amonio y oxalato de amonio.

Cabe observar que una técnica para introducir un fármaco en un liposoma previamente formado mediante el método de carga remota para un gradiente de concentración de ión amonio ha sido descripta en la patente norteamericana 5.192.549 (que se incorpora aquí como referencia), lo cual puede llevarse a cabo con referencia a la descripción.

Convenientemente, el compuesto orgánico que tiene un grupo amino capaz de ser protonado tiene bajo peso molecular. Ejemplos específicos del mismo incluyen, pero no están limitados a, metilamina, etilamina, propilamina, dietilamina, etilendiamina y similares.

En la presente invención, un modo apropiado es incorporar el irinotecan o una sal del mismo mediante un método de carga remota usando el gradiente de concentración de ión amonio.

Una formulación de irinotecan de la presente invención se forma incorporando el irinotecan o una sal del mismo en el portador anteriormente descrito a una

concentración superior a 0.07 mol/mol (mol de fármaco/mol de lípido total de membrana), preferiblemente superior a 0.1 mol/mol.

En la presente invención, el término "encerrar" significa un estado en el cual un fármaco está encapsulado en un portador. El término significa también un estado en el cual parte o la totalidad de las moléculas del fármaco están incluidas en una capa de un lípido que es un componente del portador. Un portador de acuerdo con la presente invención es purificado por un método comúnmente usado (tal como filtración de gel, diálisis, separación de membrana ó centrifugación), para remover de esta manera los fármacos que no han quedado descargados en el portador.

Se provee un portador después de la etapa de remoción de los fármacos no descargados. Por lo tanto, puede ocurrir un gradiente de concentración de fármaco entre la parte interior y exterior del portador a través de una bicapa de lípidos. Preferiblemente, el portador de la presente invención no contiene ningún fármaco libre fuera de la bicapa de lípidos después de la preparación del portador. Entonces, los fármacos no encerrados en el portador son liberados al área exterior. El portador de la presente invención que tiene fármacos llega hasta el sitio que es el objetivo, con el resultado de que libera los fármacos encerrados al sitio que es el objetivo. La liberación de los fármacos al sitio

objetivo puede lograrse tomando fármacos incorporados en el portador, hasta el sitio que es el objetivo, o ejerciendo el efecto de los fármacos en el sitio que es el objetivo o en la vecindad del mismo incluso si los fármacos no han sido
5 tomados en el sitio objetivo.

En la presente invención, el término "liberar" significa que un fármaco encerrado en un portador se difunde a la parte exterior de una vesícula cerrada pasando a través de una membrana de lípidos que forman el portador o cambiando
10 parte de la estructura de la membrana del lípido. Cuando se metaboliza el clorhidrato de irinotecan en el plasma dentro de SN-38 que es un metabolito activo y se expone a un sitio objetivo en una elevada concentración por un largo periodo de tiempo, se exhibe una fuerte actividad antineoplásica, de
15 modo que es importante controlar la liberación. El régimen de liberación de una formulación de irinotecan en el plasma puede controlarse ajustando la cantidad de colesterol, y se espera obtener un efecto preferible mediante el ajuste de la cantidad de colesterol. El término "régimen de liberación"
20 significa un régimen de un fármaco que pasa por exudación a la parte exterior de una vesícula cerrada desde un portador que encapsula los componentes del portador y clorhidrato de irinotecan, a un fármaco incorporado en el portador (relación en peso o relación molar). La frase "el régimen de liberación
25 es bajo" significa que la cantidad de un fármaco exudado al

exterior de una vesícula cerrada por tiempo unitario es pequeña.

En la presente invención, el término "sitio objetivo" significa un sitio específico en el cual se libera
5 un fármaco encapsulado en un portador y actúa, y significa una célula, tejido, órgano u órgano interno que está especificado en cada sitio, y un interior del mismo. El sitio objetivo tal como una célula, un tejido, un órgano o el órgano interno, y una parte interior del mismo pueden ser un
10 sitio que es necesario tratar con un fármaco. Cuando el fármaco liberado es expuesto al sitio, ejerce un efecto. Ejemplos del sitio objetivo incluyen, pero no están particularmente limitados a un tumor.

Ejemplos de un tumor que es necesario tratar
15 incluyen, pero no está particularmente limitado a un tumor sólido. Ejemplos específicos del mismo incluyen cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de intestino grueso, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de laringe, cáncer de pulmón, cáncer
20 prostático, cáncer de vesícula, cáncer de mama, cáncer uterino y cáncer ovario. El sitio objetivo es una célula tumoral, un tejido, un órgano o el órgano interno, una parte interior del mismo y similares. Por lo tanto, en la presente invención, una enfermedad significa el tumor antes descrito,
25 y se espera que un fármaco ejerciera un efecto antineoplásico

\$0
50

en el mismo.

En la presente invención, el término "exposición" significa que un fármaco liberado en la parte exterior de un portador actúa sobre el área exterior. Específicamente, cuando un fármaco liberado llega cerca y entra en contacto con el sitio objetivo, el fármaco ejerce su efecto antineoplásico como acción del mismo. Cuando el fármaco actúa sobre el sitio objetivo actúa tópicamente sobre una célula en un ciclo celular en el cual se lleva a cabo una síntesis de ADN, de modo de ejercer un efecto esperado. Para ejercer dicho efecto, debería mantenerse un equilibrio entre el régimen de liberación de un fármaco desde un portador y la capacidad de retención del portador en la sangre.

Un portador de la presente invención libera irinotecan y/o una sal del mismo a un régimen de liberación preferido, y el irinotecan liberado y/o la sal del mismo son adicionalmente metabolizados en SN-38 que es un metabolito activo. La presente invención se usa para exponer SN-38 a un sitio objetivo predeterminado por un largo período de tiempo. Por lo tanto, en la presente invención, para evitar y/o tratar una enfermedad sufrida por un huésped, puede efectuarse la administración sistémica o tópica al huésped (paciente) parenteralmente mediante la administración de un portador en el cual una cantidad eficaz de irinotecan y/o una sal del mismo está encerrada para liberar la cantidad eficaz

de irinotecan y/o una sal del mismo en el huésped o para exponer una cantidad eficaz de SN-38 a un sitio objetivo en una elevada concentración por un período de tiempo prolongado. Ejemplos del huésped como objetivo de
5 administración incluyen mamíferos, preferiblemente seres humanos, monos, ratones, ganado y similares.

Entre los ejemplos de la vía de administración parenteral que deben seleccionarse se incluye inyección intravenosa (i.v.) tal como goteo, inyección intramuscular,
10 inyección intraperitoneal, e inyección subcutánea, y el método de administración puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la edad o síntoma de un paciente. Un portador de la presente invención se administra a un paciente que sufre de una enfermedad en una cantidad suficiente para curar
15 el síntoma de la enfermedad o para aliviar por lo menos parte del síntoma. Por ejemplo, una dosis eficaz de un fármaco para ser encapsulado en un portador se selecciona dentro de un rango de 0.01 mg hasta 100 mg por kg de peso corporal por día. Sin embargo, la dosis del portador de la presente
20 invención no se limita a la misma. Para el período de administración, la administración puede llevarse a cabo después del inicio de la enfermedad, o puede llevarse a cabo profilácticamente para aliviar el síntoma en el momento de inicio de la enfermedad en el caso de haber sido pronosticado
25 el comienzo de la enfermedad. Además, un período de

administración puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la edad o síntoma de un paciente.

Ejemplos específicos del método de administración incluyen la administración de una composición farmacéutica usando una jeringa o goteo. Mientras, se inserta un catéter dentro de un cuerpo (por ejemplo, lumen o vaso) de un paciente o un huésped para guiar su borde alrededor del sitio objetivo, y la composición puede administrarse a través del catéter desde un sitio objetivo predeterminado o desde la vecindad del sitio o un sitio en el cual se espera que fluya la sangre hacia el sitio objetivo.

Tal como se describió en los Ejemplos, cuando el régimen de liberación de un fármaco encerrado en un portador de la presente invención ha sido determinado, se descubre que el régimen de liberación es bajo. Para calcular el régimen de liberación, el portador de la presente invención es precipitado por centrifugación, y se determina la cantidad de fármaco presente en el sobrenadante y portador.

20 Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá en forma más detallada a modo de ejemplos, pero la presente invención no se limitará a aquellos ejemplos y ejemplos de ensayo.

25 Cada concentración y tamaño de partícula de un

liposoma encapsulado en un fármaco preparado en cada ejemplo se determina de la manera siguiente.

Concentración de fosfolípidos (mg/ml): una concentración de fosfolípido (HSPC) en una dispersión de liposoma, que fue determinada usando un equipo para la determinación de fosfolípidos (Phospholipid C-Test Wako, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Concentración de lípidos totales (mol/l): una concentración molar total (mM) de un lípido mixto que es un componente de una membrana, que se calcula a partir de la concentración de fosfolípido anterior. Los lípidos totales contienen componentes de lípido en un agente modificador de superficie preparado en forma de un lípido mixto pero no contienen un lípido (en los ejemplos, PE (fosfatidil etanolamina) en PEG-PE o Chol (colesterol) en Chol-PEG) en un derivado PEG para introducir PEG.

Concentración de fármaco (mg/ml): la concentración se determinó de la manera siguiente: la formulación obtenida anteriormente se diluyó 40 veces con solución salina fisiológica, y se agregaron 2 ml de metanol a 50 μ l de la mezcla, seguido de medición de una intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación: 360 nm, longitud de onda de fluorescencia: 435 nm) de la mezcla usando un espectrofluorímetro. La concentración de clorhidrato de irinotecan encerrado se representa como

"cantidad de fármaco (mg/cantidad de formulación total (ml))".

· Cantidad de fármaco incorporado (relación molar del fármaco/lípidos totales): la concentración de clorhidrato de irinotecan encerrado en un portador se representa como una
5 relación molar de fármaco/lípidos totales, que se calcula a partir de una relación de la concentración de fármaco a la concentración de lípidos.

· Tamaño de partícula (nm): se diluyeron 20 µl de una dispersión de liposoma en 3 ml con solución salina
10 fisiológica, y se determinó un tamaño de partícula promedio mediante Zetasizer 3000 HS (Malvern Instruments).

Los siguientes son nombres abreviados y pesos moleculares de los componentes usados.

HSPC: fosfatidilcolina de soja hidrogenada (peso
15 molecular: 790, manufacturado por Lipoid, SPC3)

Chol: colesterol (peso molecular: 386.65, Solvay)

PEG₅₀₀₀-PE: polietilenglicol (peso molecular: 5.000)
- fosfatidil etanolamina (peso molecular: 5.938, Genzyme Corporation)

20 PEG₂₀₀₀-PE: polietilenglicol (peso molecular: 2.000)
- fosfatidil etanolamina (peso molecular: 2.725, NOF Corporation)

PEG₁₆₀₀-Chol: polietilenglicol (peso molecular: 1.600) - colesterol (peso molecular: 1.982, NOF Corporation)

25 CPT-11: clorhidrato de irinotecan (peso molecular:

677.19)

R-DHPE: rodamina dihexadecanoil fosfatidil
etanolamina (peso molecular: 1333.81, Molecular Probes, Inc.)

TRX-20: clorhidrato de 3,5-
5 dipentadeciloxibenzamidina (peso molecular: 609.41, Joko
Pharmaceutical Co., Ltd.)

[Ejemplo 1]

Para confirmar un método capaz de lograr una
10 formulación de liposoma con cantidad elevada de clorhidrato
de irinotecan encapsulado se intentó la introducción del
fármaco en una concentración elevada mediante el método de
carga remota (Ejemplo de Preparación 1) o mediante el método
de carga pasiva (Ejemplo de Preparación Comparativo 1). Para
15 todas las formulaciones del liposoma incorporadas con
clorhidrato de irinotecan (abreviadas a continuación como
formulación de CPT-11), se usó un liposoma PGE-PE (post-
introducido) como portador aunque los métodos de introducción
son diferentes.

20

[Ejemplo de Preparación 1] <Método de carga remota>

(1) Preparación de un lípido mixto: 0.422 g de
fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) y 0.176 g de
colesterol (Chol) se disolvieron en 25 ml de t-butanol (Kanto
25 Kagaku) calentado a 60°C y la mezcla se enfrió en hielo,

seguido de secado por congelación, para preparar de este modo un lípido mixto de HSPC:Chol = 54:46 (relación molar).

(2) Preparación de liposoma: a 0.598 g del lípido mixto preparado anteriormente se agregaron 10 ml de una
5 solución de sulfato de amonio 250 mM y se dejó dilatar completamente el lípido. Luego, se agitó la mezcla con una mezcladora de remolino y la mezcla resultante se hizo pasar secuencialmente a través de un filtro (tamaño del poro: 0.2 μ m x 5 veces, 0.1 μ m x 10 veces, Whatman) unido a un extrusor
10 (The Extruder T. 10, Lipex biomembranes Inc.) a 68°C para preparar de este modo una dispersión de liposoma.

(3) Introducción de PEG-PE: se agregó a la dispersión de liposoma resultante 1.21 ml (correspondiente a 0.75 % en moles de la cantidad total de lípidos del lípido
15 mixto) de una solución de polietilenglicol 5000-fosfatidil etanolamina (PEG₅₀₀₀-PE) en agua destilada (36.74 mg/ml) y la mezcla se calentó a 60°C durante 30 minutos, para introducir de esta manera PEG₅₀₀₀-PE.

Se efectuó una sustitución de fase acuosa externa
20 usando una columna de gel que había sido sometida a sustitución de solvente con una solución de 10 mM de histidina/10% de sucrosa (pH 6.0).

Se determinó una concentración de HSPC usando un equipo para la determinación de fosfolípidos. Se calculó una
25 cantidad total de lípidos (mM) a partir de la concentración

de HSPC.

(4) Encapsulación del fármaco: se preparó una solución de clorhidrato de irinotecan (CPT-11)/agua RO (agua purificada de membrana de ósmosis inversa) que tenía una
5 concentración de 10 mg/ml.

Se agregó la solución de clorhidrato de irinotecan a la dispersión de liposoma en una cantidad de CPT-11/HSPC = 0.2 (p/p) para la concentración de HSPC (mg/ml) anterior, y la mezcla se agitó a 60°C durante 60 minutos, para introducir
10 de este modo el clorhidrato de irinotecan. Después de la introducción, la muestra se enfrió en hielo. Después de la encapsulación del clorhidrato de irinotecan, la dispersión de liposoma se hizo pasar a través de una columna de gel que había sido sometida a sustitución con solvente con una
15 solución de 10 mM de histidina/10% de sucrosa (pH 6.5) para remover los fármacos no encapsulados.

Las composiciones y los tamaños de partícula de las formulaciones de CPT-11 obtenidas anteriormente se muestran en la Tabla 1.

20 Se obtuvieron formulaciones de CPT-11 altamente incorporadas de la presente invención.

[Ejemplo de Preparación Comparativo 1] <Método de carga pasiva>

25 A 0.2992 g de un lípido mixto (HSPC:Chol = 54:46

(relación molar)) preparado mediante el mismo método que el del Ejemplo de Preparación 1, se le agregaron 5 ml de una solución de clorhidrato de irinotecan (CPT-11/10% de solución de sucrosa que tiene una concentración de 10 mg/ml) y se
5 permitió que el lípido se dilatara completamente. La mezcla se agitó con una mezcladora de remolino, y la mezcla resultante se hizo pasar consecutivamente a través de un filtro (0.2 μ m x 5 veces, 0.1 μ m x 10 veces) unido a un extrusor a 68°C de la misma manera que en el Ejemplo de
10 Preparación 1, para preparar de esta manera un liposoma encapsulado de clorhidrato de irinotecan.

Se agregó al liposoma 0.61 ml (correspondiente a 0.75 % en moles de la cantidad total de lípidos del lípido mixto) de PEG₅₀₀₀-PE del mismo modo que en el Ejemplo de
15 Preparación 1 (3), y la mezcla se calentó a 60°C durante 30 minutos para introducir de este modo PEG₅₀₀₀-PE. Subsiguientemente, se extrajeron los fármacos no encapsulados usando una columna de gel que había sido sometida a sustitución de solvente con una solución de 10 mM de
20 histidina/10% de sucrosa (pH 6.5).

Las composiciones y tamaños de partícula de las formulaciones CPT-11 obtenidas anteriormente se muestran en la Tabla 1.

El fármaco se introdujo con la misma cantidad de
25 fármaco que en el Ejemplo de Preparación 1, pero no se

obtuvieron formulaciones altamente encapsuladas de CPT-11 mediante el método de carga pasiva.

[Ejemplo 2]

5 Se investigó la cantidad inicial necesaria para obtener una formulación de CPT-11 altamente encapsulada de la presente invención en el método de carga remota.

(Ejemplo de Preparación 2)

10 Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Preparación 1 excepto que, en la encapsulación del fármaco descrita en el Ejemplo de Preparación 1 (4), la relación de CPT-11/HSPC (p/p) de una solución acuosa de CPT-11/RO (10 mg/ml) para ser agregada a la dispersión de liposoma con PGE-PE post-introducido preparado de la misma manera que (1)
15 hasta (3) se cambió a 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 para obtener de esta manera formulaciones de CPT-11. Las composiciones y tamaños de partícula de las formulaciones de CPT-11 obtenidas anteriormente se muestran en la Tabla 1.

20 Tal como se muestra en la Tabla 1, las formulaciones altamente incorporadas de CPT-11 que tienen el fármaco en una concentración completamente eficaz para uso clínico pueden obtenerse mediante el método de carga remota incrementando la cantidad inicial de fármaco (relación de fármaco/HSPC).

[Tabla 1]

Ejemplo de Preparación	Composición de la membrana Inicial (relación molar)		Concentración de lípidos		Cantidad Inicial de fármaco	Concentración de fármaco	Cantidad de fármaco incorporado	Tamaño de la partícula
	Lípido	PE G-PE	Fosfolípido (HSPC) mg/ml	Lípidos totales mol/l				
Ejemplo de Preparación 1	54/46	0.75	12.60	0.030	0.2	2.41	0.121	120.9
Ejemplo de Preparación Comparativo 1			13.73	0.032	0.2	0.29	0.013	120.8
Ejemplo de Preparación 2- (1) (2) (3) (4)	54/46	0.75	11.37	0.027	0.1	1.32	0.073	125.2
			8.98	0.021	0.2	1.88	0.132	124.8
			7.08	0.017	0.4	2.99	0.266	123.1
			4.54	0.011	0.8	2.96	0.410	126.5

5

10

15

(Ejemplo de Ensayo 1) Estabilidad de formulación acelerada a 37°C

Cada formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 1 se calentó a 37°C por un período predeterminado. Después
5 del calentamiento se diluyó la formulación de CPT-11 20 veces mediante el agregado de solución fisiológica salina y se llevó a cabo una ultracentrifugación (1×10^5 g, 2 horas, 10°C) para precipitar una formulación de CPT-11 (liposoma de clorhidrato de irinotecan encapsulado). La cantidad de
10 clorhidrato de irinotecan presente en el sobrenadante se determinó para calcular el régimen de liberación (%) del clorhidrato de irinotecan desde la formulación de CPT-11. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

La formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de
15 Preparación Comparativo 1 demostró tener un régimen de liberación de clorhidrato de irinotecan de aproximadamente 60% después de calentamiento a 37°C durante 7 días, mientras que la formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de Preparación 1 mediante el método de carga remota demostró que
20 liberaba poco clorhidrato de irinotecan incluso después de calentar a 37°C durante 7 días. Por lo tanto, se aclaró que la encapsulación del clorhidrato de irinotecan dentro de un liposoma mediante el método de carga remota permite la preparación de una formulación altamente incorporada de CPT-
25 11 que tiene excelente estabilidad de formulación.

(Ejemplo de Ensayo 2) Estabilidad de formulación a 37°C

Cada formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 2 se calentó a 37°C por un período predeterminado. Después del calentamiento, de la formulación de CPT-11, se determinó el régimen de liberación del clorhidrato de irinotecan de la misma manera que en el Ejemplo de Ensayo 1. El régimen de liberación de cada formulación de CPT-11 demostró ser 1% o menos incluso después de calentar a 37°C durante 14 días.

Por lo tanto, quedó claro que el régimen de liberación de la formulación de CPT-11 preparada mediante el método de carga remota no es afectado en gran medida por la cantidad de fármaco incorporado (relación de fármaco/lípidos totales) e incluso la formulación de CPT-11 extremadamente altamente encapsulada tiene el excelente estabilidad de formulación.

[Ejemplo 3]

Se usó un liposoma que tiene una composición de membrana diferente de la del Ejemplo de Preparación 1 como portador para preparar una formulación de CPT-11. Específicamente, el procedimiento para la encapsulación de clorhidrato de irinotecan se llevó a cabo mediante el método de carga remota de la misma manera que en el Ejemplo de Preparación 1 usando un liposoma de PEG-PE post-introducido

(Ejemplo de Preparación 3) o un liposoma de PEG-PE pre-introducido (Ejemplo de Preparación de Referencia 1) que incluye el lípido mixto que se muestra a continuación como componente de la membrana.

5 (Ejemplo de Preparación 3)

(1) Preparación del lípido mixto: 1.5317 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), 0.6419 g de colesterol (Chol) y 0.005 g de rodamina dihexadecanoil fosfatidil etanolamina (R-DHPE) se disolvieron en 50 ml de t-
10 butanol calentada a 60°C y la mezcla se enfrió en hielo, seguido de secado por congelación, para preparar de este modo un lípido mixto que tiene una relación molar de HSPC:Chol:R-DHPE = 54:46:0.1.

(2) Preparación del liposoma: la adición de 10 ml
15 de una solución de sulfato de amonio 250 mM, la agitación con una mezcladora de remolino, y la filtración con un filtro unido a un extrusor (0.2 μ m x 5 veces, 0.1 μ m x 10 veces) se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo de Preparación 1 excepto que se usaron 0.37 g del lípido mixto
20 preparado anteriormente, para obtener de este modo una dispersión de liposoma.

Subsiguientemente, se llevó a cabo una sustitución de fase acuosa externa con una solución de 10 mM de histidina/10% de sucrosa (pH 6.0).

25 (3) Introducción de PEG-PE: se agregó a la

dispersión del liposoma resultante una solución de polietilenglicol 2000-fosfatidil etanolamina (PEG₂₀₀₀-PE) en agua destilada (36.74 mg/ml) (correspondiente a 2.8 % en moles de la cantidad total de lípidos) y la mezcla
5 se calentó a 60°C durante 30 minutos para introducir de esta manera PEG₂₀₀₀-PE.

(4) De la misma manera que en la encapsulación del fármaco del Ejemplo de Preparación 1, se agregaron 10 mg/ml de una solución de CPT-11/agua RO a la dispersión de liposoma
10 en una cantidad requerida para CPT-11/HSPC = 0.2 (p/p) con el fin de introducir clorhidrato de irinotecan. Subsiguientemente, la mezcla se enfrió en hielo y se extrajeron los fármacos no encapsulados con una solución de 10 mM de histidina/10% se sucrosa (pH 6.5). La formulación de
15 CPT-11 resultante se muestra en la Tabla 2.

(Ejemplo de Preparación de Referencia 1)

Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Preparación 3 excepto que el PEG₂₀₀₀-PE que debía agregarse en el Ejemplo de Preparación 3 (3) había sido agregado
20 previamente al lípido mixto en forma de un material de membrana para preparar un liposoma que tiene PEG-PE dispersado en ambos lados de las membranas internas y externas, para preparar de este modo una formulación de CPT-11. El procedimiento se muestra a continuación.

25 A 0.37 g del lípido mixto (HSPC:Chol:R-DHPE =

54:46=0.1 (relación molar)) preparado de la misma manera que en el Ejemplo de Preparación 3 (1) y 0.094 g (que corresponde a la cantidad de (5.6 moles%) el doble de la cantidad del Ejemplo de Preparación 3) de PEG₂₀₀₀-PE se le agregó 1 ml de etanol y la mezcla se disolvió completamente mediante agitación a 65°C durante 30 minutos.

Después de confirmar que la mezcla había sido disuelta completamente por agitación, se agregaron a la solución de etanol 10 ml de una solución de sulfato de amonio preparada para que fuera de 250 mM. A continuación, se llevaron cabo los mismos procedimientos que para el Ejemplo de Preparación 3 (2) con una mezcladora de remolino y un extrusor, y se efectuó la sustitución de fase acuosa externa para la dispersión de liposoma obtenido mediante el uso de 10% de solución de sucrosa.

De la misma manera que para el Ejemplo de Preparación 3 (4), 10 mg/ml de una solución de CPT-11/agua RO se agregó a la dispersión de liposoma en una cantidad requerida para CPT-11/HSPC valor = 0.2 (p/p) para introducir clorhidrato de irinotecan. Después de la introducción, la mezcla se enfrió en hielo y se extrajeron los fármacos no encapsulados de la misma manera que en el Ejemplo de Preparación 3 (4). La formulación de CPT-11 resultante se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

	Composición de la membrana Inicial (relación molar)		Concentración de lípidos		Concentración de fármaco	Cantidad de fármaco incorporado	Tamaño de la partícula
	Lípido	PEG-PE	Fosfolípido	Lípidos totales	mg/ml	Mol de fármaco/mol de lípido total	nm
	HSPC : Chol : R-DHPE		mg/ml	mol/l			
Ejemplo de Preparación 3	54 : 46 : 0.1	2.8	8.12	0.019	1.52	0.114	123.8
Ejemplo de Preparación de Referencia 1	54 : 46 : 0.1	5.6	6.88	0.016	1.21	0.107	102.3

(Ejemplo de Ensayo 3) Estabilidad acelerada de la formulación a 37°C

Para cada formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 3, se llevó a cabo un ensayo acelerado mediante calentamiento del mismo a 37°C durante 1 mes. Se recogió cada semana una alícuota de la formulación de CPT-11 caliente, y se diluyó 20 veces mediante agregado de solución salina fisiológica, seguido de ultracentrifugación (1×10^5 g, 2 horas, 10°C) para precipitar una formulación de CPT-11. La intensidad de fluorescencia correspondiente a la cantidad de clorhidrato de irinotecan presente en el sobrenadante se determinó para calcular el régimen de liberación del liposoma (%). Los resultados se muestran en la figura 2. Mientras tanto el tamaño de partícula del liposoma en la dispersión caliente se midió cada semana. Los resultados se muestran en la figura 3.

Las figuras 2 y 3 revelan que el liposoma preparado en el Ejemplo de Preparación 3 no liberó droga a 37°C incluso al cabo de 1 mes (figura 2) y tuvo un tamaño de partícula sustancialmente constante (figura 3), de modo que mostró excelente estabilidad de la formulación. Por otra parte, para el liposoma de PEG-PE pre-introducido preparado en el Ejemplo de Preparación de Referencia 1, la liberación del fármaco a 37°C se inició a la tercera semana, el régimen de liberación a la cuarta semana fue extremadamente alto (figura 2), y el

tamaño de partícula aumentó desde la tercera semana (figura 3), de modo que se sugirió que la ruptura de la membrana ocurrió desde la tercera semana.

A partir de estos resultados, para una formulación de CPT-11 altamente incorporada de acuerdo con la presente invención, el liposoma PEG-PE post-introducido preparado por agregado de PEG-PE después de la formación del liposoma, mostró que tenía una forma preferible.

10 [Ejemplo 4]

Para ensayar la estabilidad de preservación a largo término y la estabilidad en la sangre de una formulación de CPT-11 de la presente invención, se prepararon formulaciones de CPT-11 mediante los métodos en los Ejemplos de Preparación 15 4 y 5 siguientes.

(Ejemplo de Preparación 4)

Se introdujo un fármaco mediante el método de carga remota de la misma manera que en el Ejemplo de Preparación 1 excepto que se llevó a cabo una sustitución de fase acuosa externa para la dispersión del liposoma PEG-PE post-introducido usando una columna de gel que había sido sometida a sustitución de solvente con una solución de 10 mM de MES/10% de sucrosa (pH 6.0) en el Ejemplo de Preparación 1 20 (3), para preparar de este modo una formulación de CPT-11 25

altamente incorporada. Las composiciones se muestran en la Tabla 3.

(Ejemplo de preparación 5)

5 Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Preparación 4 excepto que el lípido mixto preparado en (1) siguiente se usó como componente de la membrana, para preparar de esta manera una formulación de CPT-11 altamente incorporada que contenía clorhidrato de 3,5-
10 dipentadeciloxibenzamidina que es una sustancia cargada. El procedimiento se muestra a continuación.

 (1) Preparación de lípidos mixtos: 0.4561 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), 0.1876 g de colesterol (Chol) y 0.0563 g de clorhidrato de 3,5-
15 dipentadeciloxibenzamidina (TRX-20) se disolvieron en 25 ml de t-butanol calentado a 60°C, y la mezcla se enfrió en hielo, seguido de secado por congelación para preparar de esta manera un lípido mixto de HSPC:Chol:TRX-20 = 50:42:8 (relación molar).

20 Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Preparación 1 (2) excepto que 0.700 g del lípido mixto preparado anteriormente se usaron para preparar de esta manera una dispersión de liposoma.

 A la dispersión de liposoma se agregó 1.42 ml
25 (correspondiente a 0.75 % en moles de la cantidad total de

lípidos del lípido mixto) de una solución de PEG₅₀₀₀-PE en agua destilada (36.74 mg/ml) para introducir PEG₅₀₀₀-PE. Subsiguientemente se introdujo el fármaco mediante el método de carga remota de la misma manera que en el

5 Ejemplo de Preparación 1 (3) excepto la sustitución de fase acuosa externa para la dispersión de liposoma se llevó a cabo con una solución de 10 mM de MES/10% de sucrosa (pH 6.0), para preparar de esta manera una formulación de CPT-11 altamente incorporada. La composición se muestra en la Tabla

10 3.

(Ejemplo de Ensayo 4) Ensayo de preservación a largo término a 4°C

Cada una de las formulaciones de CPT-11 obtenidas

15 anteriormente se almacenó a 4°C por un período predeterminado. Después de transcurrido el período predeterminado, se midió el tamaño de partícula de la formulación de CPT-11 y el régimen de liberación (%) del clorhidrato de irinotecan a partir de la formulación de CPT-

20 11 de la misma manera que en el Ejemplo de Ensayo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

5	Composición de la membrana inicial Relación molar	Lípido	Ejemplo de Preparación 4 HSPC/Chol	Ejemplo de Preparación 5 HSPC/Chol/TRX-20
			54/46	50/42/8
		PEG-PE	0.75	0.75
10	Concentración de lípidos	Fosfolípido (HSPC) mg/ml	12.02	11.77
		Lípido total mol/l	0.028	0.030
15	Concentración de fármaco	mg/ml	2.67	2.41
	Cantidad de fármaco incorporado	mol de fármaco/mol de lípido total	0.138	0.119
	Tamaño de partícula nm	Inicial	126.3	123.3
		Después de 6 meses de almacenamiento	122.2	125.4
	Régimen de liberación %	Inicial	0.63	0.12
		Después de 6 meses de almacenamiento	0.38	0.17

✓

Para cada una de las formulaciones de CPT-11 preparadas en el Ejemplo 4 anterior, no se cambió el tamaño de partícula y el régimen de liberación incluso después de 6 meses de almacenamiento a 4°C. Por lo tanto, se aclaró que cada formulación de CPT-11 preparada por el método de carga remota tiene excelente estabilidad de preservación a largo término.

(Ejemplo de Ensayo 5) Capacidad de retención en la sangre

Cada formulación de CPT-11 preparado en el Ejemplo 4 (Ejemplos de Preparación 4 y 5) o una solución de clorhidrato de irinotecan en solución salina fisiológica (que contenía 1 mg/ml de clorhidrato de irinotecan) se inyectó intravenosamente en la cola de un ratón (BALB/c, macho, de 5 semanas de vida, CLEA Japan, Inc.) en una cantidad de clorhidrato de irinotecan de 10 mg/kg (que corresponden a 8.77 g/kg en términos de cantidad de irinotecan).

Se extrajo sangre 1.6 y 24 horas después de la inyección y se centrifugó (3.000 rpm, 10 minutos, 4°C) para recoger plasma. La concentración de clorhidrato de irinotecan en cada plasma se midió con una medición de la intensidad de la fluorescencia. El plasma se almacenó en un refrigerador hasta el momento de la medición. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 4.

En el caso de cada formulación de CPT-11 preparada en el Ejemplo 4, la concentración de clorhidrato de irinotecan en el plasma pudo medirse hasta 24 horas después de la inyección en la vena de la cola, mientras que en el caso de la solución de clorhidrato de irinotecan en solución salina fisiológica, la concentración pudo medirse solamente 1 hora después de la inyección en la vena de la cola.

Por lo tanto, la formulación de CPT-11 preparada mediante el método de carga remota permitió el mantenimiento de la concentración de clorhidrato de irinotecan en el plasma en una concentración elevada por un periodo de tiempo prolongado.

[Tabla 4]

Tabla 4

Tiempo transcurrido (hr)	Concentración en el plasma (µg/ml)		
	1	6	24
Formulación de CPT-11 (Ejemplo de Preparación 4)	189.41	128.03	13.18
Formulación de CPT-11 que contiene TRX-20 (Ejemplo de Preparación 5)	185.29	84.67	3.38
Solución de clorhidrato de Irinotecan en solución salina fisiológica	0.39	ND	ND

[Ejemplo 5]

Para probar la eficacia del fármaco en una

formulación de CPT-11 altamente encapsulada de acuerdo con la presente invención, se prepararon formulaciones de CPT-11 en los Ejemplos de Preparación 6 a 9 siguientes.

5 (Ejemplo de Preparación 6)

Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Preparación 4 excepto que el lípido mixto preparado en (1) siguiente se usó como componente de la membrana, para preparar de esta manera una formulación de CPT-11 altamente
10 incorporada que contenía clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina que es una sustancia cargada. El procedimiento se muestra a continuación.

(1) Preparación del lípido mixto: se disolvieron 4,562 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), 1,876
15 g de colesterol (Chol) y 0,564 g de clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina (TRX-20) en 50 ml de t-butanol calentado a 60°C, y la mezcla se enfrió en hielo, seguido de secado por congelación para preparar de esta manera un lípido mixto de HSPC:Chol:TRX-20 = 50:42:8 (relación molar).

20 Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Preparación 1 excepto que se usaron 7,002 g del lípido mixto preparado anteriormente, para preparar de esta manera una dispersión de liposoma.

A la dispersión de liposoma se le agregó una
25 solución de polietilenglicol 5000-fosfatidil etanolamina

(PEG₅₀₀₀-PE) en agua destilada (36.74 mg/ml) que correspondía a 0.75 % en moles de la cantidad total de lípidos, y la mezcla se calentó a 60°C durante 30 minutos para introducir PEG₅₀₀₀-PE.

- 5 Subsiguientemente, se introdujo el fármaco mediante el método de carga remota de la misma manera que en el Ejemplo de Preparación 1 (4), para preparar de este modo una formulación de CPT-11 altamente encapsulada. La composición se muestra en la Tabla 5.

10

[Tabla 5]

Tabla 5

	Composición de la membrana inicial (relación molar)		Concentración de lípidos		Concentración de fármaco	Cantidad de fármaco incorporado	Tamaño de la partícula
	Lípido	PEG-PE	Fosfolípido (HSPC)	Lípidos totales	mg/ml	Mol de fármaco/mol de lípido total	nm
	HSPC : Chol : TRX-20		mg/ml	mol/l			
Ejemplo de Preparación 6	50 : 42 : 8	0.75	18.36	0.047	3.66	0.115	134.3

(Ejemplo de Preparación 7)

Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Preparación 4 excepto que el lípido mixto preparado en (1) siguiente se usó como componente de la membrana, para
5 preparar de esta manera una formulación de CPT-11 altamente incorporada que contenía clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina que es una sustancia cargada. El procedimiento se muestra a continuación.

(1) Preparación de un lípido mixto: se disolvieron
10 4,562 g fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), 1,518 g de colesterol (Chol), y 1,126 g de clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina (TRX-20) en 50 ml de t-butanol calentado a 60°C y la mezcla se enfrió en hielo, seguido de secado por congelación, para preparar de esta manera un
15 lípido mixto de HSPC:Chol:TRX-20 = 50:34:16 (relación molar).

Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Preparación 1 excepto que se usaron 7,207 g del lípido mixto preparado anteriormente, para preparar de este modo un dispersante de liposoma.

20 A la dispersión de liposoma se le agregó una solución de polietilenglicol 1600-colesterol (PEG₅₀₀₀-Chol) en agua destilada (36.74 mg/ml) que corresponden a 2.0 % en moles de cantidad total de lípidos y la mezcla se calentó a 60°C durante 30 minutos para introducir PEG₁₆₀₀-Chol.
25 Subsiguientemente, se introdujo el fármaco mediante el método

de carga remota de la misma manera que en el Ejemplo de Preparación 1 (4) excepto que la sustitución de la fase acuosa externa por la dispersión de liposoma se llevó a cabo con una solución de sucrosa 10 mM de MES/10% (pH 6.0), para
5 preparar de este modo una formulación de CPT-11 altamente encapsulada. La composición se muestra en la Tabla 6.

[Tabla 6]

Tabla 6

5		Composición de la membrana Inicial (relación molar)		Concentración de lípidos		Concentración de fármaco	Cantidad de fármaco incorporado	Tamaño de la partícula
		Lípido	Cho-PEG	Fosfolípido (HSPC)	Lípidos totales	mg/ml	Mol de fármaco/mol de lípido total	nm
		HSPC:Cho I:TRX-20		mg/ml	mol/l			
10	Ejemplo de Preparación 7	50 : 34 : 16	2.0	15.78	0.041	3.26	0.119	133.7

15

(Ejemplo de Preparación 8)

Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Preparación 4 excepto que el lípido mixto preparado en (1) siguiente se usó como componente de la membrana, para
5 preparar de esta manera una formulación de CPT-11 altamente incorporada que contenía clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina que es una sustancia cargada. El procedimiento se muestra a continuación.

(1) Preparación del lípido mixto: se disolvieron
10 4,562 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), 1,876 g de colesterol (Chol) y 0,564 g de clorhidrato de 3,5-dipentadeciloxibenzamidina (TRX-20) en 50 ml de t-butanol calentado a 60°C, y la mezcla se enfrió en hielo, seguido de secado por congelación para preparar de esta manera un lípido
15 mixto de HSPC:Chol:TRX-20 = 50:42:8 (relación molar).

El procedimiento del Ejemplo de Preparación 1 se repitió excepto que se usaron 7,002 g del lípido mixto preparado anteriormente, para preparar de este modo una dispersión de liposoma.

20 A la dispersión de liposoma se le agregó una solución de polietilenglicol 5000-fosfatidil etanolamina (PEG₅₀₀₀-PE) en agua destilada (36.74 mg/ml) correspondiente a 0.75 % en moles de la cantidad total de lípidos y la mezcla se calentó a 60°C durante 30 minutos para introducir PEG₅₀₀₀-
25 PE.

Subsiguientemente, se introdujo el fármaco mediante el método de carga remota de la misma manera que en el Ejemplo de Preparación 1 (4) para preparar de esta manera una formulación de CPT-11 altamente encapsulada. La composición se muestra en la Tabla 6.

(Ejemplo de Preparación 9)

El procedimiento del Ejemplo de Preparación 4 se repitió excepto que el lípido mixto preparado en (1) más abajo se usó en forma de un componente de membrana, para preparar de este modo una formulación de CPT-11 altamente incorporada. El procedimiento se muestra a continuación.

(1) Preparación de lípido mixto: 4,940 g de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) y 2,060 g de colesterol (Chol) se disolvieron en 50 ml de t-butanol calentado a 60°C y la mezcla se enfrió en hielo, seguido de secado por congelación para preparar de este modo un lípido mixto de HSPC:Chol = 54:46 (relación molar).

Se repitió el procedimiento del Ejemplo de Preparación 1 excepto que se usaron 7,002 g del lípido mixto preparado anteriormente, para preparar de este modo una dispersión de liposoma.

A la dispersión de liposoma se agregó una solución de polietilenglicol 5000-fosfatidil etanolamina (PEG₅₀₀₀-PE) en agua destilada

(36.74 mg/ml) que correspondía a 0.75 % en moles de la cantidad total de lípidos, y la mezcla se calentó a 60°C durante 30 minutos para introducir PEG₅₀₀₀-PE.

Subsiguientemente, se introdujo el fármaco mediante el método de carga remota de la misma manera que en el Ejemplo de Preparación 1 (4), para preparar de este modo una formulación de CPT-11 altamente encapsulada. La composición se muestra en la Tabla 7.

[Tabla 7]

Tabla 7

	Composición de la membrana inicial (relación molar)		Concentración de lípidos		Concentración de fármaco	Cantidad de fármaco incorporado	Tamaño de la partícula
	Lípido	PEG-PE	Fosfolípido (HSPC)	Lípidos totales	mg/ml	Mol de fármaco/mol de lípido total	nm
	HSPC:Cho I:TRX-20		mg/ml	mol/l			
Ejemplo de Preparación 8	50 : 42 : 8	0.75	19.04	0.049	3.22	0.098	121.6
Ejemplo de Preparación 9	54 : 46 : 0	0.75	19.66	0.045	3.28	0.107	119.9

83

[Ejemplo 6]

Se examinó el efecto del valor de pH de una fase acuosa externa sobre el régimen de encapsulación del fármaco.

5 (Ejemplo de Preparación 10)

(1) Preparación de lípidos mixtos: se pesaron 7.01 g de HSPC y 2.93 g de Chol y se agregaron al mismo 10 ml de etanol absoluto. Luego, se disolvieron con calentamiento a 68°C. Después de confirmar que se habían disueltos
10 completamente, se agregaron a los mismos 90 ml de solución de sulfato de amonio (250 mM) y la mezcla se agitó con calentamiento a 68°C.

(2) Preparación de liposomas: después de completar la agitación con calentamiento, la mezcla resultante se pasó
15 a través de un filtro que tenía un tamaño de poro de 0.2 µm, cinco veces usando un extrusor calentado a 68°C. Subsiguientemente, se intercambió el filtro por un filtro que tenía un tamaño de poro de 0.1 µm y el filtrado se pasó a través del filtro cinco veces. A continuación, se intercambió
20 el filtro por un filtro que tenía un tamaño de poro de 0.1 µm nuevamente, y se pasó el filtrado a través del filtro cinco veces. La introducción de PEG₅₀₀₀-DSPE: después de la extrusión, se agregaron a la muestra 20.4 ml de una solución de PEG₅₀₀₀-DSPE (36.74 mg/ml) para que tuviera un contenido de
25 PEG₅₀₀₀-DSPE predeterminado (% en moles) y la mezcla se agitó

a 60°C durante 30 minutos, para introducir luego PEG₅₀₀₀-DSPE. Después de la introducción, la muestra se enfrió en hielo.

(3) Sustitución de fase acuosa externa: para cada muestra (8 ml) enfriada con hielo, se llevó a cabo una
5 sustitución de fase acuosa externa usando una columna de gel que había sido sometida a sustitución adecuada, donde cada una de dichas soluciones de fase acuosa externa tenían diferentes valores de pH (pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ó 9.0), concretamente, soluciones acuosas de fase externa que tenían
10 un pH de 4.0, 5.0 (soluciones de 10 mM de ácido acético/10% de sucrosa), una solución de fase acuosa externa que tenía un pH de 6.0 (solución de 10 mM de histidina/10% de sucrosa), soluciones de fase acuosa externas que tenían un pH de 7.0, 8.0, 9.0 (soluciones de 10 mM de Tris/10% de sucrosa).
15 Después de la sustitución de la fase acuosa externa, se determinó cada concentración de HSPC usando un equipo para la determinación de fosfolípidos, para la dispersión de liposoma. La cantidad total de fosfolípido (mM) se calculó a partir de la concentración de HSPC.

20 (4) Encapsulación del fármaco: se preparó una solución de clorhidrato de irinotecan (CPT-11)/agua RO (agua purificada por membrana de ósmosis inversa), que tenía una concentración de 10 mg/ml. Se agregó la solución de clorhidrato de irinotecan a la dispersión de liposoma en una
25 cantidad de CPT-11/cantidad total de lípidos = 0.16 (mol/ml)

con respecto a la cantidad de lípidos total (mM) anterior, y la mezcla se agitó a 60°C durante 60 minutos, para introducir de esta manera clorhidrato de irinotecan. Después de la introducción, la muestra se enfrió en hielo. Después de la encapsulación del clorhidrato de irinotecan, la dispersión de liposoma se pasó a través de una columna de gel que había sido sometida a sustitución con una solución de 10 mM de histidina/10% de sucrosa (pH 6.5) para eliminar los fármacos no encapsulados.

La concentración de lípido (HSPC), concentración de fármaco (CPT-11) y el tamaño de partícula de cada formulación de CPT-11 obtenida anteriormente se muestra en la Tabla 8.

(Eficiencia de encapsulación del fármaco)

Para cada formulación de CPT-11 obtenida anteriormente, se calculó la eficiencia de encapsulación del fármaco (%) a partir de la relación de la concentración final de fármaco CPT-11 con respecto a la concentración inicial de fármaco 0.16 (mol/mol) de acuerdo con la expresión siguiente.

[Formula Matemática 1]

$$\text{Eficiencia de encapsulación de CPT-11 (\%)} = \left\{ \frac{\text{CPT-11 Final/Lípidos totales (mol/mol)}}{\text{CPT-11 Inicial/Lípidos totales (mol/mol)}} \right\} \times 100$$

Los resultados se muestran en la Tabla 8 y en la figura 5. La tabla y la figura muestran lo siguiente: en el

caso en el que el valor de pH de la fase acuosa externa es 8.0 o menos, la eficiencia de encapsulación de CPT-11 (%) es un valor extremadamente alto de 90% o más, mientras que en el caso en el que el valor es de más de 8.0, la eficiencia de encapsulación del CPT-11 (5) disminuye.

[Tabla 8]

Tabla 8

	pH de la fase acuosa externa	Concentración de HSPC (mg/mL)	Concentración de CPT-11 (mg/mL)	CPT-11 inicial/Lípido total (mol/mol)	CPT-11 final/Lípido total (mol/mol)	Eficiencia de encapsulación (%)	Tamaño de Partícula (nm)
5	4.0	11.4	2.9	0.16	0.163	101.9	121.5
		12.5	3.2		0.159	99.4	123.8
5.0	12.7	3.3	0.164		102.5	122.6	
	12.5	3.1	0.157		98.1	124.0	
10	6.0	13.0	3.2		0.154	96.3	123.5
		14.3	3.4		0.151	94.4	122.9
	7.0	12.1	3.1		0.158	98.8	124.7
		13.7	3.2		0.148	92.5	122.4
	8.0	13.3	3.1		0.147	91.9	124.1
		13.6	3.2		0.148	92.5	123.8
15	9.0	12.4	2.4		0.120	75.0	121.4
		12.8	2.3		0.115	71.9	124.1

2

89

[Ejemplo 7]

Se examinó el efecto del valor pH de la fase acuosa externa sobre la estabilidad del fármaco.

A 1 mL de cada una de las fases acuosas externas que tienen diferentes valores de pH, concretamente las soluciones de fase acuosa externa que tienen un pH de 4.0, 5.0 (soluciones de 10 mM de ácido acético/10% de sucrosa), soluciones de fase acuosa externa que tienen pH 6.0 (solución de 10 mM de histidina/10% de solución de sucrosa), soluciones de fases acuosas externas que tienen 7.0, 8.0, 9.0 (soluciones de 10 mM Tris/10% de sucrosa), (pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, o 9.0) que se usaron en (3) del Ejemplo de Preparación 10, se les agregó 0.7 mL de una solución de clorhidrato de irinotecan (CPT-11) agua RO (agua purificada de membrana de ósmosis inversa) que tenía una concentración de 10 mg/mL, y la mezcla se agitó a 60°C durante 60 minutos.

La solución de CPT-11 obtenida anteriormente se diluyó 20 veces con cada una de las soluciones de fase acuosa externa, y 5 µl de la muestra se sometieron a medición con cromatografía líquida de alto rendimiento. A continuación, la relación de hidrólisis (relación existente de forma circular abierta), (%) de un anillo de α-hidroxilactona se calculó de acuerdo con la expresión siguiente. Relación existente de forma circular abierta de CPT-11 (%) = $\{A_{abierto} / (A_{abierto} + 1.102 \times A_{cerrado})\} \times 100$

A_{abierto}: un área pico de forma circular abierta de CPT-11

A_{cerrado}: un área pico de forma circular cerrada de CPT-11

5

Los resultados se muestran en la Figura 5.

Se aclaró que, en el caso de que el valor de pH de la fase acuosa externa es de 8.0 o más, la relación existente de la forma circular abierta CPT-11 (%) aumentó y fue un
10 valor extremadamente alto de 95% o más. Para mantener la actividad del CPT-11, es necesario que el valor de pH sea de 4.0 o menos para suprimir la hidrólisis del anillo de α -hidroxilactona. Sin embargo, a partir del aspecto de la estabilidad del lípidos (hidrólisis de lípidos), el valor de
15 pH es convenientemente de aproximadamente 6.0 a 7.0. Considerando los resultados del Ejemplo 6, se halló que el valor de pH de la fase acuosa externa en el momento de introducción del fármaco, era convenientemente de 4.0 a 7.0.

20 [Ejemplo 8]

(Ejemplo de preparación 11)

(1) Preparación de liposomas

Se pesaron 70.87 g de HSPC y 29.13 g de Chol, y luego se les agregaron 100 mL de etanol absoluto. Luego, se
25 disolvieron éstos con calentamiento a 68°C. Después de

confirmar que se habían disuelto completamente, se agregó a los mismos una solución de 900 mL de sulfato de amonio (250 mM), y la mezcla se agitó con calentamiento a 68°C.

(2) Regulación del tamaño de partículas del
5 liposoma

Regulación del tamaño de partículas del liposoma: después de completar la agitación con calentamiento, se pasó la mezcla resultante a través de un filtro que tenía un tamaño de poros de 100 nm cinco veces usando un extrusor
10 calentado a 68°C.

Introducción de PEG₅₀₀₀-DSPE: después de la extrusión, se agregaron a la mezcla 200 mL de una solución de PEG₅₀₀₀-DSPE (36.74 mg/mL) para tener un contenido de PEG₅₀₀₀-DSPE predeterminado (%molar), y la mezcla se agitó a 6°C
15 durante 30 minutos, para introducir de esta manera PEG₅₀₀₀-DSPE. Después de la introducción la mezcla se enfrió en hielo.

(3) Sustitución de fase acuosa externa

Para la muestra enfriada con hielo, se efectuó una
20 sustitución de fase acuosa externa usando un sistema de filtración de flujo cruzado con una solución de fase acuosa externa (solución de 10 mM de histidina/10% de sucrosa) (pH 6.5). Después de la sustitución de fase acuosa externa, se determinó la concentración de HSPC y la concentración de
25 colesterol, usando cromatografía líquida de alto rendimiento.

La cantidad de clorhidrato de irinotecan que debería ser encapsulada se calculó a partir de la suma de la concentración de HSPC y la concentración de colesterol como concentración total de lípidos.

5 (4) Encapsulación del fármaco

Se preparó una solución de clorhidrato de irinotecan (CPT-11)/agua RO (agua purificada de membrana por ósmosis inversa), que tenía una concentración de 10 mg/mL. La solución de clorhidrato de irinotecan se agregó a la
10 dispersión de liposomas en una cantidad de CPT-11/lípidos totales = 0.16 (mol/mol) con respecto a la cantidad total de lípidos (mM) anterior, y la mezcla se agitó a 50°C durante 20 minutos, para introducir luego clorhidrato de irinotecan. Después de la introducción se enfrió la muestra en hielo.

15 (5) Remoción del fármaco no encapsulado

Después de la encapsulación de clorhidrato de irinotecan a la dispersión de liposomas se agregó la solución de fase acuosa externa, y se llevó a cabo la remoción del fármaco encapsulado usando un sistema de filtración de flujo
20 cruzado.

(6) Regulación de la concentración

Para la dispersión de liposomas después de la remoción de los fármacos no encapsulados, se determinó una cantidad de clorhidrato de irinotecan usando una
25 cromatografía líquida de alto rendimiento, y se reguló la

concentración de clorhidrato de irinotecan a 5.0 mg/mL.

(7) Esterilización del filtro

Después de la regulación de la concentración, la dispersión de liposoma se introdujo dentro de un frasco
5 tubular a través de esterilización con filtro usando un filtro esterilizador que tenía un tamaño de poro de 0.2 μm .

Las composiciones y los tamaños de partículas de las formulaciones de CPT-11 obtenidas anteriormente se muestran en la Tabla 9.

10

[Tabla 9]

Tabla 9

	Composición de la Resina de carga (relación molar)		Concentración de Lípido		Concentración de Agente	Cantidad de Agente con respecto a la cantidad total de lípido	Tamaño de Partícula
	Lípido	PEG-DSPE	Fosfolípido (HSPC)	Cantidad total de lípido	mg/mL	Agente (mol)/Cantidad total de lípido (mol)	nm
	HSPC: Chol		mg/mL	mM			
Equipo de Preparación Ejemplo 11	54:46	0.85	20	47	4.92	0.16	97.2

7/6

(Ejemplo de ensayo 6) Efecto antitumoral.

2.5 x 10⁶ células/ratón de células de cáncer prostático humano (PC-3) se implantaron subcutáneamente en la región inguinal izquierda del ratón (BALB/c desnudos, machos, de 6 semanas de vida, Charles River Japan, Inc.) Después de implantar los tumores, se calculó el volumen presunto del tumor mediante $1/2 ab^2$ (a representa un diámetro longitudinal de un tumor y b representa un diámetro de eje corto del mismo). Desde el día siguiente hasta un día (día 0) en el cual el volumen presunto del tumor fue de aproximadamente 40 mm³, tres veces cada cuatro días (días 1, 5, y 9), se inyectó en la vena de la cola del ratón una preparación de CPT-11 preparado en el Ejemplo de Preparación 11 o una solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecan. Se dejó un ratón sin inyección de cada agente como grupo de control.

Se midieron el volumen presunto del tumor y el peso corporal de un ratón en los días 1, 5, 9, 12, 16 y 22. Después de extraer los tumores y medir el peso de los mismos en el día 22, adicionalmente se calculó el régimen de inhibición del crecimiento del tumor IR (%), mediante la fórmula siguiente.

$$I.R. \% = (1 - \text{peso promedio del tumor en un grupo de tratamiento} / \text{peso promedio del tumor en un grupo de control}) \times 100$$

La Tabla 10 y la Figuras 6 y 7 muestran los

resultados.

La preparación de CPT-11 y la solución salina fisiológica del clorhidrato de irinotecan, demostraron, cada uno, un efecto supresor significativo del crecimiento del tumor para cáncer prostático humano comparando el grupo de tratamiento con el grupo de control. La preparación de CPT-11 mostró un efecto antitumoral mayor que el de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecan (Tabla 10, Figura 6). Además, ambos agentes no influenciaron el peso corporal del ratón (Figura 7).

[Tabla 10]

Tabla 10

15		Dosis (mg/kg)	Peso del Tumor (g, promedio ± S.D)	Régimen de Inhibición (%)
20	Grupo de control	-	1.26±0.18	-
	Preparación de CPT-11	25	0.03±0.01	97.9
	(Ejemplo de Preparación	50	0.02±0.00	98.3
	11)	100	0.01±0.00	99.0
	Solución Fisiológica	25	0.064±0.25	49.0
	Salina de Clorhidrato de	50	0.66±0.13	48.0
25	Irinotecan	100	0.48±0.20	62.3

(Ejemplo de ensayo 7) Farmacocinética

La preparación de CPT-11 preparado en el Ejemplo de Preparación 11 o la solución salina fisiológica del clorhidrato de irinotecan, se inyectó continuamente a una vena cefálica de un mono macaco (macho, de 4 a 5 años, guangxi Research Center of primate Laboratory animal) durante 4 minutos hasta lograr un contenido de clorhidrato de irinotecan con 10 mg/kg.

Se recogió sangre del macaco inmediatamente después de la inyección y antes de comenzar la aplicación de la inyección; después de 10 y 30 minutos; y después de 1, 6, 24, 48, 72, 168, 336, y 504 horas; se obtuvo plasma de la sangre por separación centrífuga. Se proveyeron 50 µL de plasma de sangre con 550 µL de una solución B convencional interna (una solución de metanol de sustancias convencionales internas), y se empleó fuerza centrífuga, se diluyó el sobrenadante con metanol 100 veces como muestra para la medición de la concentración total de CPT-11. Mientras tanto, se proveyeron 50 µL de cada plasma de sangre con 200 µL de una solución A convencional interna (0.147 mol/L de solución H₃PO₄ de sustancias convencionales internas), se sometieron 200 µL de las mismas a una separación centrífuga (100.000 x g, durante 30 minutos, a 10°C). Se separaron 100 µL en la capa superior y se empleó extracción de fase sólida para obtener la

solución de agotamiento como muestra para la medición de la concentración de CPT-11 libre, es decir, el CPT-11 liberado del liposoma, denominado a continuación "CPT-11 liberador de liposomas", la medición de la concentración de SN-38 y la
5 medición de la concentración de SN-38G (SN-38 10-0-glucónido). Las muestras obtenidas se midieron en cada concentración de las mismas con LC/MS/MS. Las figuras 8 a 11 muestran los resultados.

En la solución salina fisiológica del clorhidrato
10 de irinotecan, la concentración total de CPT-11 se redujo rápidamente después de la inyección y se redujo a menos del límite más bajo de conteo ($<1\mu\text{g/mL}$) a 1 hora.

Mientras tanto, para la preparación de CPT-11, la concentración total de CPT-11 se redujo exponencialmente
15 desde 1 a 48 horas después de la inyección, y se reconoció una extensión suficiente del tiempo de retención en comparación con el de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecan. (Figura 8)

En la solución salina fisiológica de clorhidrato de
20 irinotecan, la concentración de CPT-11 libre, CPT-11 liberado por liposomas se redujo en forma relativamente rápida hasta 6 horas después de obtener la concentración más elevada inmediatamente después de la inyección, después de lo cual se redujo moderadamente la concentración. Mientras tanto, en la
25 preparación de CPT-11, la concentración de CPT-11 libre logró

la concentración más elevada en 1 hora después de la inyección, y luego se redujo moderadamente (Figura 9).

En la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecan, la concentración de SN-38 se redujo rápidamente
5 después de obtener la concentración más alta inmediatamente después de la inyección, y se dedujo menos del límite más bajo de conteo ($<0.0005 \mu\text{g/mL}$) a 24 horas. Mientras tanto, para la preparación de CPT-11, la concentración de SN-38 se mantuvo durante 1 hora después de lograr la concentración más
10 alta inmediatamente después de la inyección. A la concentración se redujo después de mantenerse desde 6 hasta 48 horas (Figura 10).

Tanto para preparación de CPT-11 como para la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecan, la
15 concentración de SN-38G se incrementó en 1 hora después de la inyección, para reducirse ligeramente con mantenimiento de la concentración (Figura 11).

(Ejemplo de ensayo 8) Hemotoxicidad

La preparación de CPT-11 preparada en el Ejemplo de
20 Preparación 11 se inyectó en la vena de la cola de una rata (CD(SD) ratón IGS, macho, de 7 semanas de vida, Charles River Japan, Inc.) hasta satisfacer un contenido de clorhidrato de irinotecan de 3, 10 y 30 mg/kg, o satisfacer la solución salina fisiológica del clorhidrato de irinotecan con 30
25 mg/kg.

Se recogió sangre de 0.4 mL, de una vena cervical de rata antes y después de la inyección; y después de 2, 4, 6, 13, 20 y 27 días (durante 4 semanas); se midió la cantidad de neutrófilos y linfocitos con un analizador hematológico automático (Sysmex XT-2000i, Sysmex). Las Figuras 12 y 13 muestran los resultados.

La cantidad de neutrófilos se redujo transitoriamente, para recuperarse rápidamente después de esto con cualquier cantidad de inyección. A una dosis de 10 y 30 mg/kg como contenido de clorhidrato de irinotecan en comparación con 3 mg/kg de contenido, el grado de reducción de cantidad fue amplio. A una dosis de 30 mg/kg la cantidad aumentó rápidamente en el periodo de recuperación. En 30 mg/kg en cada uno de ambos agentes de inyección, no se reconocieron diferencias significativas entre transiciones en la cantidad de neutrófilos (Figura 12). La cantidad de linfocitos declinó inmediatamente después de la inyección a pesar de que fue solo ligeramente. Sin embargo, no hubo diferencias entre las inyecciones (Figura 13).

Los resultados anteriores descritos, reconocen una débil hematoxicidad transitoria para los neutrófilos en la preparación de CPT-11. Sin embargo, la intensidad de hematoxicidad fue aproximadamente igual a la de la misma cantidad de solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecan.

[Ejemplo 9]

(Ejemplo de Preparación 12)

(1) Preparación del liposoma

5 Se pesaron 65.250 g de HSPC, 26.800 de Chol y 8,000 g de TRX-20 y se agregaron a los mismos 100 mL de etanol absoluto. Luego se disolvieron con calentamiento a 68°C. Después de confirmar que se habían disuelto completamente, se agregaron 900 mL de una solución de sulfato de amonio (250
10 mM), la mezcla se agitó con calentamiento a 68°C.

(2) regulación del tamaño de partícula del liposoma

Regulación del tamaño de partícula del liposoma: después de completar la agitación con calentamiento, se pasó la mezcla resultante a través de un filtro que tenía el
15 tamaño de poro de 100 nm cinco veces usando un extrusor calentado a 68°C.

Introducción de PEG₅₀₀₀-DSPE: después de la extrusión, se agregaron a la muestra 200 mL de una solución de PEG₅₀₀₀-DSPE (36.74 mg/mL) para tener un contenido de
20 PEG₅₀₀₀-DSPE predeterminado (% molar), y la mezcla se agitó a 60°C durante 30 minutos para introducir PEG₅₀₀₀-DSPE. Después de la introducción se enfrió la muestra en hielo

(3) Sustitución de fase acuosa externa

Para la muestra enfriada con hielo, se efectuó una
25 sustitución de fase acuosa externa usando un sistema de

filtración de flujo cruzado con una solución de fase acuosa externa (solución de 10 mM de histidina/10% de sucrosa) (pH 6.5). Después de la sustitución de la fase acuosa externa, se determinó la concentración de HSPC y la concentración de colesterol, usando una cromatografía líquida de alto rendimiento. La cantidad de clorhidrato de irinotecan que debería estar encapsulada se calculó a partir de la suma de la concentración de HSPC, la concentración de colesterol y la concentración TRX-20 como concentración total de lípidos.

10 (4) Encapsulación del fármaco

Se preparó una solución de clorhidrato de irinotecan (CPT-11)/agua RO (agua purificada por membrana de ósmosis inversa) que tenía una concentración de 10 mg/mL. La solución de clorhidrato de irinotecan se agregó a la dispersión de liposoma en una cantidad de CPT-11/cantidad de lípidos totales = 0.16 (mol/mol) con respecto a la cantidad total de lípidos (mM) anterior, y la mezcla se agitó a 50°C durante 20 minutos, para introducir de esta manera clorhidrato de irinotecan. Después de la introducción la muestra se enfrió en hielo.

 (5) Remoción del fármaco no encapsulado

Después de la encapsulación del clorhidrato de irinotecan a la dispersión de liposoma, se le agregó la solución de fase acuosa externa, y se efectuó la remoción del fármaco no encapsulado usando un sistema de filtración de

flujo cruzado.

(6) Regulación de la concentración

Para la dispersión de liposoma después de la remoción de fármacos no encapsulados, se determinó una
5 cantidad de clorhidrato de irinotecan usando cromatografía líquida de alto rendimiento y se reguló a 5.0 mg/mL de concentración de clorhidrato de irinotecan.

(7) Esterilización del filtro

Después de la regulación de la concentración, la
10 dispersión de liposoma se introdujo dentro de un frasco tubular a través de una esterilización con filtros usando un filtro esterilizado que tenía un tamaño de poro de 0.2 μm .

Las composiciones y los tamaños de partículas de las formulaciones de CPT-11 obtenidas anteriormente se
15 muestran en la Tabla 11.

[Tabla 11]

Tabla 11

5		Composición de la Resina de carga (relación molar)		Concentración de Lípido		Concentración de Agente	Cantidad de Agente con respecto a la cantidad total de lípido	Tamaño de Partícula
10		Lípido	PEG-DSPE	Fosfolípido (HSPC)	Cantidad total de lípido	mg/mL	Agente (mol)/Cantidad total de lípido (mol)	nm
		HSPC: Chol		mg/mL	mM			
15	Preparación del Ejemplo 12	50:42:8	0.75	18	44	4.66	0.15	92.0

104

(Ejemplo de ensayo 9) Efecto antitumoral

2 x 10⁶ células/ratón de células de cáncer de colon humano (HCT116) se implantaron subcutáneamente en la región inguinal izquierda del local (BALB/c desnudo, δ , de 6 semanas de vida, Charles River Japan, Inc.). Después de implantar los tumores, se calculó el volumen tumoral presunto mediante $1/2 \cdot ab^2$ (a representa un diámetro longitudinal de un tumor y b representa un diámetro corto del eje del mismo) se obtuvieron hasta aproximadamente 90 mm³ en un día (día 0).
10 Desde el día siguiente, en 3 veces cada cuatro días (días 1, 5 y 9), una preparación de CPT-11 preparado en el Ejemplo de Preparación 12 o una solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecan se inyectó a una vena de la cola del ratón. En cada agente hubo un ratón sin inyección como
15 grupo de control.

Se midió el volumen presunto del tumor y el peso corporal del ratón después de 5, 8, 12, 16 y 21 días desde la inyección. Extrayendo tumores 21 días después de la inyección y midiendo el peso de los mismos, adicionalmente, se calculó
20 el régimen de inhibición del crecimiento del tumor I.R. (%) mediante la fórmula que se muestra en el Ejemplo de Ensayo 6.

La Tabla 12 y las Figuras 14 y 15 muestran los resultados.

La preparación de CPT-11 y la solución salina
25 fisiológica de clorhidrato de irinotecan, demostraron, cada

uno, un efecto supresor significativo del crecimiento del tumor para cáncer de colon humano, comparando el grupo de tratamiento con el grupo de control. La preparación de CPT-11 demostró un efecto antitumoral mayor que el de la solución salina fisiológica de clorhidrato de irinotecan (Tabla 12, Figura 14). Además, ninguno de los dos agentes influenció el peso corporal del ratón (Figura 15).

Tabla 12

		Dosis (mg/kg)	Peso del Tumor (g, promedio ± S.D)	Régimen de Inhibición (%)
10	Grupo de control	-	1.25±0.15	-
15	Preparación de CPT-11 (Ejemplo de Preparación 12)	18.75	0.61±0.11	51.1
		37.5	0.36±0.07	70.8
		75	0.14±0.03	88.7
	Solución Fisiológica	18.75	0.76±0.06	39.0
20	Salina de Clorhidrato de Irinotecan	37.5	0.71±0.08	43.4
		75	0.53±0.14	57.4

(Ejemplo de ensayo 10) Farmacocinéticas debida a una unica administracion

Despues de aplicar canulas a la vena femoral y la
5 vena femoral de la rata (CD(SD) raton IGS, macho, de 7
semanas de vida, Charles River Japan, Inc) bajo anestesia, y
dejar la rata en la jaula bollman, la preparacion de CPT-11
preparada en el Ejemplo de Preparacion 12 o la solucion
salina fisiológica de clorhidrato de irinotecan se inyectora
10 intravenosamente a traves de la canula de la vena femoral, a
la rata hasta satisfacer un contenido de clorhidrato de
irinotecan de 3, 10 y 30 mg/kg

Se recogio sangre de la rata despues de la
inyeccion, despues de 2, 10 y 30 minutos, y después de 1, 3,
15 6, 9 24 y 30 horas, se obtuvieron 50 µL de plasma de la
sangre por separacion centrifuga, para diluirla con 200 µL de
una solución convencional interna Después de proveer 50 µL
del plasma de sangre diluido con la solucion convencional
interna con 500 µL de metanol y agitacion, se diluyo el
20 plasma de la sangre diluido con 0.146 M de H_3PO_4 10 veces como
muestra para la medicion de la concentracion total de CPT-11
Mientras tanto, se sometieron 200 µL del plasma de sangre
diluido para separacion centrifuga (100 000 x g, durante 30
minutos, 10°C), y los 50 µL obtenidos en la capa superior se
25 diluyeron con 0.146 M de H_3PO_4 10 veces como muestra para la

medicion de la concentracion de CPT-11 libre, medicion de la concentraci3n de SN-38 y medicion de la concentracion de SN-38G Cada concentracion de las muestras obtenidas se midio con PROPEKT-HPLC de acuerdo con metodos tales como el metodo
5 de Kurita (J Chromatogr B 724, p335 to 344, 1999) Las figuras 16 a 19 muestran los resultados

En la solucion salina fisiologica de clorhidrato de irinotecan, la concentracion total de CPT-11 se redujo rapidamente despues de la inyeccion y se redujo
10 exponencialmente desde 0 5 a 9 horas con cualquiera cantidad de inyeccion (3, 10 y 30 mg/kg) Mientras tanto, para la preparacion de CPT-11, la concentracion de CPT-11 total se redujo casi exponencialmente desde 10 minutos a 30 horas despues de la inyeccion, y se reconocio una extension
15 suficiente de tiempo de retencion en comparacion con la de la solucion salina fisiologica del clorhidrato de irinotecan (Figura 16)

La concentraci3n de CPT-11 liberado por liposomas se redujo casi exponencialmente desde 10 minutos a 30 horas
20 despues de la inyeccion de la preparacion de CPT-11, y se reconocio una extension suficiente de tiempo de retencion en comparacion con la de la solucion salina fisiologica del clorhidrato de irinotecan (Figura 17)

En la solucion salina fisiologica de clorhidrato de
25 irinotecan, la concentracion de SN-38 se redujo rapidamente,

justo despues de la inyeccion, y se redujo moderadamente despues de una hora con cualquier cantidad de inyeccion, para conservarse aproximadamente a las 3 horas con 30 mg/kg Mientras tanto para la preparacion de CPT-11, la
5 concentracion de SN-38 se redujo moderadamente despues de lograr la concentracion mas elevada desde 3 a 6 horas después de la inyeccion en dosis de 3 y 10 mg/kg, respectivamente (Figura 18) La concentracion se redujo rapidamente durante 1 hora despues de obtener la concentracion mas alta
10 inmediatamente despues de la inyeccion, para conservarse aproximadamente a las 9 horas con las cantidades de inyeccion de 30 mg/kg (Figura 18)

En la solucion salina fisiologica de clorhidrato de irinotecan, la concentracion de SN-38G se redujo rapidamente
15 a 1 hora despues de lograr la concentraci3n m3s alta a los 10 minutos despues de inyeccion con una cantidad de inyeccion para reducirse moderadamente despues de esto Mientras tanto para la preparacion de CPT-11, la concentracion de SN-38G se incremento hasta 1 hora despues de la inyeccion para
20 reducirse ligeramente manteniendo la concentraci3n (Figura 19)

[Ejemplo 10]

La formulacion de CPT-11 preparada en el Ejemplo de
25 Preparacion 9 se ensayo como formulaci3n de CPT-11 con un

portador elevado, en la presente invencion

(Ejemplo de Ensayo 11) Efecto antitumoral

Se transplantaron celulas de cancer de colon humano (HT-29) con 2 a 3 mm cuadrados, en la parte subcutánea inguinal de un raton (BALB/c desnudo, macho, de 6 semanas de vida, CLEA Japan, Inc) con una aguja para transplante La formulacion de CPT-11 preparada en el Ejemplo de Preparacion 9 o una solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan se inyectaron a la vena caudal tres veces en total, lo cual fue en un punto (dia 1) en el que el volumen estimado de tumores calculado por $1/2 ab^2$ (a se refiere a un eje principal de cada tumor, b se refiere a un eje menor) se acerco a alrededor de los 100 mm^3 , 4 dias adicionales (dia 5) y 8 dias adicionales (dia 9), despues del transplante de tumores Se empleo un raton sin inyección del farmaco como grupo de control

El volumen estimado de tumores y el peso corporal del raton se calcularon a los 4, 8, 12, 17, 21 dias despues de la primera inyeccion Tambien se extrajeron los tumores 21 dias despues de la inyeccion, y se midio el peso de los tumores, para calcular de este modo el regimen de inhibicion de proliferacion del tumor, I R (%) mediante la formula que se muestra en el Ejemplo de Ensayo 6

Los resultados se muestran en la Tabla 13, figura 20 y figura 21

En el cancer de colon humano, la formulacion de CPT-11 y la solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan, mostraron un fuerte efecto inhibidor de la proliferación del tumor en comparación con el del grupo de control. Además, la formulacion de CPT-11 revelo un alto efecto antitumoral en comparacion con el de la solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan (Tabla 13, Figura 20). Además, ninguno de los dos fármacos afecto el peso corporal del raton (Figura 21).

[Tabla 13]

Tabla 13

		Dosis (mg/kg)	Peso del tumor (g, promedio ± S D)	Regimen de inhibicion (%)
	Grupo de Control	-	0 58 ± 0 29	-
	Formulacion de CPT-11 (Ejemplo de Preparacion 9)	25	0 18 ± 0 15	69 4
		50	0 09 ± 0 06	84 1
		100	0 05 ± 0 03	92 0
	Solucion salina acuosa de clorhidrato de irinotecan	25	0 36 ± 0 41	38 2
		50	0 44 ± 0 36	24 9
		100	0 33 ± 0 32	44 0

(Ejemplo de Ensayo 12) Farmacocinetica debida a una administracion unica

Se transplantaron fibrosarcoma de raton (Meth A),
5 2 5 x 10⁵ células/raton en la parte subcutanea inguinal de un
ratón (BALB/c, macho, 7 semanas de vida, Japan SLC, Inc)
Los tumores se dejaron para maduracion en 20 dias despues del
transplante de los tumores y luego se preparo la formulacion
de CPT-11 en el Ejemplo de Preparacion 9 o se administro una
10 solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan a la vena
caudal con 10 mg/kg como concentracion de clorhidrato de
irinotecan

Después de la administracion, se recogio sangre del
corazon después de 10, y 30 minutos, y 1, 3, 5, 12, 24, 48 y
15 96 horas, y se trato en una centrifugadora (15 000 rpm, 1
minuto, 0°C), para obtener de esta manera plasma El plasma
obtenido se diluyó 50 veces con 0.146 M de H₃PO₄ y se agrego a
una cantidad igual de solucion convencional interna, como
muestra para la medicion de la concentracion de CPT-11 en el
20 plasma de un animal, al que se le administro la formulacion
de CPT-11 El plasma obtenido se diluyo 4 veces con 0.146 M
de H₃PO₄, y se agregó a una cantidad igual de solucion
convencional interna, como muestra para la medicion de una
concentracion de SN-38 y una concentracion de SN-38G cada una
25 en el plasma del animal al que se le administro la

formulacion de CPT-11, y se administro una concentracion en el plasma del animal con la solución acuosa salina de clorhidrato de irinotecan

Despues de recoger la sangre del corazon, se
5 extrajeron tumores del area inguinal y se lavaron con
solucion fisiológica, y luego se midio el peso del tumor El
tumor resultante se agrego a una cantidad de 5 veces de H_3PO_4
de 0.146 M enfriado, y se homogeneizó con un homogeneizador
de teflon Se agregaron 200 μ l del tumor homogeneizado
10 resultante a 50 μ l de una solución convencional interna y
0.75 ml de metanol, se suspendieron y luego se dejaron en
reposo durante la noche a $-20^\circ C$ Se trato la solucion
resultante en una centrifugadora (15 000 rpm, 3 minutos, $0^\circ C$)
antes de agregar 0.4 ml de H_3PO_4 0.146 M a 0.1 ml de
15 sobrenadante, para obtener de esta manera una muestra para la
medicion de HPLC Cada concentracion de la muestra resultante
para la medición se medio con un PROSPEKT-HPLC de acuerdo con
el metodo de Kurita (J Chromatogr B 724, pp 335-344, 1999),
o similares Los resultados se muestran en las figuras 22 a
20 27

La formulación de CPT-11 aumento un área bajo la
concentracion en la curva de plasma-tiempo hasta 302 veces, y
un tiempo de residencia promedio de hasta 4.4 veces en
comparacion con las de la solucion acuosa salina de
25 clorhidrato de irinotecan, debido respectivamente a la

formulacion de liposoma, en la concentraci3n de CPT-11 en el plasma (Figura 22) Mientras tanto, la formulacion de liposoma de la formulacion de SN-38 aumento en un area bajo la concentracion de la curva de plasma-tiempo hasta 2 5 veces
5 tal como para la concentracion de SN-38 en el plasma, y extendio un tiempo de residencia promedio debido a la administracion de una formulacion de liposoma (Figura 23) Ademias, la formulacion de liposoma de la formulacion SN-38 aumento un area para la concentracion en la curva de plasma-
10 tiempo hasta 1 8 veces en lo que se refiere a la concentraci3n de SN-38G en el plasma y se extendio en un tiempo de residencia promedio (Figura 24)

En la soluci3n acuosa salina de clorhidrato de irinotecan, una concentracion de clorhidrato de irinotecan en
15 los tejidos tumorales llego a un nivel de concentracion maxima en el tejido tumoral a las 0 5 horas despues de la administracion, y luego disminuyo con 2 3 horas de vida media Mientras tanto, en la formulaci3n de CPT-11, la concentracion aumento gradualmente y alcanzo un nivel de
20 concentracion maximo en el tejido tumoral despues de 12 horas, y luego disminuyo mas suavemente que la solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan para aumentar un area bajo la concentracion en la curva de tejido tumoral-
tiempo de 9 0 veces (Figura 25)

25 En la solucion salina fisiologica de clorhidrato de

irinotecan, una concentracion de SN-38 en los tejidos tumorales alcanzó una concentracion maxima en el tejido tumoral a los 10 minutos despues de la administracion, y luego disminuyo gradualmente En la formulación de CPT-111, la concentraci3n aumento gradualmente a las 6 horas despues de la administracion y luego se mantuvo una concentracion constante aproximadamente a las 48 horas A continuacion la concentracion disminuyo hasta extinguirse en una vida media cercana a la misma vía que la de la solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan para aumentar en un area bajo la concentraci3n en la curva de tejido tumoral-tiempo de 3 9 veces (Figura 26)

En la solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan, una concentracion de SN-38G en los tejidos tumorales alcanzo una concentracion maxima en el tejido tumoral a los 10 minutos despues de la administracion, y luego disminuyo gradualmente En la formulacion de CPT-11, la concentracion aumento gradualmente, y alcanzo una concentracion máxima en el tejido corporal a las 12 horas despues de la administracion y luego disminuyo gradualmente (Figura 27)

Por lo tanto, se confirmo que las propiedades acumulables en la sangre y las propiedades transicionales del tumor en la formulacion de CPT-11 fueron mayores que las de la solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan

[Ejemplo 11]

Una formulacion de CPT-11 preparada en el Ejemplo de Preparacion 7 se ensayo como formulacion de CPT-11 que
5 tiene un portador alto en la presente invencion

(Ejemplo de Ensayo 13) Efecto antitumoral debido a la administracion de un farmaco tres veces

Un fibrosarcoma de ratón (Meth A), 2.5×10^5 células/ratón se transplanta a la parte subcutanea inguinal
10 de un ratón (BALB/c, hembra, 7 semanas de vida, CLEA Japan, Inc) La formulacion de CPT-11 preparada en el Ejemplo de Preparacion 7 o una solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan se inyectaron a una vena caudal tres veces en total, es decir, a los 7, 9 y 11 dias o a los 7, 11 y 15 dias
15 despues de transplante de los tumores Se empleo como grupo de control un raton sin inyección de farmaco

Tambien se extrajeron los tumores despues de 21 dias del transplante y se pesaron los tumores, para calcular de este modo el regimen de inhibicion de proliferacion de
20 cada tumor, I R (%) mediante la formula que se muestra en el Ejemplo de Ensayo 6 El resultado se muestra en la Tabla 14

En el fibrosarcoma de raton, la formulación de CPT-11 y la solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan mostraron cada una, un efecto inhibidor de proliferacion de
25 tumor significativo en relacion al del grupo de control

Ademas, la formulacion de CPT-11 exhibio un efecto antitumoral mas alto que el de la solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan Ademas, ninguno de los farmacos afecto el peso corporal del raton

5 [Tabla 14]

10

15

20

25

Tabla 14

		Dosis (mg/kg)	Tratamiento en los dias	Peso del tumor (g, promedio $\pm$ S D)	Régimen de inhibicion (%)
5	Grupo de	-	-	2 01 $\pm$ 0 30	-
	Control				
	Formulacion de	50	7 9 11	0 20 $\pm$ 0 17	89 9
10	CPT-11 (Ejemplo de Preparación 7)	100	7 9 11	0 08 $\pm$ 0 01	96 2
15	Formulacion de	50	7 11 15	0 81 $\pm$ 0 47	59 6
	CPT-11 (Ejemplo de Preparacion 7)	100	7 11 15	0 16 $\pm$ 0 12	92 3
20	Solucion acuosa de	50	7 11 15	1 99 $\pm$ 0 47	1 0
	salina de				
	clorhidrato de				
	irinotecan	100	7 11 15	1 26 $\pm$ 0 49	37 4

(Ejemplo de Ensayo 14) Efecto antitumoral debido a la administracion de un farmaco una o dos veces

Se transplantó un fibrosarcoma de raton (Meth A), 2.5×10^5 células/raton a la parte subcutanea inguinal de un
5 ratón (BALB/c, hembra, 7 semanas de vida, CLEA Japan, Inc)
La formulacion de CPT-11 preparada en el Ejemplo de Preparacion 7 o una solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan se inyectaron a la vena caudal a los 7 y/u 11 días una o dos veces en total despues de transplante de tumores
10 Se empleo como grupo de control un raton sin inyeccion de farmaco

Los tumores fueron tambien extraidos al cabo de 21 dias desde el transplante y se pesaron los tumores, para calcular de este modo el regimen de inhibicion de
15 proliferacion del tumor, I R (%) mediante la fórmula que se muestra en el Ejemplo de Ensayo 6 El resultado se muestra en la Tabla 15

En el fibrosarcoma de raton, la formulacion de CPT-11 y la solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan
20 mostraron cada una, un efecto inhibidor significativo de proliferación del tumor en relación al del grupo de control, por lo menos una parte de la solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan. Ademas, algunas de las formulaciones de CPT-11 exhibieron un efecto antitumoral mas
25 alto que el de la solucion acuosa salina de clorhidrato de

irinotecan Ademàs, ninguna de ambos farmacos afectó el peso corporal del raton

[Tabla 15]

Tabla 15

5

Tabla 16

10

15

20

25

	Dosis (mg/kg)	Tratamiento en los dias	Peso del tumor (g, promedio $\pm$ S D)	Regimen de inhibicion (%)
Grupo de Control	-	-	3 53 $\pm$ 0 25	-
Formulación de CPT-11 (Ejemplo de Preparacion 7)	12 5	7	1 95 $\pm$ 0 29	44 7
	25	7	1 77 $\pm$ 0 61	49 8
	50	7	1 06 $\pm$ 0 38	70 1
Solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan	12 5	7	2 82 $\pm$ 0 51	26 9
	25	7	2 61 $\pm$ 0 40	26 0
	50	7	2 34 $\pm$ 0 17	33 7
Formulacion de CPT-11 (Ejemplo de Preparacion 7)	25	11	1 70 $\pm$ 0 81	51 8
	50	11	1 41 $\pm$ 0 42	60 2
Solución acuosa salina de clorhidrato de irinotecan	25	11	2 40 $\pm$ 0 74	32 1
	50	11	1 98 $\pm$ 0 45	44 0
Formulacion de CPT-11 (Ejemplo de Preparacion 7)	12 5	7 11	1 95 $\pm$ 0 19	44 8
	25	7 11	1 63 $\pm$ 0 39	54 0
	50	7 11	0 65 $\pm$ 0 13	81 6
Solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan	12 5	7 11	2 49 $\pm$ 0 29	29 4
	25	7 11	2 33 $\pm$ 0 62	34 1
	50	7 11	2 08 $\pm$ 0 43	41 2

Ejemplo 12

La formulacion de CPT-11 preparada en el Ejemplo de Preparacion 8, se ensayo como formulacion de CPT-11 que tiene un portador de la presente invencion

(Ejemplo de Ensayo 15) Efecto antitumoral

Células de cancer de pulmon humano (QG56) con 2 a 3 mm cuadrados fueron transplantados a una parte subcutánea inguinal de un raton (BALB/c desnudo, macho, de 6 semanas de vida, CLEA Japan, Inc) con una aguja para transplante La formulacion de CPT-11 preparada en el Ejemplo de Preparacion 8 o una solucion acuosa salina de clorhidrato de irinotecan, se inyecto a una vena caudal tres veces en total, en un punto en el que (dia 1) el volumen estimado del tumor se calculo en $\frac{1}{2} ab^2$ (a se refiere al eje principal de un tumor, b se refiere a un eje menor) cercano a alrededor de 1 mm^3 , 4 dias adicionales (dia 5) y 8 dias adicionales (dia 9), despues del transplante de tumores Se empleo como grupo de control un raton sin inyeccion de farmaco

El volumen estimado de cada tumor y el peso corporal del raton se calcularon a los 4, 8, 12, 16 y 21 dias despues de la primera inyección Tambien se extrajeron tumores a los 21 dias despues de la primera inyeccion, y se pesaron los tumores, para calcular de esta manera el regimen

de inhibicion de proliferacion de cada tumor, I R (%)
mediante la formula que se muestra en el Ejemplo de Ensayo 6
Los resultados se muestran en la Tabla 16, figura 28 y en la
Figura 29

5 En las celulas de carcinoma pulmonar humano, la
formulación de CPT-11 y la solucion acuosa salina de
clorhidrato de irinotecan, mostraron un significativo efecto
inhibidor de la proliferacion del tumor en relacion al del
grupo de control Además, la formulación de CPT-11 exhibió un
10 efecto antitumoral mas elevado que el de la solucion acuosa
salina de clorhidrato de irinotecann (Tabla 16, Figura 28)
Ademas, ninguno de los farmacos afecto el peso corporal del
ratón (Figura 29)

[Tabla 16]

15			Dosis (mg/kg)	Peso del tumor (g, promedio ± S D)	Regimen de inhibicion (%)
	Grupo de Control	-	-	2 91 ± 0 21	-
	Formulacion de	25		0 03 ± 0 02	99 0
20	CPT-11 (Ejemplo de				
	Preparación 8)	50		0 02 ± 0 00	99 3
		100		0 03 ± 0 02	99 1
	Solucion salina	25		1 88 ± 0 43	35 5
	acuosa de				
	clorhidrato de	50		1 49 ± 0 51	48 7
25	irinotecan	100		0 95 ± 0 18	67 2

REIVINDICACIONES

1 Formulacion de irinotecan caracterizado porque
incluye una vesicula cerrada formada por una membrana de
lipidos, en la que el irinotecan y/o una sal del mismo estan
5 encapsulados en una concentracion de por lo menos 0.07
mol/mol (mol de farmaco/mol de lipido total de la membrana)

2 Formulacion de irinotecan de conformidad con la
reivindicacion 1, caracterizada porque la formulacion de
irinotecan tiene un gradiente ionico comprendido entre la
10 fase acuosa interna y la fase acuosa externa de la vesicula
cerrada

3 Formulacion de irinotecan de conformidad con la
reivindicacion 2, caracterizada porque el gradiente iónico es
un gradiente de concentración de protones, que tiene un
15 gradiente de pH en el que el valor de pH de la fase acuosa
interna es inferior al valor de pH de la fase acuosa externa

4 Formulacion de irinotecan de conformidad con la
reivindicacion 3, caracterizada porque el gradiente de pH se
forma mediante un gradiente de concentracion de ion amonio
20 y/o un gradiente de concentración de un compuesto organico
que tiene un grupo amino capaz de ser protonado

5 Formulacion de irinotecan de conformidad con
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada
porque la vesícula cerrada es un liposoma formado por una
25 membrana de una bicapa de lipidos que contiene un fosfolipido

como componente principal de la membrana

6 Formulacion de irinotecan de conformidad con la reivindicacion 5, caracterizada porque el liposoma contiene ademas un lípido distinto del fosfolípido y/o un agente
5 modificador de superficie

7 Formulacion de irinotecan de conformidad con la reivindicacion 6, caracterizada porque unicamente la superficie externa del liposoma esta modificada con un agente modificador de superficie que contiene un polimero
10 hidrofílico

8 Formulacion de irinotecan de conformidad con la reivindicacion 6 o 7, caracterizada además porque comprende un compuesto que tiene un grupo funcional basico como agente modificador de superficie

15 9 Composicion farmaceutica caracterizada porque comprende la formulacion de irinotecan de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8

RESUMEN

Una preparacion de irinotecan que tiene irinotecan y/o una sal del mismo altamente portado por un portador vesicular cerrado, que muestra una retencion
5 notablemente prolongada en la sangre, como se comparo con aquella de las preparaciones de liposoma de irinotecan convencionales y es capaz de estar presente en la sangre durante un periodo de tiempo prolongado Se proporciona una preparacion de irinotecan que comprende vesiculas cerradas
10 formadas de una membrana de lipido en donde el irinotecan y/o una sal del mismo se sellan en una concentracion de al menos 0.07 mol/mol (mol de medicina/mol de lipidos totales de la membrana) La preparacion de irinotecan preferiblemente tiene un gradiente ionico entre una fase
15 acuosa interna y una fase acuosa externa dentro de las vesiculas cerradas Las vesiculas cerradas son preferiblemente liposomas, y los liposomas preferiblemente tienen sólo la superficie externa del mismo modificado con un modificador de superficie que contiene un polimero
20 hidrofílico

1/21
FIGURA 1

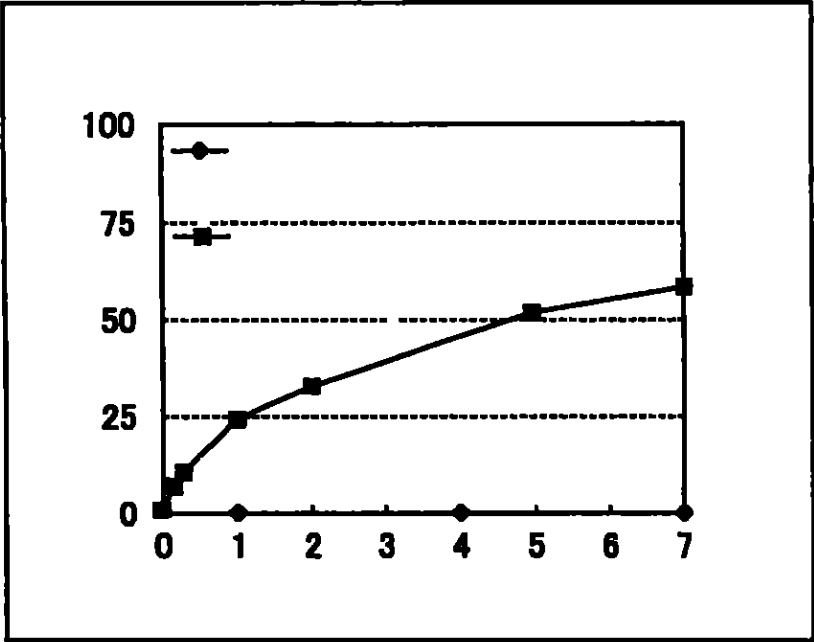
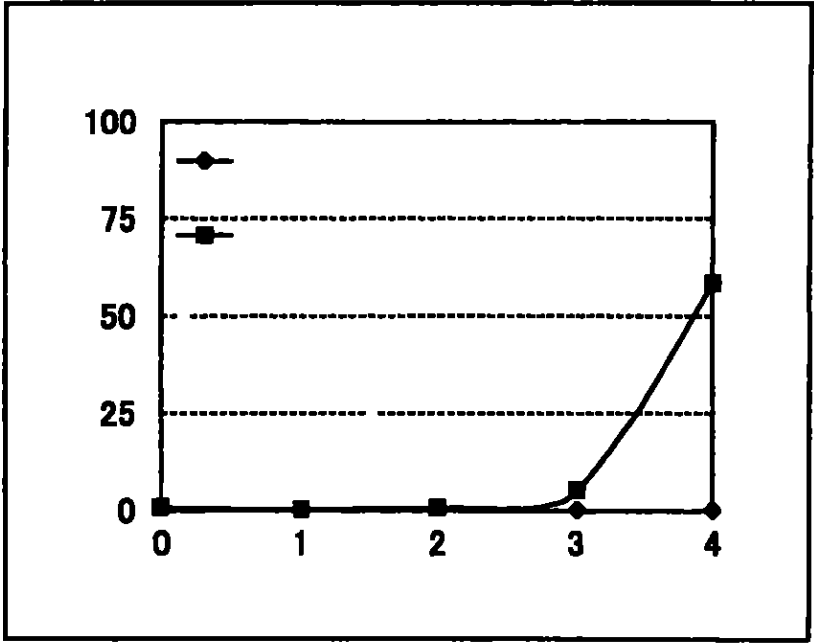


FIGURA 2



2/21
FIGURA 3

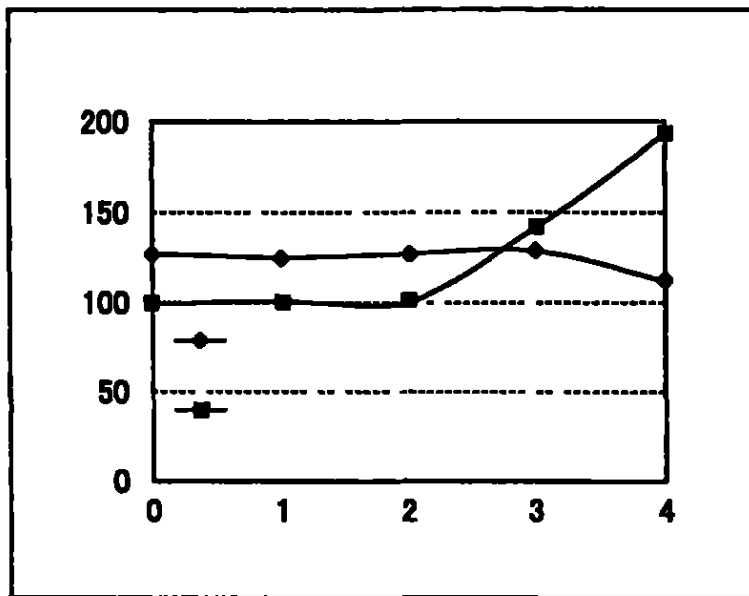
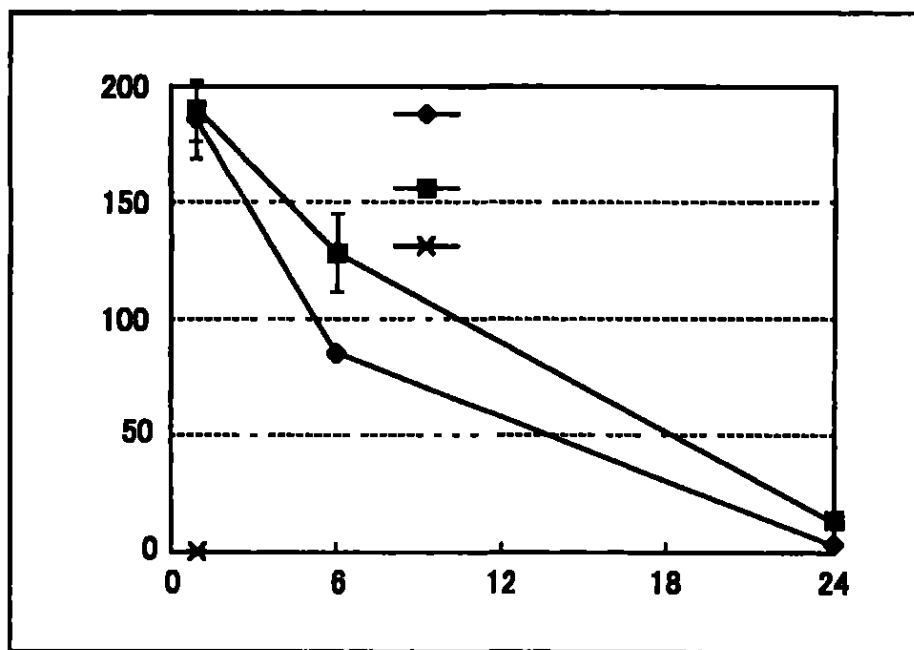
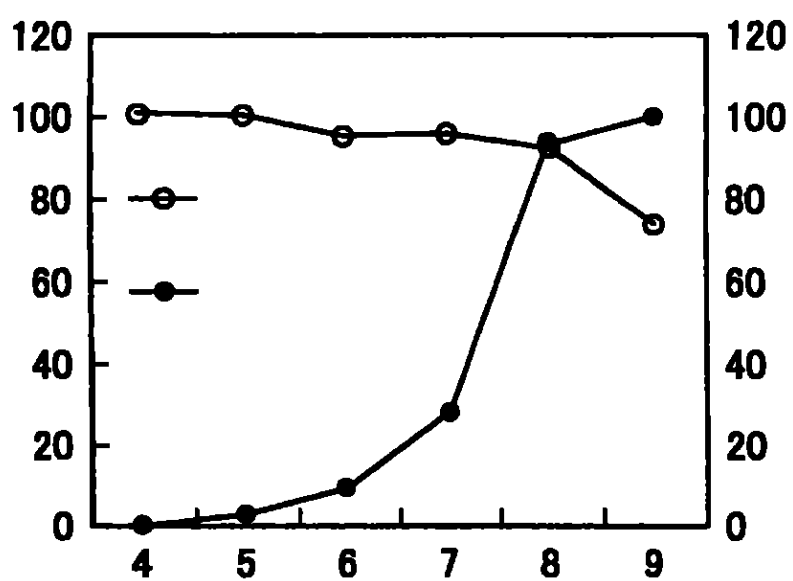


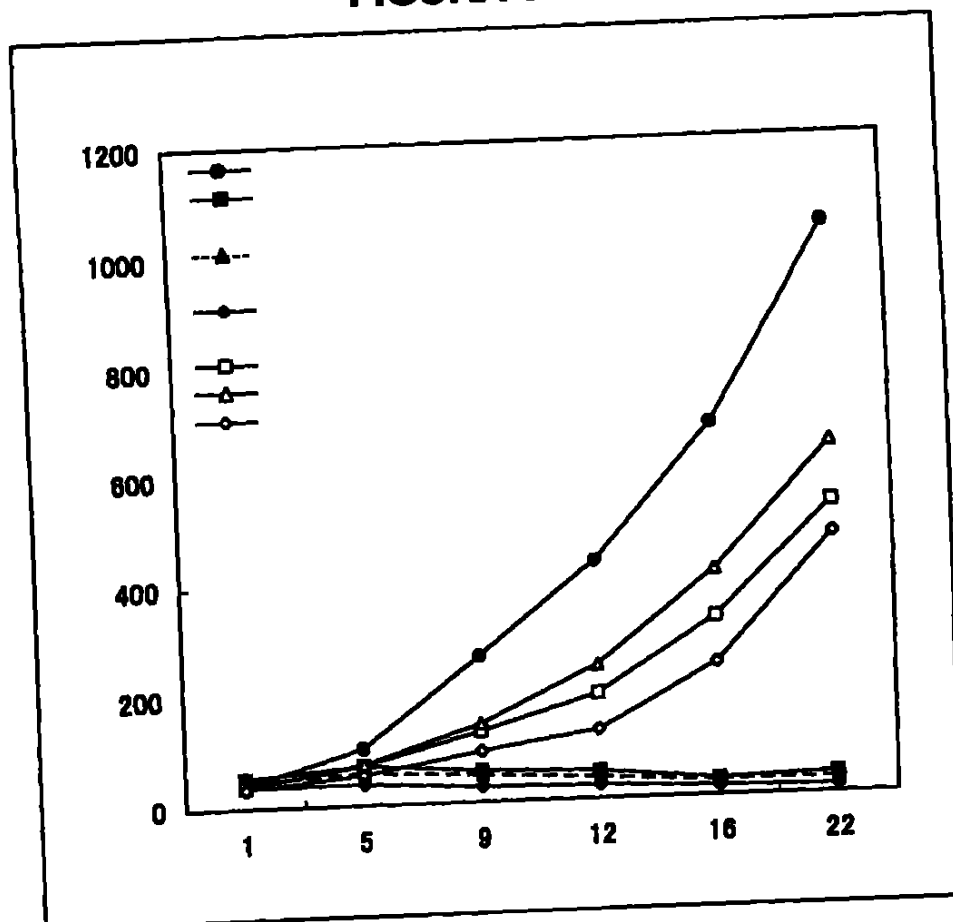
FIGURA 4



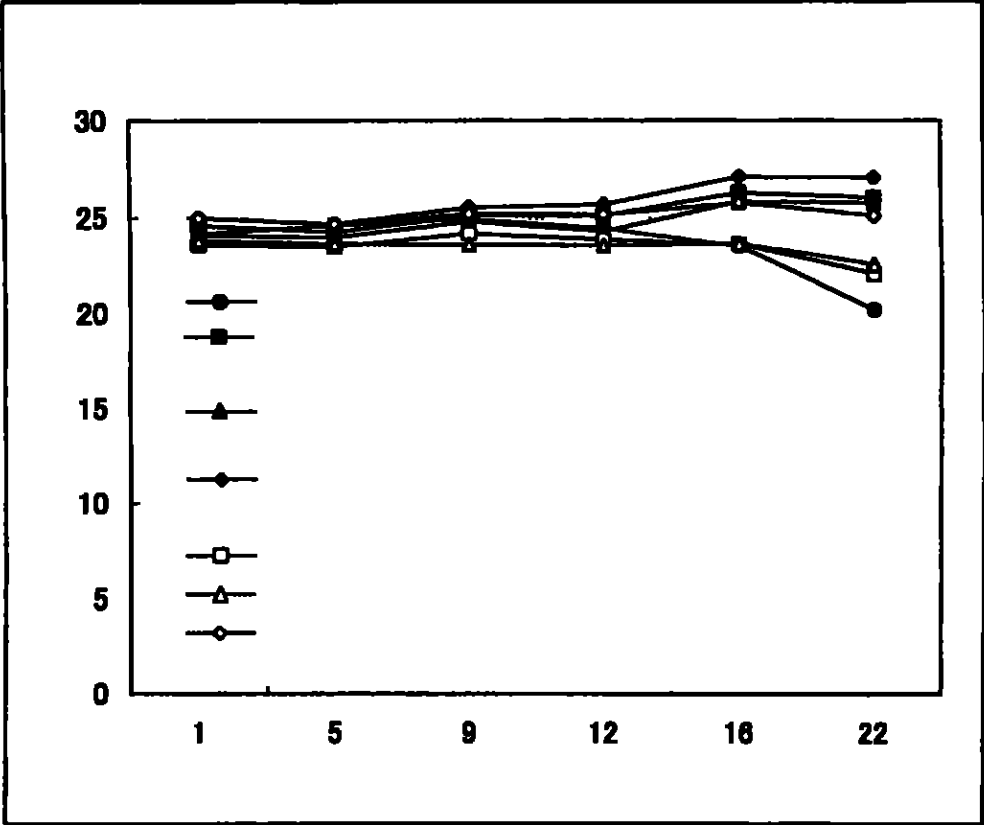
3/21
FIGURA 5



4/21
FIGURA 6



5/21
FIGURA 7



6/21
FIGURA 8

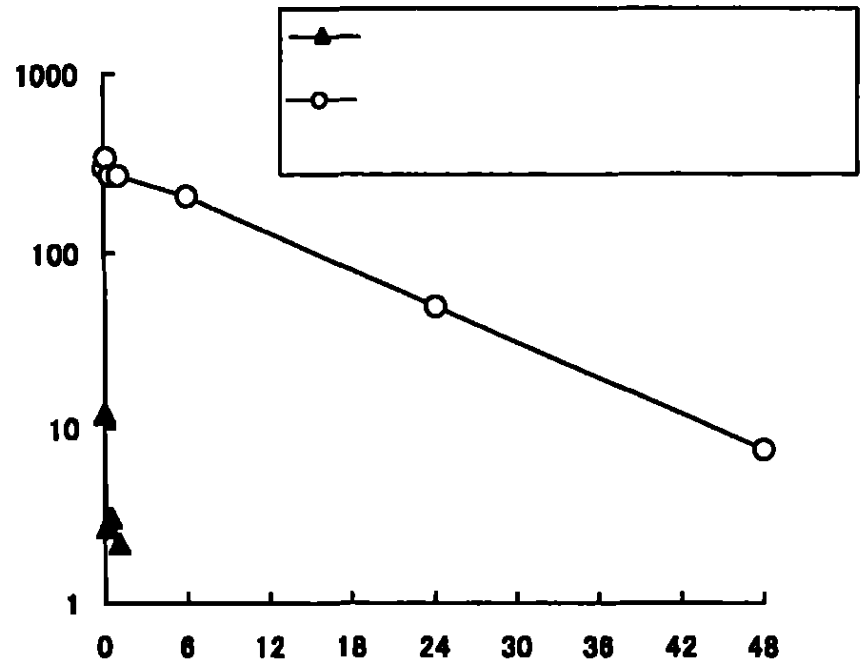
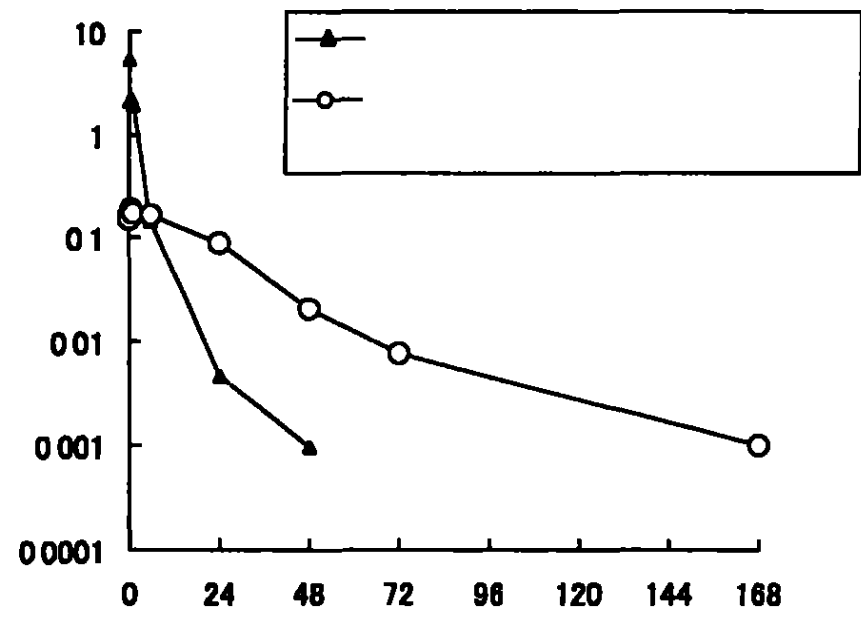


FIGURA 9



7/21
FIGURA 10

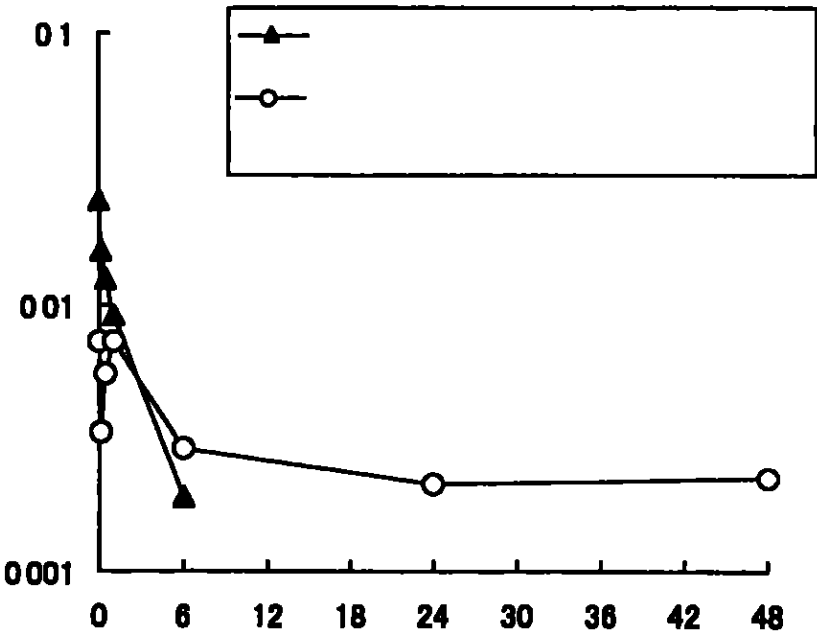
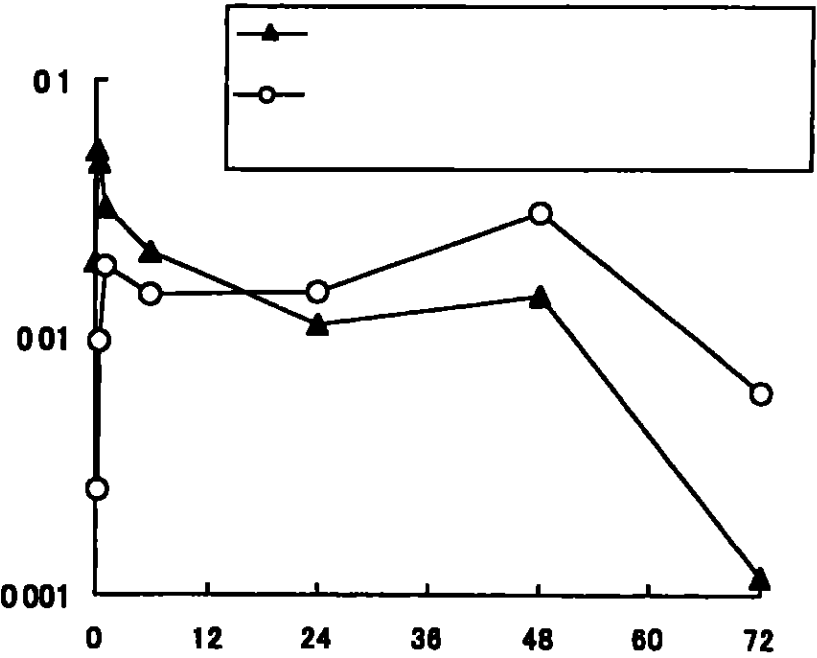


FIGURA 11



8/21
FIGURA 12

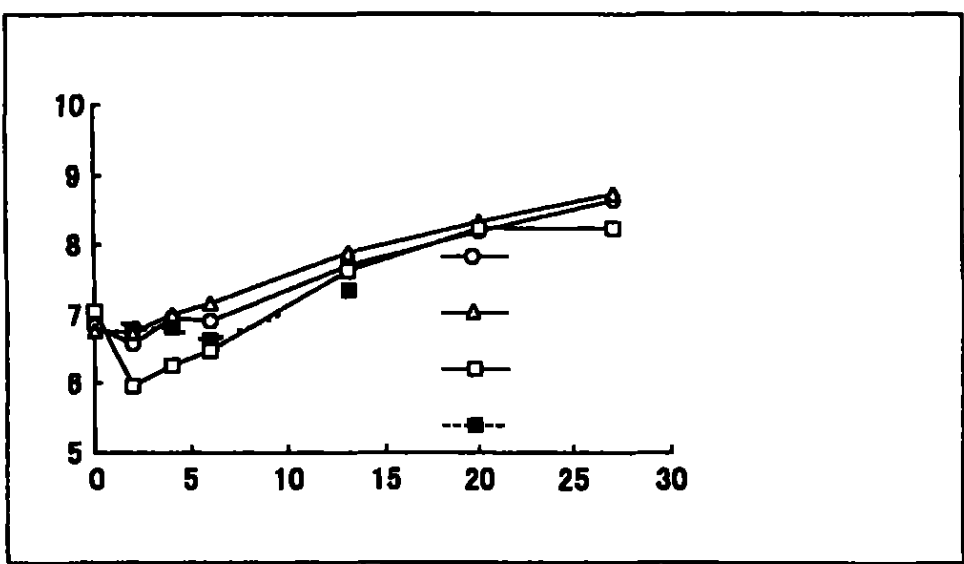
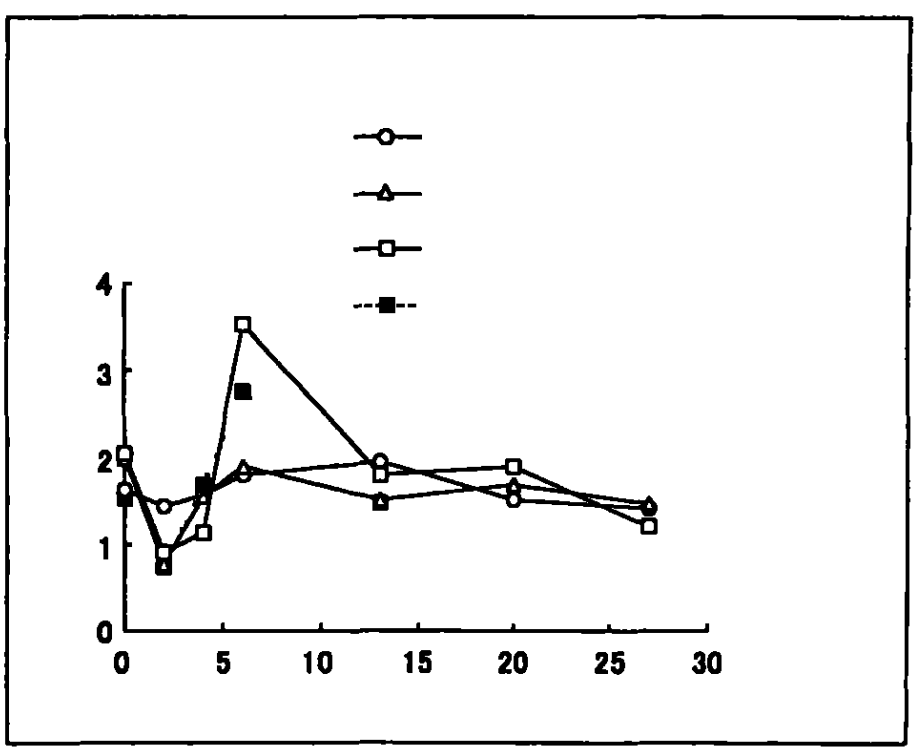
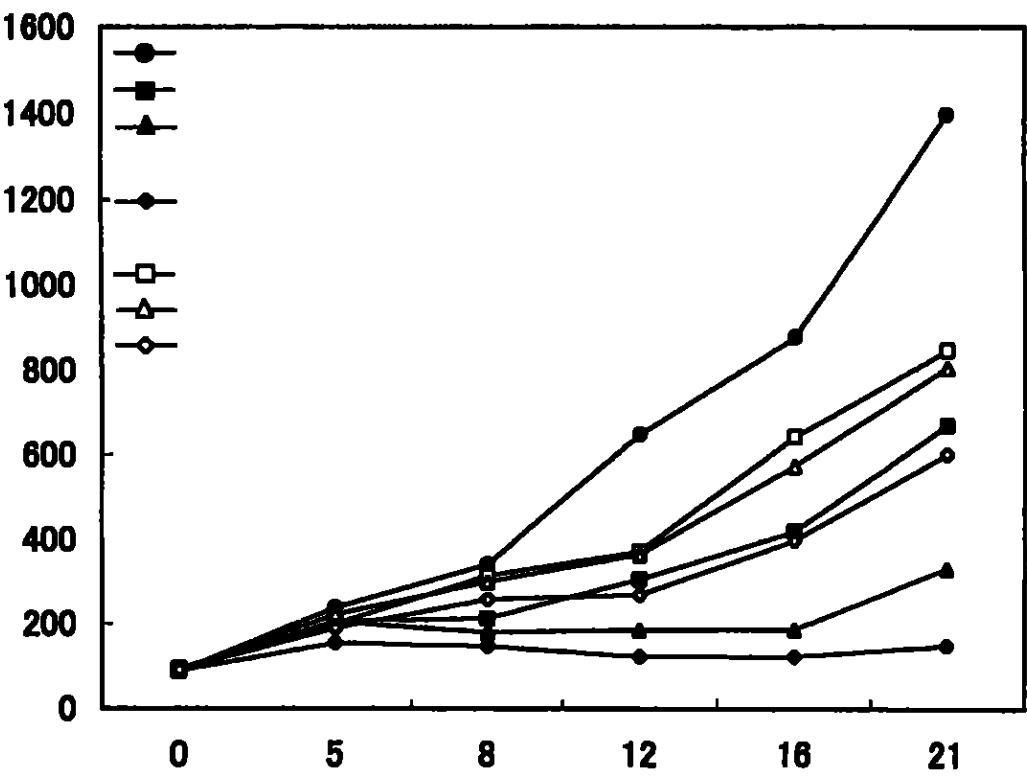


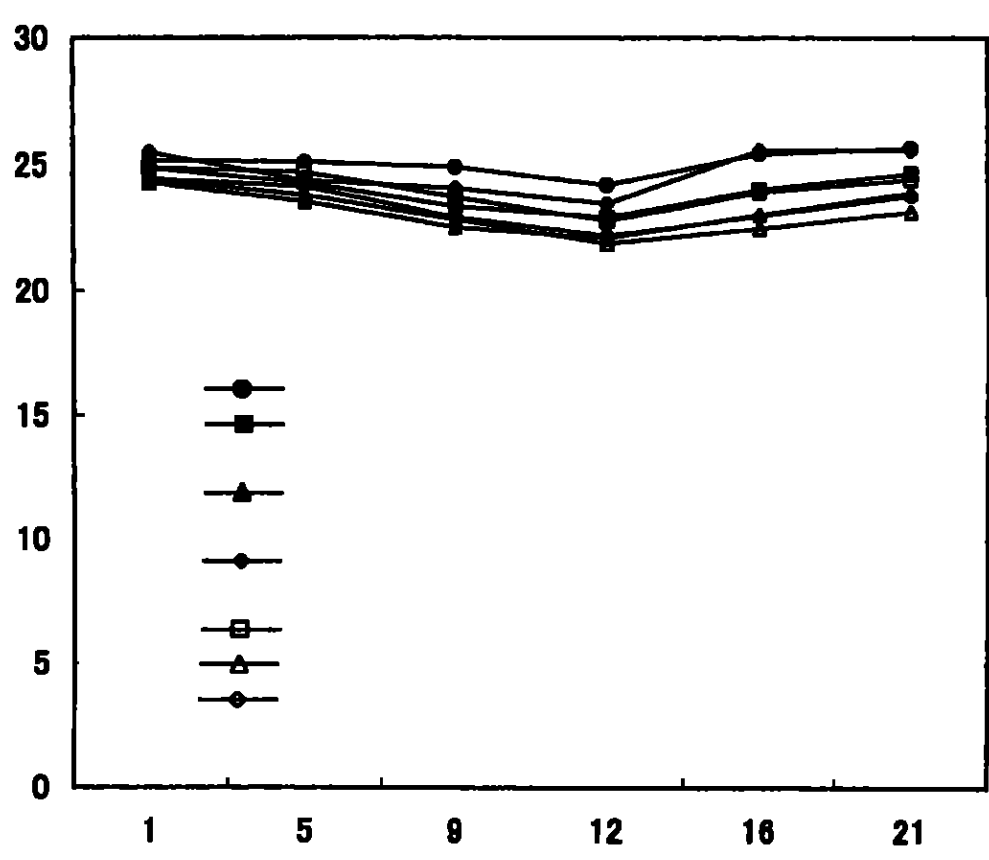
FIGURA 13



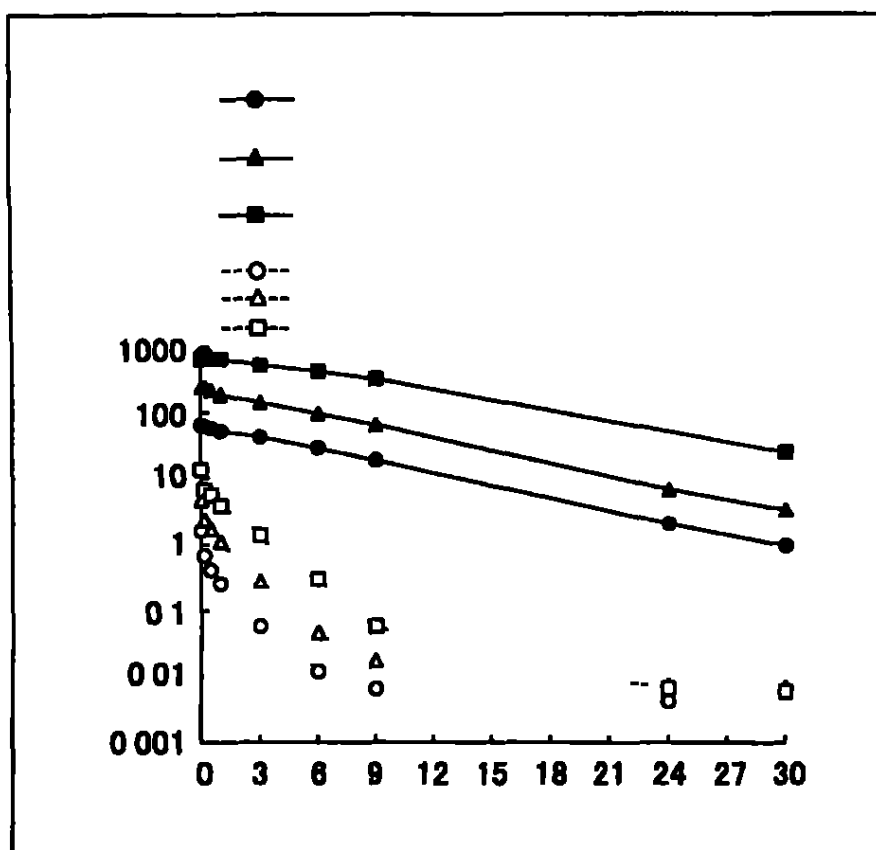
9/21
FIGURA 14



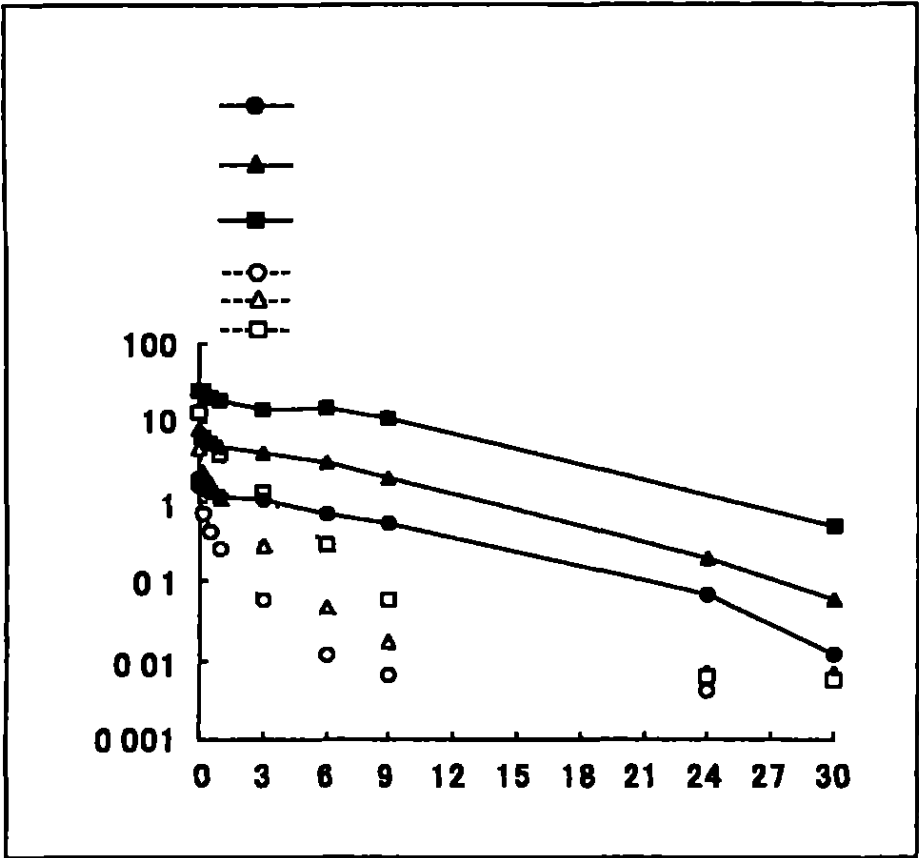
10/21
FIGURA 15



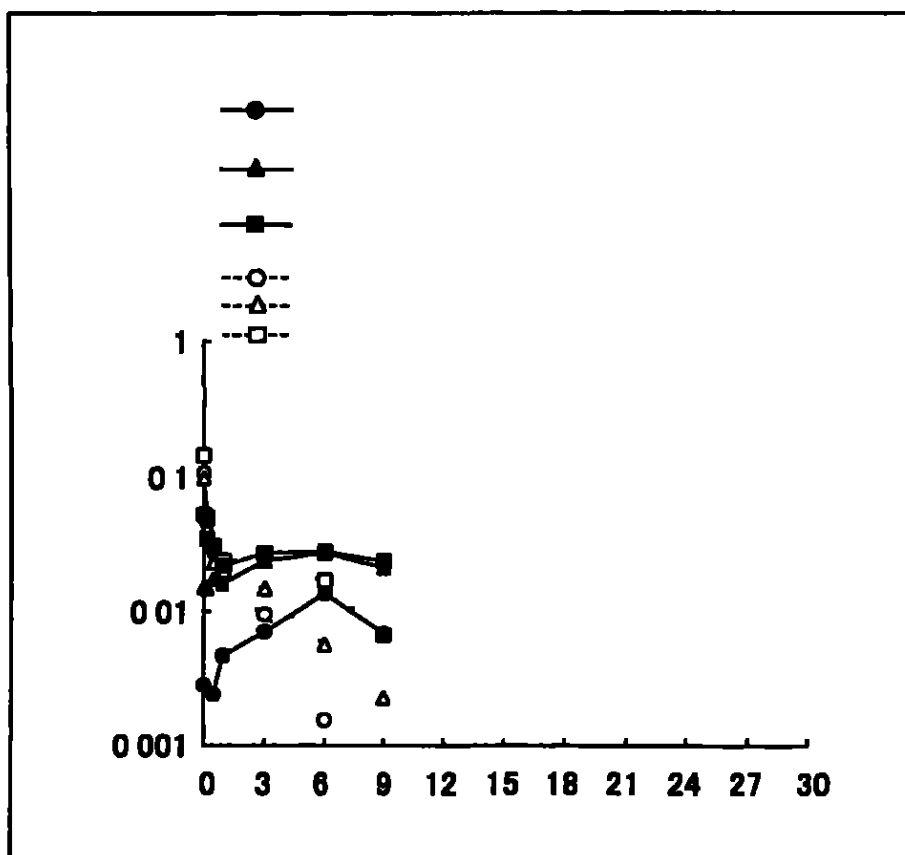
11/21
FIGURA 16



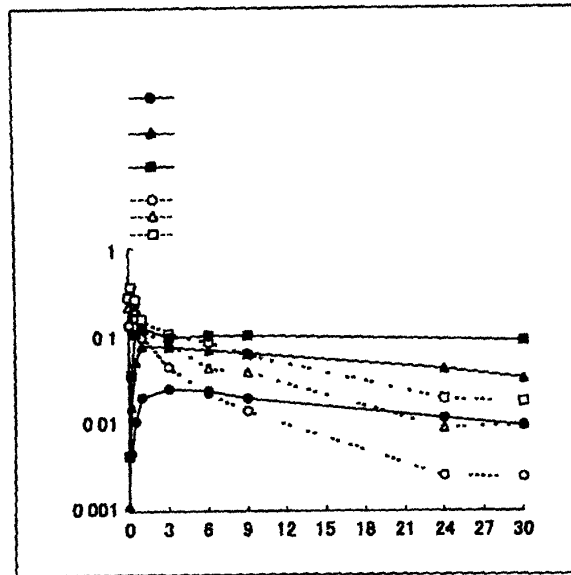
12/21
FIGURA 17



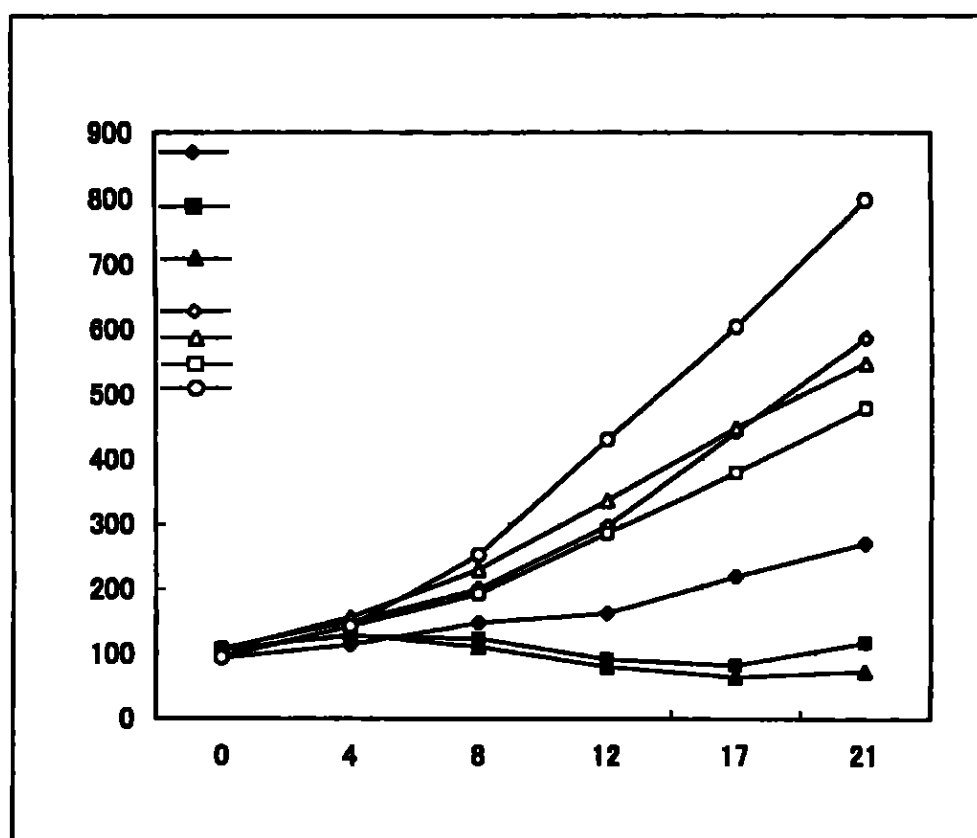
13/21
FIGURA 18



14/21
FIGURA 19



15/21
FIGURA 20



16/21
FIGURA 21

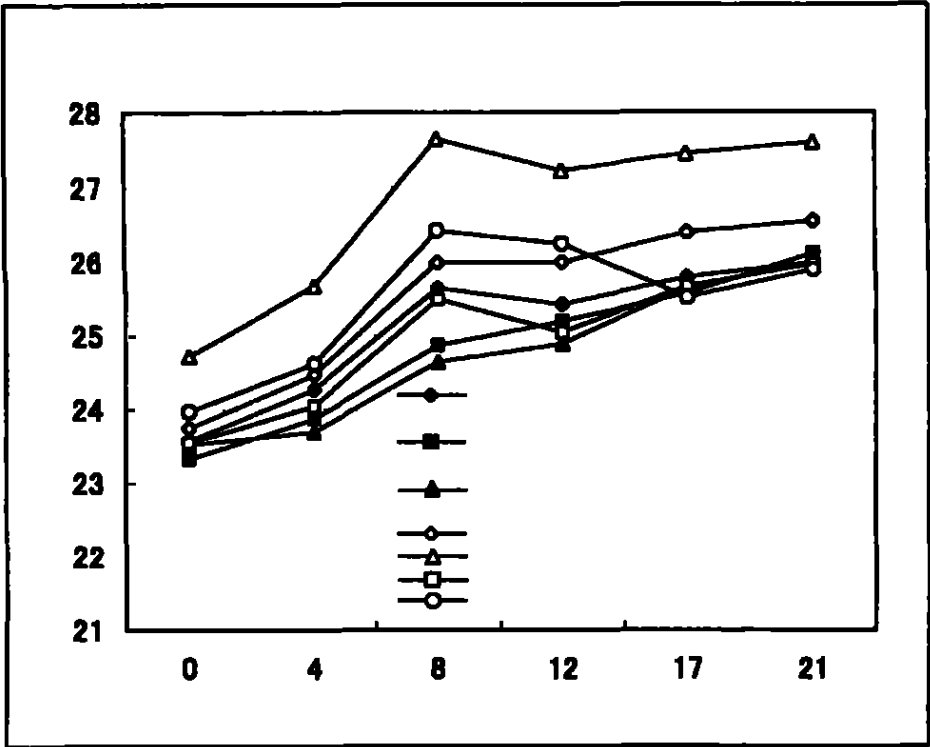
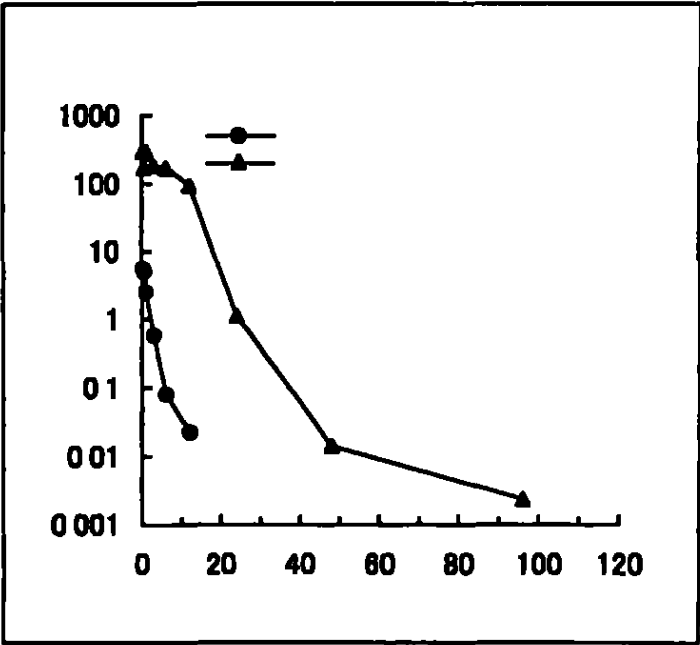


FIGURA 22



17/21
FIGURA 23

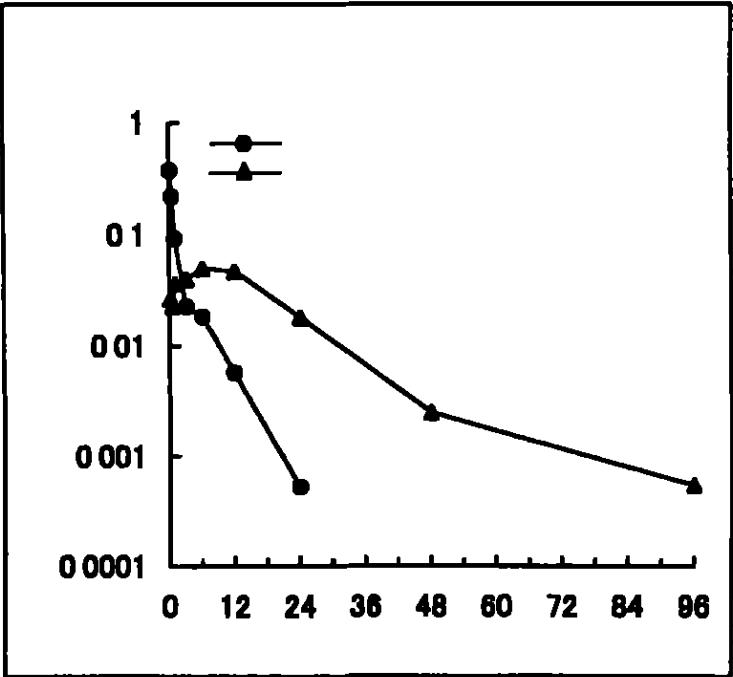
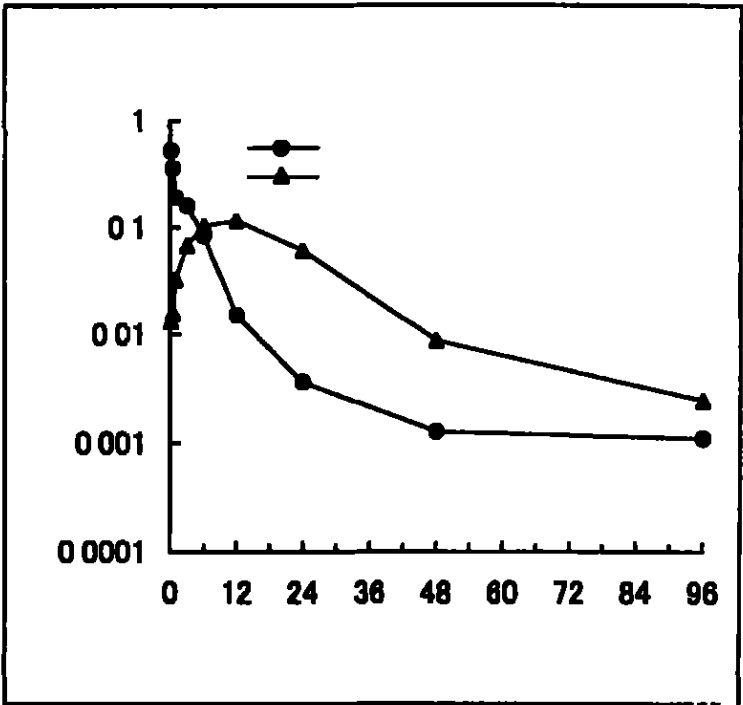


FIGURA 24



18/21
FIGURA 25

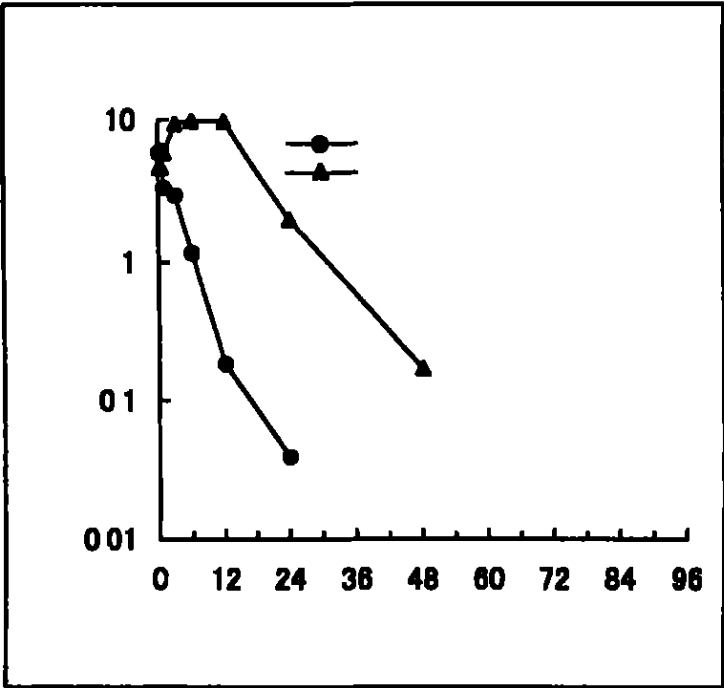
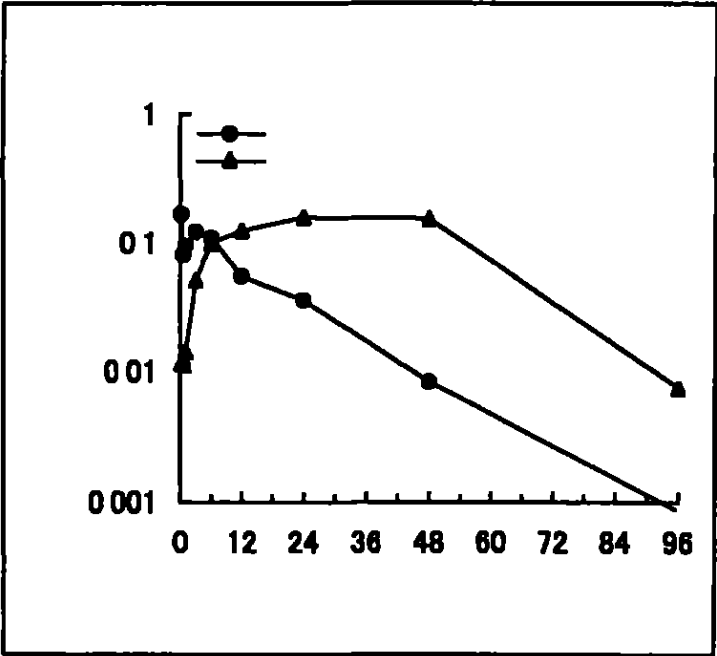
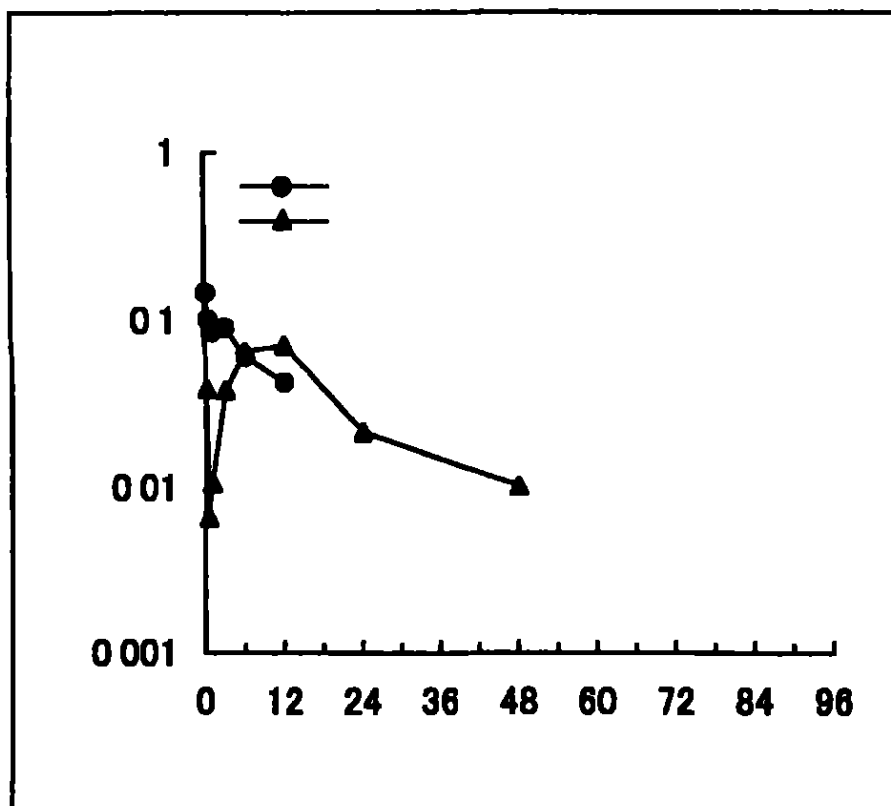


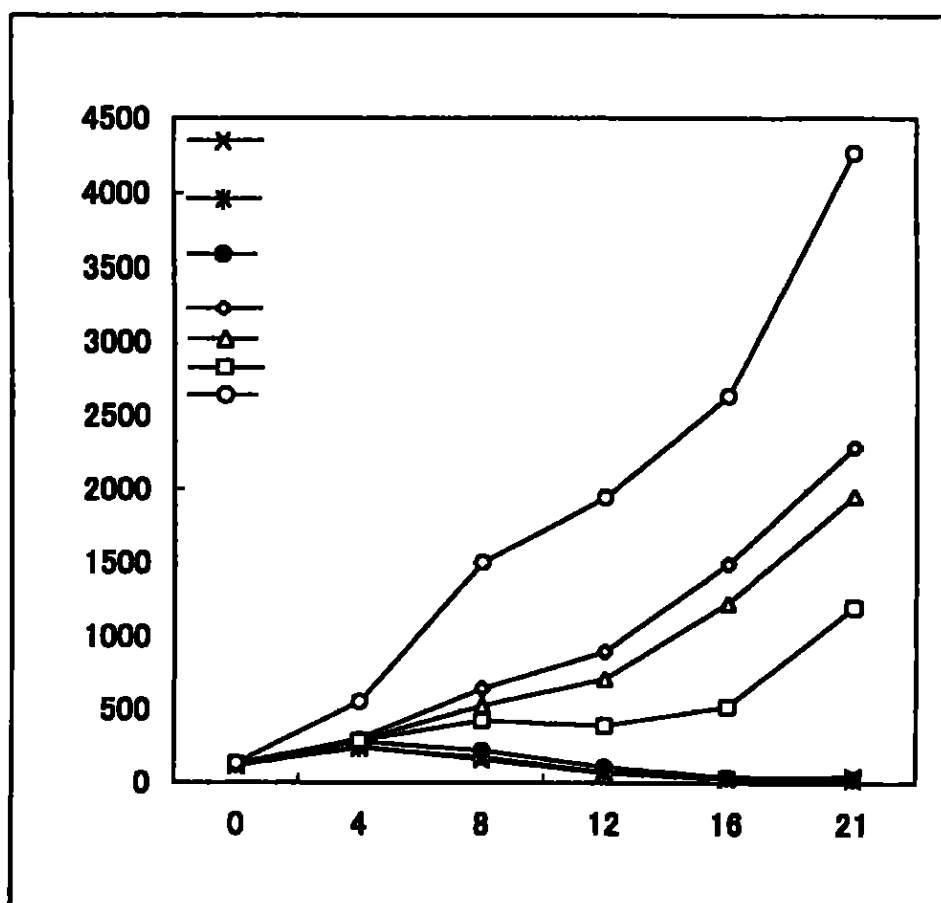
FIGURA 26



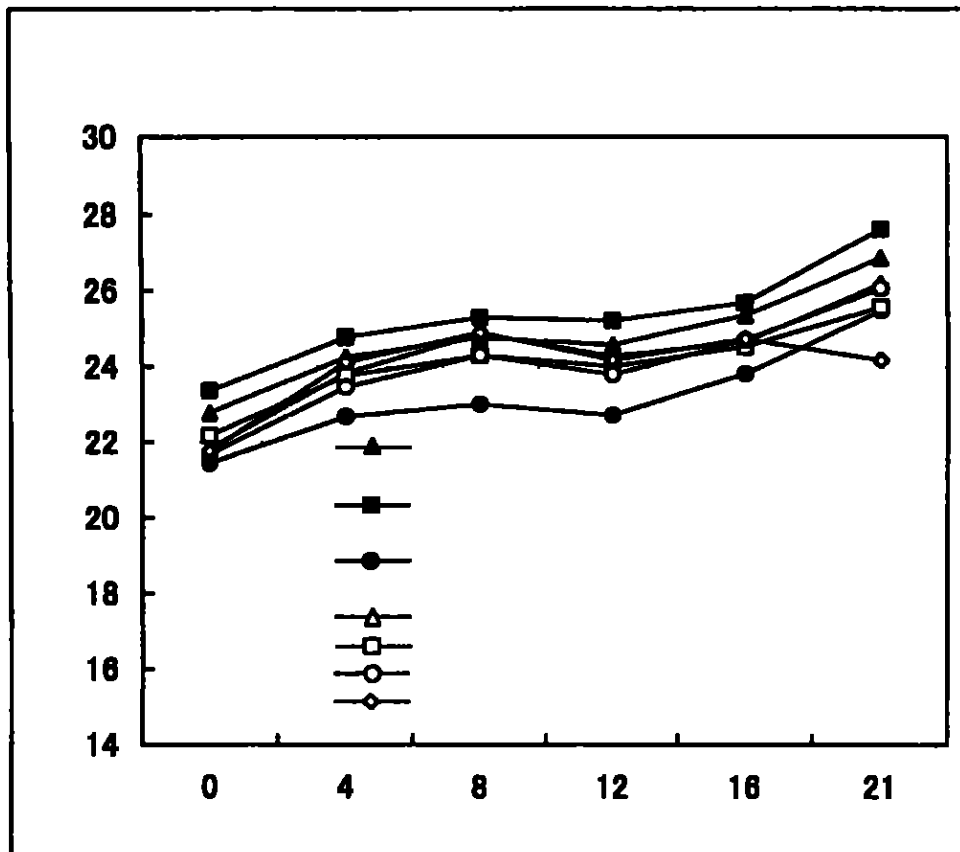
19/21
FIGURA 27



20/21
FIGURA 28



21/21
FIGURA 29



TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

NOTIFICACION CONCERNIENTE A LA PRESENTACIÓN O TRANSMISION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

(Instrucciones Administrativas PCT, Sección 411)

De la OFICINA INTERNACIONAL

A
WATANABE, Mochitoshi
Hayakawa-tonakai Bldg 3F, 12-5, Iwamoto-cho
2-chome, Chiyoda-ku, Tokio
1010032
JAPÓN

Fecha de envío por correo (día/mes/año) 28 de septiembre de 2005 (28 09 2005)
Referencia del archivo del solicitante o agente W-3708PCT
Solicitud Internacional No PCT/JP2005/009953
Fecha de publicación Internacional (día/mes/año)

AVISO IMPORTANTE
Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) 31 de mayo de 2005 (31 05 2005)
Fecha de Prioridad (día/mes/año) 01 de junio de 2004 (01 06 2004)

Solicitante
TERUMO KABUSHIKI KAISHA et al

- 1

Por medio de esta forma que reemplaza cualquier notificación publicada previamente concerniente del envío o transmisión de los documentos de prioridad por la presente se notifica al solicitante que la fecha de recepción por la Oficina Internacional del o los documentos de prioridad con relación a todas la o las solicitudes anteriores cuya prioridad se reclama. A menos que se indique de otra manera por las letras "NR" en la columna derecha o por un asterisco que aparezca enseguida de la fecha de recepción el documento de prioridad concerniente se envió o transmitió a la Oficina Internacional en cumplimiento con la Regla 17 1(a) o (b)
- 2

(Si es aplicable) Las letras "NR" que aparecen en la columna derecha denominan un documento de prioridad el cual en la fecha de envío de esta Forma no fue aun recibido por la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 17 1(a) o (b) Donde de conformidad con la Regla 17 1(a) el documento de prioridad no debe presentarse por el solicitante para la Oficina receptora o la Oficina Internacional aunque el Solicitante fracasase al presentar el documento de prioridad dentro del tiempo límite de acuerdo con esa Regla la atención del solicitante se dirige a la Regla 17 1(c) la cual estipula que ninguna Oficina designada puede desatender la reivindicación de prioridad concerniente antes de dar al solicitante una oportunidad con la entrada en la fase nacional para otorgar el documento de prioridad dentro del tiempo límite el cual es razonable de acuerdo con las circunstancias
- 3

(Si es aplicable) Un asterisco (*) que aparezca enseguida de una fecha de recepción en la columna derecha, denomina un documento de prioridad presentado o transmitido a la Oficina Internacional aunque no en cumplimiento con la Regla 17 1(a) o (b) (el documento de prioridad fue recibido después del tiempo límite prescrito en la Regla 17 1(a) o la demanda para preparar y transmitir el documento de prioridad que fue presentado en la Oficina receptora después del tiempo límite aplicable de conformidad con la Regla 17 1(b)) Aunque el documento de prioridad no se proporcionó de conformidad con la Regla 17 1(a) o (b) la Oficina Internacional no obstante transmitirá una copia del documento de prioridad a las Oficinas designadas para su consideración. En tal caso que una copia no se acepte por la Oficina designada como el documento de prioridad, la Regla 17 1(c) contempla que ninguna Oficina designada puede desatender la reivindicación de prioridad concerniente antes de dar al solicitante una oportunidad con la entrada en la fase nacional para otorgar el documento de prioridad dentro de un tiempo límite el cual es razonable de acuerdo con las circunstancias

<u>Fecha de Prioridad</u>	<u>No. de solicitud de prioridad</u>	<u>País u Oficina regional u Oficina de Recepción de</u> <u>PCT</u>	<u>Fecha de Recepción de Documento de Prioridad</u>
01 de junio de 2004 (01 06 2004)	2004-163742	JP	07 de julio de 2005 (07 07 2005)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Funcionario autorizado Arounni WETZLER (Fax 338 7010)
Facsimile No +41 22 338 82 70	Facsimile No (41-22) 338 70 10 Telefono No +41 22 338 8358

Retiro Folios 148 y 149 "Tarjetas".

140/80

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACION SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud 6720944 (22) Fecha de solicitud 30/11/2006 (30) Prioridad (31) N° Prioridad (32) Fecha (33) Pais 2004-163742 01/08/2004 JP		(51) int. Cl. (71) Solicitante(s) KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (72) Inventor(es) KAISUKE YOSHINO, SHIGENORI NOZAWA, MASASHI ISOZAKI, SEIGO SAWADA, IKUO KATO, TAKESHI MATSUZAKI (74) Apoderado DRA MARGARITA CASTELLANOS A	
(85) Fecha límite inicio fase nacional (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud 31/05/2005 N° de solicitud PCT/JP2005/009953		(87) Publicación internacional Fecha 15/12/2005 N° publicación WO 2005/117878	
(54) Título FORMULACION DE IRINOTE CAN			

Reivindicacion(es)

Formulacion de irinotecan caracterizado porque incluye una vesicula cerrada formada por una membrana de lipidos, en la que el irinotecan y/o una sal del mismo estan encapsulados en una concentracion de por lo menos 0.07 mol/mol (mol de farmaco/mol de lipido total de la membrana)

Delegatura de Propiedad Industrial
Division de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRÁMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ()	(X)	()
- Indicacion de que se solicita la concesion de una patente	(X)	()
- Datos de identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	(X)	()
- Descripcion de la invencion	(X)	()
- Dibujos de ser estos pertinentes	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	(X)	()

COMPLETA () INCOMPLETA (X)

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representacion grafica y fotografica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

EZQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representacion grafica del Esquema de Trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma responsable Fernando B

Fecha 29-nov 6

159

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTELLANOS ABONDANO MARGARITA

REFERENCIA	Radicación No	6 120944
	Solicitud internacional	PCT/JP2005/009953
	Fecha inicio fase nacional	01/01/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No	1878

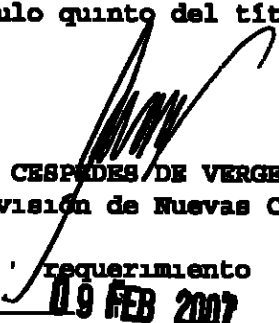
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que

1 La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k) Decisión 486

2 La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 FEB 2007 leraso