

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

Señora

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Desarrollo Económico

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-120944-00006-0000

Fecha: 2010-06-02 14:15:42 Dep: 2020 DIR.NUEVASOR
Tra: 11 PATENTEIYII Lve: 378 FASENACIONALI
Act: 444 RESPUESTAREQUE Folios: 28

Re.: Expediente No **06.120.944**

Solicitud del examen de patentabilidad correspondiente a la Patente PCT Entrada en

Fase Nacional, para: **FORMULACION DE IRINOTECAN**

Solicitante: **KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA**

RESPUESTA AL EXAMEN DE FONDO

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente me permito presentar respuesta al oficio No 3077 notificado por fijación en lista el 5 de marzo de 2010 correspondiente al examen de fondo, estando dentro del término legal en los siguientes términos:

Modificación a la descripción.

Con relación a la descripción, se ha realizado la siguiente modificación la cual se encuentra debidamente sustentada:

Se ha modificado el valor **0.85** de la tabla 9 de la descripción en la columna de "Composición de la Resina de carga (relación molar)", "PEG-DSPE" y en la fila "equipo de preparación ejemplo 11" por **0.75**.

El sustento para dicha modificación se encuentra en la descripción de la invención, de donde se entiende que la relación de modificación (%) de PEG-DSPE se calcula como se muestra en la tabla siguiente por lo que se entiende que la descripción de la tabla 9 es un error tipográfico

792

CASTELLANOS & CO.
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

Ejemplo 11	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC)	colesterol (Chol)	Lípido total	concentración de PEG- DSPE	PEG-DSPE
peso	70.87g	29.13g		36.74 mg/mL	7.348g
peso molecular	790	387			5938
volumen				200mL	
mmol	89.70886	75.33945	165.04831		1.23745
(%) índice de modificación de PEG-DSPE					0.749753

índice de modificación de PEG-DSPE:

$1,23745/165,04831 * 100 = 0,749753$

Reivindicaciones

Presento a consideración del señor examinador un nuevo pliego reivindicatorio en el cual se ha limitado el alcance de la presente invención. La reivindicación modificada 1 recita la formulación de irinotecan como sigue:

Reivindicación 1. Una formulación de irinotecan caracterizada porque incluye un liposoma formado por una bicapa de lípidos que contiene un fosfolípido como componente principal de la membrana, en donde sólo la superficie exterior del liposoma está modificada con un agente modificador de superficie que contiene un polímero hidrofílico, en la que el irinotecan y/o una sal del mismo están encapsulados en una concentración de por lo menos 0.1 mol/mol (mol de fármaco/mol de lípido total de la membrana) por un gradiente iónico comprendido entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del liposoma.

Tal como se establece en la reivindicación 1, la presente invención es una formulación de irinotecan que comprende un liposoma formado por una membrana de lípido bicapa que contiene un fosfolípido como componente de membrana principal, en donde 1) solo la superficie exterior del liposoma es modificado con un agente modificador de superficie que contiene un polímero hidrofílico; 2) en el cual el irinotecan y/o una sal del mismo es encapsulado en un concentración de por lo menos 0.1 mol/mol; 3) mediante un gradiente de iones entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa.

793

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

Nivel inventivo

Presento a consideración del señor examinador los siguientes argumentos que demuestran el nivel inventivo de la presente solicitud en vista de los documentos D1 (WO03/041681) y D2 (WO00/023052).

En primer lugar, el documento D1 describe un liposoma que consiste de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, y colesterol, que encapsula irinotecan a través de un método de gradiente de pH mencionado en el ejemplo 5, y muestra la relación molar irinotecan a lípido de 0.07 o más en la figura 6c. En D1, se describe un polímero hidrofílico tal como fosfatidilglicerol (PG) o PEG.

Sin embargo, tanto PG o PEG se mezcla con un lípido antes de utilizarse de manera que la membrana de liposoma tiene tanto su superficie interna como su superficie externa modificada. En consecuencia, el documento D1 falla en describir un liposoma que tiene solo su superficie exterior modificada con un agente modificador de superficie que contiene un polímero hidrofílico.

Por su parte, el documento D2 describe, en la sección del resumen de la invención, un liposoma en el que ambas superficies de la membrana se modifican con polietilenglicol, con un gradiente iónico entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa (además referida como método de gradiente iónico) y en donde un inhibidor de topoisomerasa se encapsula en una concentración de 0.10 μ molar de fármaco por μ mol de lípido.

Dicho documento D2 describe además un polímero hidrofílico que proporciona un recubrimiento de superficie de cadena polimérica hidrofílica tanto en la superficie interna como externa de la membrana del liposoma formado por una bicapa de lípidos.

Sin embargo, el documento D2 no describe un liposoma en el cual solo la superficie exterior del liposoma este modificada con un agente modificador de superficie que contiene un polímero hidrofílico.

La formulación de liposoma de la presente invención contiene irinotecan y es la formulación de liposoma en la cual solo la superficie exterior del liposoma esta modificada con el polímero hidrofílico, y la formulación con tal constitución la que no se encuentra específicamente descrita tanto en D1 como en D2.

794

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

En otras palabras, la invención recitada en la reivindicación 1 es diferente de los documentos citados D1 y D2 en la característica "*modificar solo la superficie exterior del liposoma con el polímero hidrofílico*" proporcionándole por lo tanto el nivel inventivo a la invención sobre los documentos D1 y D2.

Por otra parte, la descripción de la presente solicitud describe que la formulación de la presente invención que comprende un polímero hidrofílico solamente sobre la superficie exterior del liposoma es la que muestra un desempeño o rendimiento superior. Adicionalmente, el solicitante realizó varios experimentos comparativos con la formulación de CPT-11 de conformidad con la presente invención la cual comprende un polímero hidrofílico solamente sobre la superficie exterior del liposoma y formulaciones CPT-11 (ejemplos comparativos) que tienen los polímeros hidrofílicos tanto en la superficie interior como en la superficie exterior del liposoma. A partir de estos experimentos comparativos, las formulaciones CPT-11 de acuerdo con la presente invención demostraron tener un comportamiento superior a las formulaciones de los ejemplos comparativos con respecto a varias características tales como retención en la sangre, estabilidad y un efecto supresor del crecimiento tumoral. Dichos efectos superiores no se encuentran descritos ni en D1 ni en D2.

Los detalles de dichos experimentos se explican a continuación.

La descripción de la presente solicitud claramente describe que la formulación reclamada que tiene el polímero hidrofílico únicamente sobre la superficie exterior del liposoma muestra excelente estabilidad comparada con la formulación que tiene los polímeros hidrofílicos tanto en la superficie interior como exterior del liposoma como se indicó previamente.

Específicamente, como se muestra en el ejemplo 3 de la descripción, tanto las formulaciones de la preparación del ejemplo 3 y la preparación de referencia del ejemplo 1 son formulaciones (CPT-11) que encapsulan clorhidrato de irinotecan obtenido mediante el método de carga remota. La formulación CPT-11 del ejemplo 3 es una formulación en la cual solo la parte externa del liposoma esta modificado con PEG mientras la formulación CPT-11 de la preparación de referencia del ejemplo 1 es una formulación en la cual ambas superficies interna y externa del liposoma están modificadas con PEG. La formulación de CPT-11 descrita en la preparación de referencia del ejemplo 1 corresponde a una formulación de acuerdo a lo descrito en D1 y D2.

Al comparar dichas formulaciones, es aparente que la formulación de la preparación del ejemplo 3 en la cual solo la superficie exterior del liposoma fue modificada con PEG permitió

195

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

la supresión de la liberación de CPT-11 por un periodo prolongado de tiempo así como la conservación estable de la formulación de CPT-11 (ver figura 2 de la descripción de la presente solicitud).

Además, se reveló que la formulación de CPT-11 en la cual se modificó solo la superficie exterior del liposoma con PEG se preservó en una condición estable de un tamaño de partícula de liposoma por un periodo prolongado de tiempo (ver figura 3 de la descripción de la presente solicitud).

Por otra parte, se reveló que la formulación de CPT-11 que fue preparada mediante el método de carga remota y en la cual se modificó solo la superficie exterior del liposoma con PEG proporcionó excelente estabilidad en el tamaño de la partícula y en la tasa de liberación del CPT-11, incluso si este se almacena por 6 meses a 4°C (ver tabla 3 en el ejemplo 4 de la presente solicitud.)

Así mismo, la formulación de CPT-11 de la presente invención tiene una excelente retención en la sangre por un largo periodo de tiempo (ejemplo 5 de la descripción de la presente solicitud).

Adicionalmente, se realizaron experimentos de farmacocinética usando una formulación de CPT-11 en la cual se modificó solo la superficie exterior del liposoma con PEG (de aquí en adelante referido como **PEG5000 Post**) y una formulación de CPT-11 en la cual se modificaron tanto la superficie interior como exterior del liposoma con PEG (de aquí en adelante referido como **PEG5000 Pre**) (remito al señor examinador al reporte de resultados experimentales adjunto al presente memorial)

En primer lugar, cada formulación CPT-11 se administró intravenosamente a una cola de rata (CrI:CD (SD), macho, 7 semanas de edad, Charles River Japan, Inc.) con una cantidad de clorhidrato de irinotecan de 10mg/kg o 30mg/kg. Posteriormente, en periodos de tiempo de 1, 2, 4, 8, 24, 48 y 72 horas después de la administración, se colectaron 0.3 ml de sangre de la vena cervical, y se midió la concentración total de CPT-11 en el plasma sanguíneo.

Los resultados de la concentración total de CPT-11 medidos en el plasma sanguíneo después de administrar PEG5000 Post y PEG5000 Pre se muestran en las siguientes figuras 1 y 2.

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

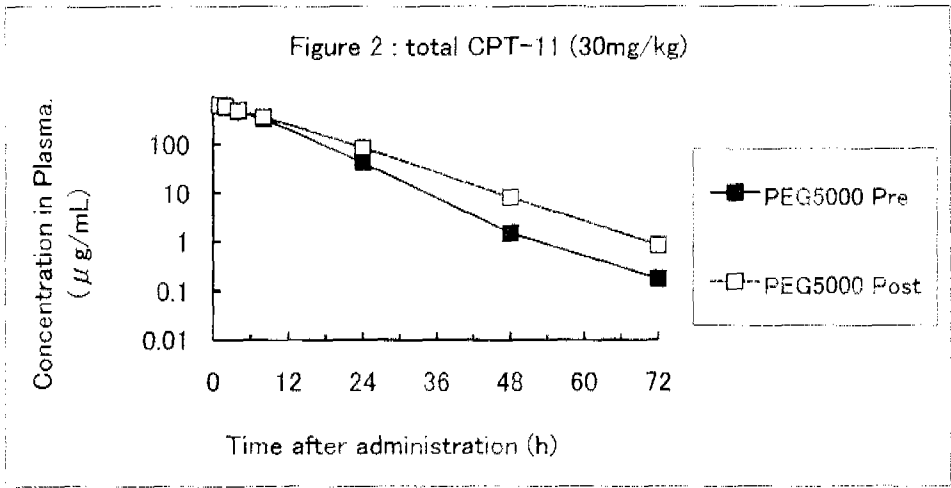
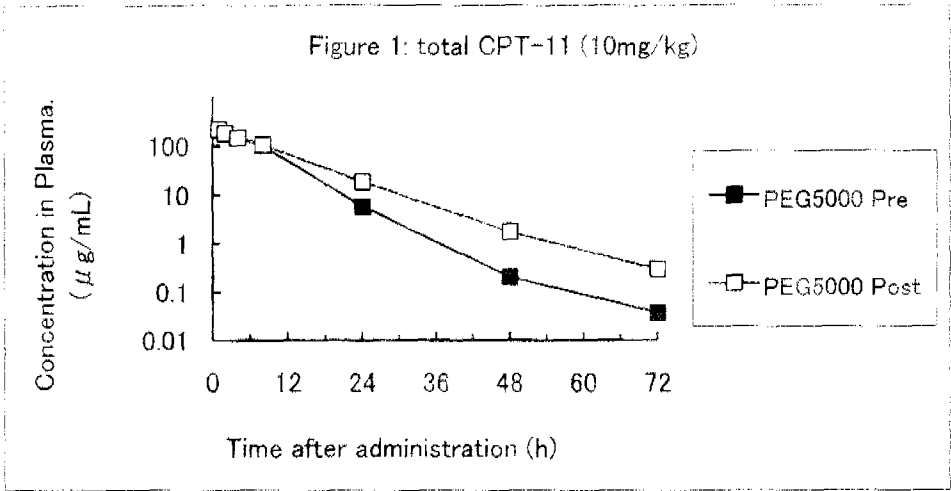


Figura 1

- Figura 1: concentración total de CPT-11 (10mg/kg)
- Concentración en plasma (µg/mL)
- Tiempo después de la administración (h)

Figura 2

- Figura 2: concentración total de CPT-11 (30mg/kg)
- Concentración en plasma (µg/mL)
- Tiempo después de la administración (h)

A partir de las figuras 1 y 2 se estableció que la concentración de CPT-11 después de administrar PEG5000 Post fue mayor que después de administrar PEG5000 Pre en ambos casos a dosis de 10mg/kg y 30mg/kg. Es decir, PEG5000 Post tiene un tiempo de retención prolongada prominente en la sangre comparado con PEG5000 Pre.

Adicionalmente, al usar un software de análisis (WinNonlin) para farmacocinética, se calcularon diferentes parámetros farmacocinéticos (AUClast, AUCinf, MRTlast, MRTinf, T1/2, CLtot) de PEG5000 Post y PEG5000 Pre con el fin de llevar a cabo un análisis estadístico y donde se encontraron diferencias significativas entre tales parámetros. Específicamente, se confirmó que, comparado con PEG5000 Pre, el PEG5000 Post permitió al CPT-11 desaparecer más lentamente (valores más altos de MRT y T1/2) y mantenerse a una concentración mayor por un periodo prolongado de tiempo.

Adicionalmente, se realizaron experimentos adicionales en cuanto la velocidad de liberación del CPT-11 en el plasma sanguíneo de una rata in vitro al usar PEG5000 Post y PEG5000 Pre (ver reporte de Resultados experimentales). En particular, después de precalentar 0.5ml del plasma sanguíneo de una rata por 5 minutos a 37°C, se adicionaron 5µL de cada formulación de liposoma (PEG5000 Post y PEG5000 Pre) para empezar la reacción. A periodos de tiempo de 0, 1, 2 y 4 horas después de la adición de cada formulación, se muestreo una parte de la formulación adicionada al liposoma con el fin de realizar mediciones de concentración del liposoma CPT-11 encerrado, liposoma CPT liberado y SN-38.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación (figura 3 y 4).

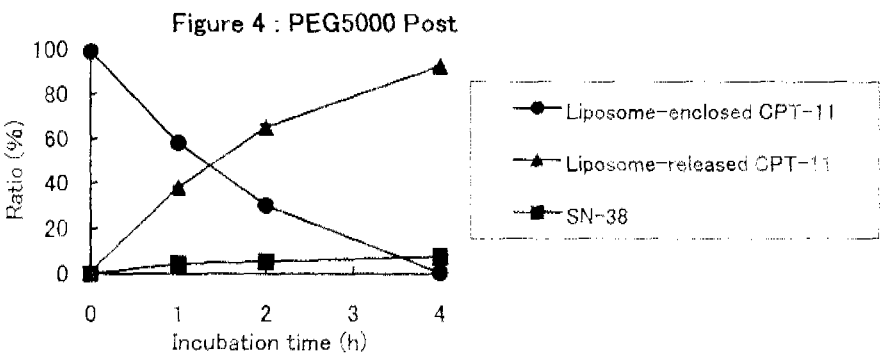
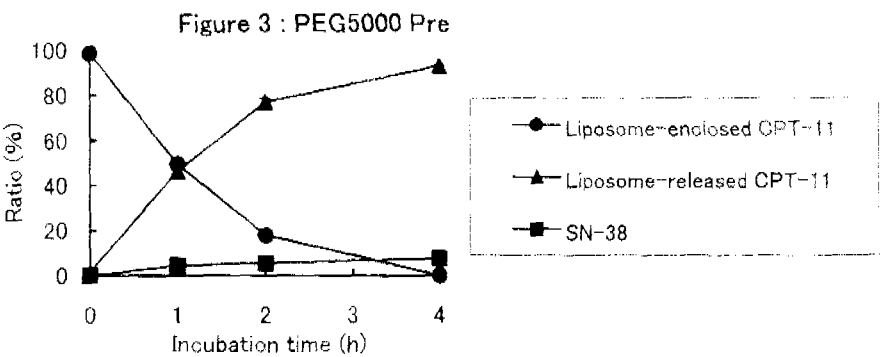


Figura 3

- Figura 3: PEG5000 Pre
- Relación (%)
- Tiempo de incubación (h)

Figura 4

- Figura 4: PEG5000 Post
- Relación (%)
- Tiempo de incubación (h)

A partir de las figuras 3 y 4 se encontró que tanto en PEG5000 Post como en PEG5000 Pre, el CPT-11 se libera gradualmente del interior de liposoma a medida que avanza el tiempo. Específicamente, PEG5000 Post presenta una liberación más lenta de CPT-11 que el PEG5000 Pre. Es decir, se estableció que PEG5000 Post tuvo más cantidad de CPT-11 encerrada en el liposoma después de un tiempo determinado, y permitió la administración estable de CPT-11 por un periodo prolongado de tiempo, en comparación con PEG5000 pre.

Además, la formulación de CPT-11 de la presente invención que permite encapsular irinotecan en un liposoma, exhibe un elevado efecto antineoplásico contra varios tipos de cáncer (ejemplo 6 en párrafo [0107], 9 en [0120], 11 en [0128], 13 en [0136], 14 en [0138] y 15 en [0141] de la descripción) y permite retener la concentración en plasma y la concentración intratumoral de CPT-11 y su metabolito activo, SN-38, por un periodo prolongado de tiempo (ejemplos de prueba 7, 10 y 12 de la descripción).

Se examinó el efecto supresor del crecimiento tumoral al usar PEG5000 Post y PEG5000 Pre (remito al examinador al reporte de Resultado Experimental). En particular, al principio, se implantaron 2×10^6 células/ ratón de células de cáncer de colon humano (HT-29) subcutáneamente en la región inguinal izquierda de ratones desnudos BALB/c (CAnNCg-Foxnl^{nu}/CrIcrIj, macho, 5 semanas de edad, Charles River Japan, Inc.).

Después de implantar tumores, se separó el grupo de manera que se estableció el día 0 como el día en el cual el volumen de un tumor supuesto calculado por $\frac{1}{2}ab^2$ (a representa un diámetro longitudinal de un tumor y b representa un diámetro de eje corto del mismo) llegó alrededor de 100mm^3 . En el día 1, se administró cada formulación de CPT-11 (12.5mg/kg) intravenosamente.

Se midió el volumen del supuesto tumor en los días 5, 9 y 14. Adicionalmente, se extrajeron los tumores y se midió el peso de los mismos en el día 21, se calculó la velocidad de inhibición del crecimiento del tumor I. R. (%) mediante la siguiente formula:

7499

CASTELLANOS & CO.
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

I.R. (%) = (1-peso promedio del tumor en un grupo de tratamiento/peso promedio del tumor en el grupo control) * 100. El cambio del volumen del supuesto tumor en un tumor de soporte de ratón HT-29 debido a cada prueba de fármaco (PEG5000 post, PEG5000 pre) se muestra en la siguiente figura 5:

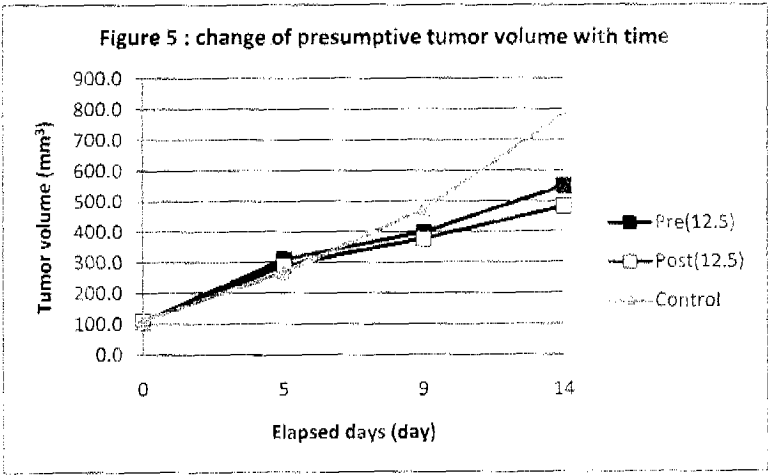


Figura 5

- Figura 5: cambio del volumen presunto del tumor con el tiempo
- Volumen del tumor (mm³)
- Días transcurridos (días)

Como se muestra en la figura 5, el volumen del supuesto tumor se ha incrementado con el tiempo después de implantar un tumor en un grupo de control en el cual no se administró ninguna formulación en este sistema de prueba. Mientras tanto, tanto en PEG5000 Post como en PEG5000 Pre, se inhibió el incremento del volumen del tumor en comparación al grupo control. En particular, PEG5000 Post probó tener un efecto supresor mayor del crecimiento del volumen del tumor comparado con PEG5000 Pre.

Adicionalmente, cada velocidad de inhibición del crecimiento del tumor I.R. (%) se calcula como se muestra en la siguiente tabla. Como se puede apreciar en dicha tablacuando se usa PEG5000 Post comparado a PEG5000 Pre, se evidencia un efecto supresor más alto del crecimiento de tumor.

Tabla 1

Grupo	Dosis (mg/kg)	Peso del tumor (g) (promedio +/- S.D.)	Velocidad de inhibición
Control	-----	0.78+/-0.10	-----
PEG5000	12.5	0.56+/-0.12	27.8

200

CASTELLANOS & CO.
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

Pre			
PEG5000	12.5	0.52+/-0.09	33.2
Post			

Como se puede apreciar, entre la formulación de CPT-11 en la cual se modifica solo la superficie exterior del liposoma con PEG (PEG5000 Post) y la formulación de CPT-11 en la cual se modifican ambas superficies interna y externa PEG (PEG5000 Pre), la formulación de CPT-11 en la cual se modifica solo la superficie exterior del liposoma con PEG (PEG5000 Post) demostró tener un efecto supresor mayor del crecimiento del tumor.

Además, como se describió en la descripción de la presente invención, en el liposoma de acuerdo a la presente solicitud en la cual no se modifica una fase acuosa interna de superficie lateral de una capa interna del liposoma, la estabilidad de la membrana se puede mantener incluso si el valor de pH de la fase acuosa interna es bajo.

Se examinó la estabilidad de preservación de PEG-DSPE al usar PEG5000 Post y PEG5000 Pre (remito al examinador al reporte de resultados experimentales). En particular, se midieron tasas residuales de PEG-DSPE después que cada formulación fuera almacenada por 4 u 8 semanas a 25°C y tasas residuales de PEG-DSPE después de que cada formulación fuera almacenada por 2, 4 y 6 semanas a 40°C. Entre mayor sea la estabilidad de preservación de una formulación, es mayor el tiempo de uso de la formulación.

El resultado de estabilidad de preservación a 25°C mostró que PEG5000 Pre tiene 88% de una tasa residual de PEG-DSPE después de 8 semanas mientras que PEG5000 Post tiene más de 95% de la tasa después de 8 semanas.

Adicionalmente, el resultado de estabilidad de preservación a 40°C mostró que PEG5000 Pre tiene 70% de una tasa residual de PEG-DSPE después de 6 semanas mientras que PEG5000 Post tiene más de 85% de la tasa después de 6 semanas.

Como se describió arriba, entre la formulación de CPT-11 en la cual solo se modificó la superficie exterior del liposoma con PEG (PEG5000 Post) y la formulación de CPT-11 en la cual se modificaron ambas superficies interna y externa del liposoma con PEG (PEG5000 Pre), se estableció que la formulación de CPT-11 en la cual solo se modificó la superficie externa de liposoma con PEG (PEG5000 Post) mostró mayor estabilidad de preservación.

CASTELLANOS & CO.

ABOGADOS

Calle 94 A No. 7 A - 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

Como se puede apreciar, además de los resultados de estos experimentos adicionales arriba mencionados, la formulación de liposoma de la presente invención en la cual solo la superficie exterior del liposoma contiene polímeros hidrofílicos permite una retención en sangre del fármaco superior, comparado a la formulación de liposoma que tiene polímeros hidrofílicos en ambas superficie interna y externa del liposoma. Asimismo, la formulación del liposoma de la presente invención tiene excelente estabilidad de preservación con un efecto supresor superior del crecimiento del tumor, comparado a la formulación de liposoma que tiene polímeros hidrofílicos sobre ambas superficies interna y externa del liposoma.

Tal mejora en varias características de la formulación al tener un polímero hidrofílico solo sobre la superficie exterior del liposoma no se encuentra descrito en D1 ni en D2. Esto es, se puede decir que estos efectos obtenidos son para un experto en la materia no predecibles.

Es así como la formulación de liposoma de la presente invención provee ventajas que incluyen un fácil manejo de la formulación en instalaciones médicas y capacidad de almacenamiento de la formulación por un periodo prolongado de tiempo sin perder el elevado efecto antineoplásico de CPT-11.

Asimismo, la formulación de CPT-11 de la presente invención está formada al incorporar una alta concentración de CPT-11 en una condición estable dentro del liposoma sin perder su excelente eficacia farmacéutica. Por lo tanto, la formulación de CPT-11 tiene la característica de reducir la cantidad de los componentes, además de los componentes médicos como fosfolípidos, resultando en daños menores sobre el organismo.

En este orden de ideas, y basado en tales efectos peculiares de la presente invención, es claro que la presente solicitud presenta actividad inventiva. Adicionalmente, los efectos tales como un efecto farmacéutico persistente y un efecto secundario reducido que no pudiera obtenerse por formulaciones convencionales se obtienen por la formulación de liposoma de la presente solicitud, y el valor comercial del mismo puede ser extremadamente alto. Además, como se puede ver de tales puntos, se revela que la formulación de liposoma de la presente invención tiene efectos extremadamente superiores que los descritos en el arte previo.

En consecuencia, solicito a su Despacho conceder el privilegio de patente a la presente invención toda vez que la misma cumple con las disposiciones del artículo 18 de la Decisión 486.

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

Anexos

- Formulario de modificaciones
- Nuevo capítulo reivindicatorio
- Tabla 9 de la descripción modificada
- Reporte de resultados experimentales
- Recibos de pago

De la Señora Jefe,


Margarita Castellanos Abondano

C.C. No. **39.779.654** de Usaquén

T.P.A. No. **70819** del C. Sup. de la Judicatura

Calle 94 A No. 7 A - 09

Teléfonos: 610 74 20

Bogotá, D.C.,

2003



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

①

SOLICITUD DE:

☐

Corrección de Error Material

☒

Modificación a una solicitud

②

Nombre: **KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA**

Dirección: **1-19, Higashi-shinbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8660, Japón**

Domicilio: **Tokyo 105-8660, Japón**

Lugar de Constitución: **Japón**

Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **MARGARITA CASTELLANOS A.**

Dirección: **Calle 94 A No. 7 A-09**

Teléfono: **756 0770** Fax: **755 0158**

E-mail: **info@castellanosyco.com**

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número **39'779.654** Cual TPA **70.819**

④

Número de Expediente:

06.120.944

⑤

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo capítulo reivindicatorio para el examen de patentabilidad.

⑥

Comprobante de pago No.

10-43.570

Fecha

28 de mayo de 2010

⑦

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa.

☐

Poderes si fuere el caso, junto con la sustitución de los mismos a mi favor.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas

☒

Nuevo capítulo reivindicatorio

⑧

NOMBRE **MARGARITA CASTELLANOS A.**

FIRMA

Margarita Castellanos A.
CC 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 CS.

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

20.1

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 500174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 43,570
FECHA : MAYO 28 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	VF. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754337	324715635	28/05/2010	3,290,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTADO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	114,000.00
		TOTAL :	114,000.00

SON: CIENTO CATORCE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPERIENTE Nº. _____

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de irinotecan caracterizada porque incluye un liposoma formado por una bicapa de lípidos que contiene un fosfolípido como componente principal de la membrana, en donde sólo la superficie exterior del liposoma está modificado con un agente modificador de superficie que contiene un polímero hidrofílico, en la que el irinotecan y/o una sal del mismo están encapsulados en una concentración de por lo menos 0.1 mol/mol (mol de fármaco/mol de lípido total de la membrana) por un gradiente iónico comprendido entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del liposoma.

2. La formulación de irinotecan de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el gradiente iónico es un gradiente de concentración de protones, que tiene un 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.

3. La formulación de irinotecan de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el gradiente de pH se forma mediante 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.

4. La formulación de irinotecan de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque el liposoma contiene adicionalmente un lípido distinto del fosfolípido y/o un agente modificador de superficie.

5. La formulación de irinotecan de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada además porque comprende un compuesto que tiene un grupo funcional básico como agente modificador de superficie.

6. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende la formulación de irinotecan de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

Tabla 9

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			
	Equipo de Preparación Ejemplo 11	54:46	0.75	20	47	4.92	0.16	97.2

15

206

Experimentos.

Experimentador.
Yoko TERAJIMA

Fecha y lugar de experimentación.

Fecha: julio 28, 2008-octubre 22, 2008.

Lugar: c/o Terumo Kabushiki Kaisha, Centro de investigación y desarrollo, 1500. Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa 259-0151, Japón.

Reporte de resultados experimentales 1.

1) Objetivo

Se preparará un liposoma de CPT-11 encapsulado que tiene cadenas PEG en ambas superficies interna y externa del liposoma y un liposoma de CPT-11 encapsulado que tiene cadenas PEG solo en una superficie exterior del liposoma.

2) Materiales y método.

a) Materiales

HSPC: Fosfatidilcolina de soja hidrogenada (fabricado por Lipoid, SPC3)

Chol: Colesterol (fabricado por Dishman)

PEG5000-DSPE: polietilenglicol (peso molecular: 5000)-fosfatidiletanolamina (fabricado por NOF Corporation)

CPT-11: Clorhidrato de irinotecan.

2. Preparación del liposoma de CPT-11 encapsulado que tiene cadenas de PEG en ambas superficies interna y externa del liposoma (liposoma de CPT-11 PEG5000 Pre)

- a) Se calentaron 7.06g de HSPC, 2.94 g de colesterol y 1.51 g de PEG5000-DSPE en un termostato a 72°C, después se adicionaron 30mL de etanol dihidratado para disolver cada compuesto. Al mismo tiempo, se prepararon 250mM de una solución de sulfato de amonio como una solución de fase acuosa interna, y 90mL de la solución se calentaron en un termostato a 72°C.
- b) después de verificar la disolución completa del lípido, se mezcló la solución en la cual el lípido fue disuelto y la solución para la fase acuosa interna, y continuamente calentadas en un termostato a 72°C por 10 minutos o más para obtener una dispersión de lípido.
- c) Entonces, se controló un tamaño de partícula de la dispersión de lípido obtenido usando un extrusor T100. en un paso de control de tamaño de partícula, una muestra fue primeramente pasada a través de 0.2µm de dos filtros apilados tres veces. Después de esto, se controló el tamaño de partícula de la muestra al pasar adicionalmente a través filtros de 0.1µm hasta que el tamaño de partícula de la muestra llegara aproximadamente a 100nm, para así obtener un liposoma extruido.
- d) Los pasos i) a iii) se repitieron cinco veces y se mezclaron todos los liposomas obtenidos después de 5 veces, obteniendo así liposoma Polietilenglicolizado
- e) La solución de fase acuosa externa del liposoma Polietilenglicolizado obtenido fue sustituido con una solución 10mM de histidina/10% sucrosa (pH de 6.5) usando flujo cruzado para obtener un liposoma difiltrado.
- f) Se midió una concentración total de lípido del liposoma difiltrado obtenido Después, se adicionó el liposoma difiltrado previamente calentado en un termostato a 50°C, y una solución acuosa conteniendo CPT-11 calentada en un termostato a 50°C al liposoma de manera que la relación (relación de peso) de CPT-11 a lípidos totales es 0.18. Después la adición, la solución mezclada se calentó continuamente en un termostato a 50°C por 20 minutos para obtener un liposoma de carga de fármaco.

- g) Se realizó la remoción de los fármacos no encapsulados del liposoma cargado con fármaco usando flujo cruzado. Una solución 10mM de histidina/sucrosa 10% (pH de 6.5.) se adicionó a la solución muestra de manera que la concentración de CPT-11 fue 5mg/mL. Después, el liposoma se setrilizó a través de filtros 0.2µm, para así obtener la formulación final (liposoma de CPT-11 PEG5000 Pre).

Las características del liposoma preparado se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

	Liposoma de CTP-11 PEG5000 Pre
Lípido PEG	PEG5000-DSPE
tamaño de partícula	102nm
contenido de CPT-11	5.03mg/mL
CPT-11 no encapsulado	0.01mg/mL
Lípidos	
HSPC : Colesterol	54:46 (relación molar
Contenido de modificación de PEG	1.48 % en mol
Relación de fármaco/lípido	0.19

3. Preparación del liposoma de CPT-11 encapsulado que tiene cadenas de PEG solo en la superficie externa del liposoma (liposoma de CPT-11 PEG5000 Post)

- a) 21.17 g de HSP y 8.83 g de colesterol se calentaron en un termostato a 72°C, después se adicionaron 30mL de etanol dihidratado para disolver cada compuesto. Al mismo tiempo, 250mM de una solución de sulfato de amonio se preparó como una solución de fase acuosa interna, y 270mL de la solución se calentaron en un termostato a 72°C.
- b) después de verificar la disolución completa del lípido, la solución en la cual el lípido fue disuelto y la solución para la fase acuosa interna se mezclaron, y se calentaron continuamente en un termostato a 72°C por 10 minutos o más para obtener una dispersión de lípido.
- c) Entonces, se controló un tamaño de partícula de la dispersión de lípido obtenido usando un extrusor T100. En un paso de control de tamaño de partícula, se paso una primera muestra a través de dos filtros 0.2µm apilados tres veces. Después de esto, el tamaño de partícula de la muestra se controló al pasar adicionalmente a través filtros 0.1µm hasta que el tamaño de partícula de la muestra fuera de aproximadamente 100nm, para así obtener un liposoma extruido.
- d) Se pesaron 2.26g de PEG5000-DSPE y se adicionaron a 60mL de agua. La solución se calentó para preparar una solución de PEG en la cual se disolvió el PEG5000-DSPE. Se calentó la solución de PEG en un termostato a 65°C y se mezcló con el liposoma extruido. Después de un calentamiento adicional de la mezcla obtenida por 30 minutos se pudo obtener un liposoma Polietilenglicolizado.
- e) La solución de fase acuosa externa del liposoma Polietilenglicolizado obtenido fse substituyó con una solución 10mM de histidina/10% sucrosa (pH de 6.5) usando flujo cruzado para obtener el liposoma difiltrado.
- f) Se midió una concentración total de lípido del liposoma difiltrado obtenido. Después, el liposoma difiltrado previamente calentado en un termostato a 50°C, y una solución acuosa conteniendo CPT-11 que fue calentada en un termostato a 50°C se adicionaron al liposoma de manera que la relación (relación de peso) de CPT-11 a lípidos totales es 0.18. Después la adición, la solución mezclada se calentó continuamente en un termostato a 50°C por 20 minutos para obtener un liposoma cargado de fármaco.

- g) Se realizó la remoción de los fármacos no encapsulados del liposoma cargado de fármaco usando flujo cruzado. Una solución 10mM de histidina/sucrosa 10% (pH de 6.5.) se adicionó a la solución muestra de manera que la concentración de CPT-11 fue 5mg/mL. Después, el liposoma se esterilizó a través de filtros 0.2µm, para así obtener la formulación final (liposoma de CPT-11 PEG5000 Post).

Las características del liposoma preparado se muestran a continuación en la tabla 2.

Tabla 2

	Liposoma de CTP-11 PEG5000 Post
Lípido PEG	PEG5000-DSPE
tamaño de partícula	114nm
contenido de CPT-11	5.08mg/mL
CPT-11 no encapsulado	0.01mg/mL
Lípidos	
HSPC : Colesterol	54:46 (relación molar
Contenido de modificación de PEG	0.75 % en mol
Relación de fármaco/lípido	0.18

Reporte de resultados experimentales 2.

1) Objetivo

Se examinó la estabilidad de preservación del PEG-DSPE usando formulaciones de liposoma encapsulado de CPT-11 (liposoma de CPT-11 PEG5000 Pre, liposoma de CPT-11 PEG5000 Post)

2) Materiales y método.

a) Prueba de fármaco

- a. El liposoma de CPT-11 PEG5000 pre (de aquí en adelante referido como PEG5000 Pre)
- b. El liposoma de CPT-11 PEG5000 post (de aquí en adelante referido como PEG5000 Post)

Un método de preparación para cada prueba de fármaco se describió previamente en el Reporte de resultados experimentales 1.

b) Método de ensayo

PEG5000 Pre y PEG5000 Post se almacenaron a 40°C para medir la velocidad residual del PEG5000-DSPE después de 2, 4 y 6 semanas.

Además, se almacenaron PEG5000 Pre y PEG5000 Post a 25°C para medir la velocidad residual del PEG5000-DSPE después de 4 u 8 semanas.

Se separó una parte de cada muestra y se precalentó, después se midió la velocidad residual del PEG-DSPE bajo las siguientes condiciones con HPLC.

Detector: un detector diferencial de índice de refracción.

Precolumna: una tubería de acero inoxidable de 4.6 mm de diámetro interno y 5 mm de longitud que se llenó con 5µm de silica gel fenilada por un cromatografo de líquidos (GL Sciences Inc.: GL cart (Intertsil Ph.))

Columna: una tubería de acero inoxidable de 4.6 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud fue llenada con 5µm de silica gel fenilada por un cromatografo de líquidos (GL Sciences Inc.: Intertsil Ph.)

Temperatura de la columna: aproximadamente 50°C

Fase móvil: 500mL de etanol para un cromatógrafo de líquidos y 100mL de metanol para un cromatógrafo de líquidos fueron adicionados en 260mL de una solución amortiguadora de acetato con pH de 4.5

Velocidad de flujo: Un tiempo de retención del colesterol fue ajustado a aproximadamente 17 minutos.

3) Resultado experimental

La figura 1 muestra un resultado experimental de estabilidad de preservación del PEG-DSPE a 25°C y la figura 2 muestra la estabilidad de preservación del PEG-DSPE a 40°C.

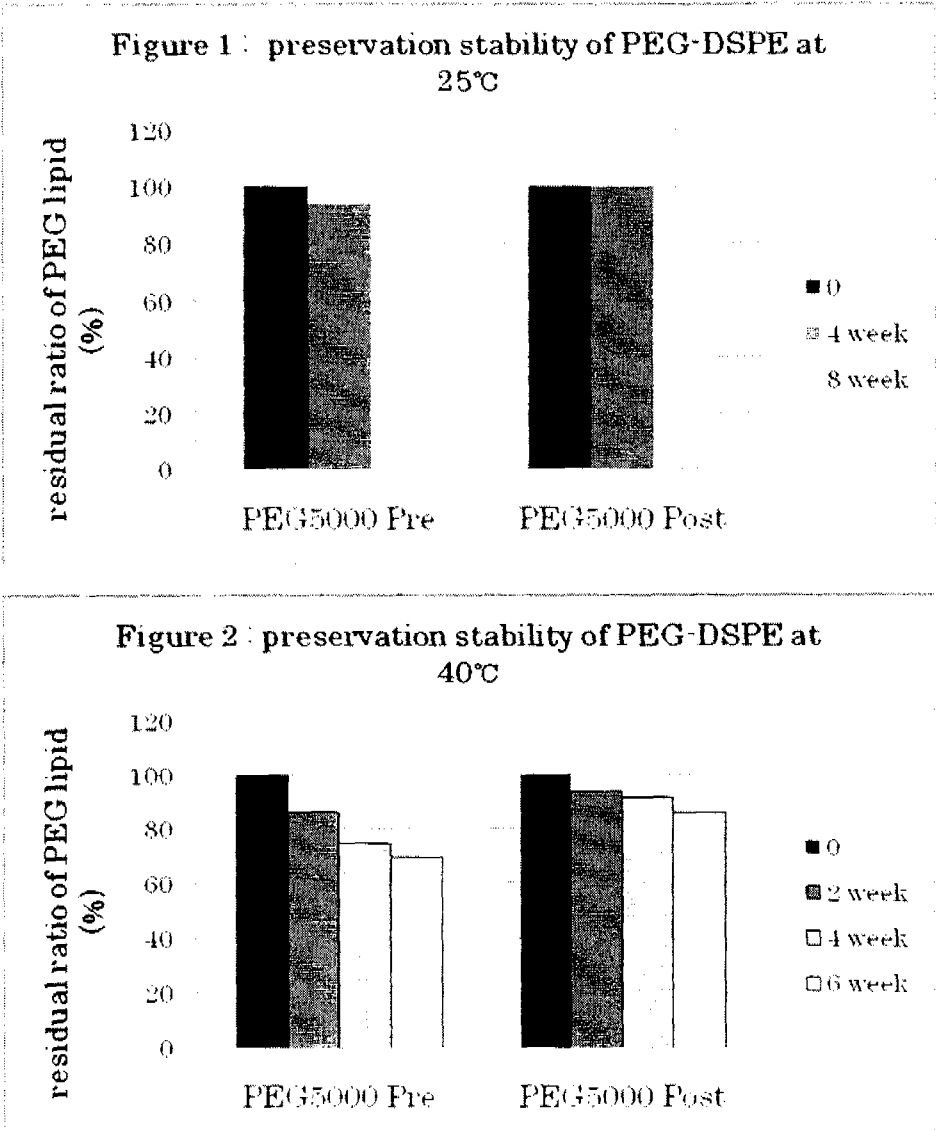


Figura 1

- Figura 1: Estabilidad de preservación de PEG-DSPE a 25°C
- Relación residual del lípido de PEG (%)
- Tiempo transcurrido (0, 4 y 8 semanas)

Figura 2

- Figura 2: Estabilidad de preservación de PEG-DSPE a 40°C
- Relación residual del lípido de PEG (%)
- Tiempo transcurrido (0, 2, 4 y 6 semanas)

Como se puede apreciar en las figuras 1 y 2, se pudo obtener una gran diferencia en la estabilidad de preservación entre PEG5000 pre y PEG5000 post.

En particular, en un ensayo de estabilidad de preservación del PEG-DSPE a 25°C como se muestra en la figura 1, la velocidad residual de PEG-DSPE en el PEG5000 post después de 8 semanas fue de 95% o más.

167

Por otro lado, la velocidad residual de PEG-DSPE en PEG5000 Pre disminuyó en aproximadamente un 88% después de 8 semanas.

En un ensayo de estabilidad de preservación de PEG-DSPE a 40°C como se muestra en la figura 2, la diferencia del mismo se encontró más prominente. La velocidad residual de PEG-DSPE en PEG5000 pre disminuyó en aproximadamente 70% después de 6 semanas mientras que PEG5000 Post mostró un 85% o más de la tasa residual después de 6 semanas.

4) Conclusión

PEG5000 Post con cadenas de PEG solo sobre la superficie exterior del liposoma tiene una estabilidad de preservación superior comparada con PEG500 Pre con cadenas de PEG en ambas superficies interna y externa del liposoma. Los resultados indican que el PEG5000 post es más fácil de manejar como una formulación que el PEG5000 Pre y tiene un tiempo más largo para ser utilizado como formulación.

Experimento

[Experimentador]
Akinobu KURITA

Fecha y lugar de experimentación.

Fecha: agosto 26, 2008-octubre 15, 2008.

Lugar: c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, Yakult Central, Instituto para investigaciones microbiológicas, 1796. Yaho, Kunitachi-shi, Tokio 186-8650 Japón.

Reporte de resultados experimentales 3.

1) Objetivo

Experimentos de farmacocinética fueron realizados mediante el empleo de formulaciones de liposoma encapsulado de CPT-11 (liposoma de CPT-11 PEG5000 pre, liposoma de CPT-11 PEG5000 Post) para comparar las concentraciones totales de CPT-11 de ambas formulaciones.

2) Materiales y metodo

1. Prueba de fármaco

- a. El liposoma de CPT-11 PEG5000 pre (de aquí en adelante referido como PEG5000 pre)
- b. El liposoma de CPT-11 PEG5000 post (de aquí en adelante referido como PEG5000post)

Un método de preparación para cada prueba de fármaco se describió previamente en el Reporte de resultados experimentales 1.

2. Animal

Se compraron ratas (Crl:CD (SD), machos, de 7 semanas de edad) como animales de prueba de Charles River Japan, Inc.

3. Método

Cada formulación de liposoma encapsulado de CPT-11 se administró de manera intravenosa en las venas de la cola de la rata (Crl:CD (SD), machos, de 7 semanas de edad) como animales de prueba de Charles River Japan, Inc.) como una dosis de 10mg/kg o 30mg/kg equivalente de CPT-11. En 1, 2, 4, 8, 24, 48 y 72 horas después de la administración, se recolectaron 0.3mL de sangre de la vena cervical, y se obtuvieron 0.1mL de plasma sanguíneo mediante separación centrifuga, para ser diluida con 0.4mL de una solución de H_3PO_4 0.15M. Después de proveer 0.1mL del plasma sanguíneo diluido con 0.4mL de metanol y posterior agitación, la solución resultante fue tratada en una centrifuga (15,000 rpm, 3 minutos, 0°C). 0.1mL del sobrenadado se diluyó con 0.4mL de una solución interna estándar (1µg de captotecina / mL de H_3PO_4 0.15M), para así obtener una muestra para la medición de la concentración total de CPT-11.

Adicionalmente, n es 3 cuando la dosis de CPT-11 es de 10mg/kg, mientras n es 6 o 5 en el caso de 30mg/kg.

3) Resultado experimental.

Resultado de la medición de la concentración total. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 1 y 2 siguientes.

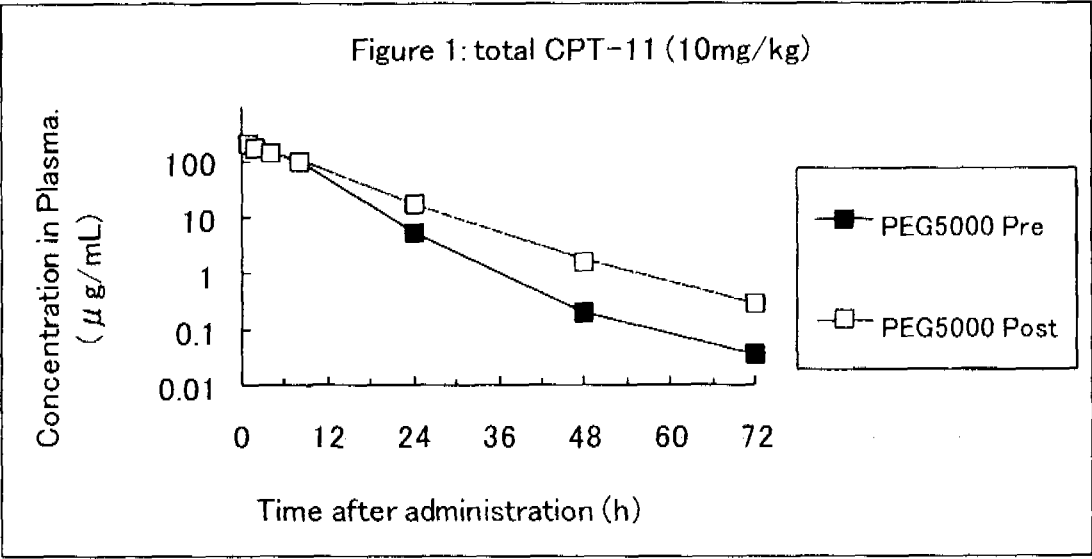


Figura 1

- Figura 1: concentración total de CPT-11 (10mg/kg)
- Concentración en plasma (µg/mL)
- Tiempo después de la administración (h)

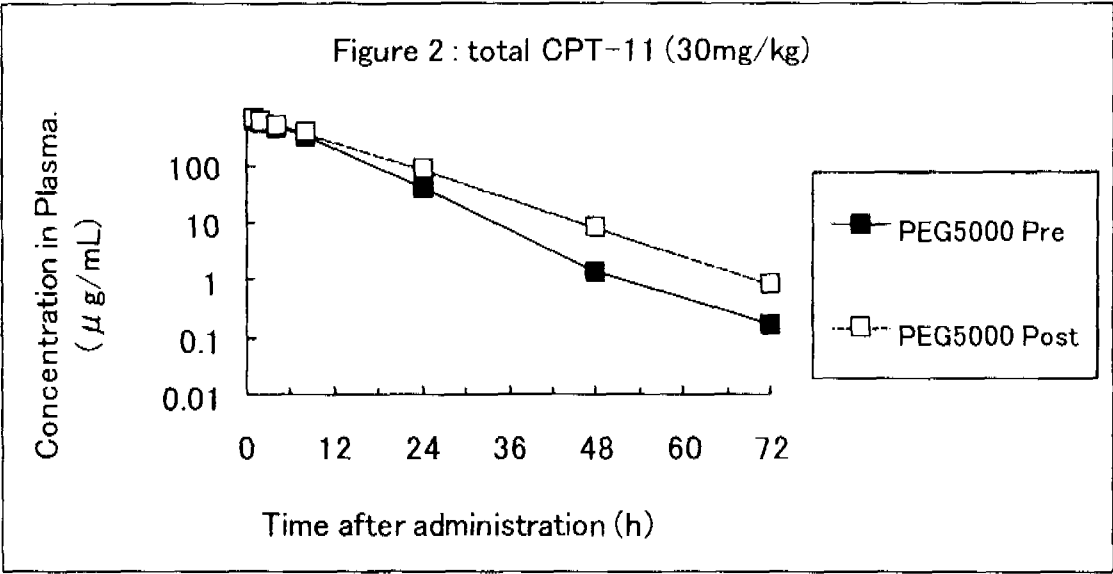


Figura 2

- Figura 2: concentración total de CPT-11 (30mg/kg)
- Concentración en plasma (µg/mL)
- Tiempo después de la administración (h)

A partir de las figuras 1 y 2, se puede apreciar que la concentración total de CPT-11 después de administrar PEG5000 post fue mayor que después de administrar PEG5000 pre en ambos casos de 10mg/kg y 30mg/kg de dosis. Esto es, comparado con PEG5000 Pre, PEG5000 Post mostró un tiempo de retención prolongado más prominente de CPT-11 en la sangre.

2.) Varios parámetros farmacocinéticos

Se calculó un análisis de parámetros farmacocinéticos en un grupo de tratamiento con 30mg/kg de dosis mostrado en la figura 2 usando WinNonlin (Pharsigth Inc.). En un análisis estadístico de PEG5000 Pre, n fue 6 mientras que n fue 5 en un análisis estadístico de PEG5000 Post. Los resultados se muestran abajo. Se realizó un análisis estadístico empleando pruebas t de student. Se determino que en el caso de $P < 0.05$, hay una diferencia significativa entre el caso de PEG5000 Post y PEG5000 Pre.

Tabla 1

Parámetro	PEG5000 Pre (n=6)	PEG5000 Post (n=5)	Prueba t de student (P)
AUC0-72 (µg*h/mL)	7607+/- 586	9102+/- 813	0.0062
AUC0-inf (µg*h/mL)	7609+/- 586	9111+/- 817	0.0062
MRT0-72 (h)	7.53+/- 0.83	9.82+/-0.54	0.0005
MRT0-inf (h)	7.54+/- 0.83	9.90+/-0.56	0.0004
T1/2 (h)	5.74+/- 0.32	7.19+/- 0.53	0.0003
CL tot (L/h/kg)	0.00396+/- 0.0033	0.00331+/-0.00030	0.0076

AUC0-t: área bajo la curva concentración plasma- tiempo hasta un tiempo t después de la administración.

AUC0-inf: área bajo la curva concentración plasma- tiempo hasta un tiempo infinito después de la administración.

MRT0-t: tiempo de retención promedio hasta el tiempo t después de la administración.

MRT0-inf: tiempo de retención promedio hasta el tiempo infinito después de la administración.

T1/2: vida media.

CLtot: depuración total.

En una comparación entre PEG5000 Pre y PEG5000 Post mostrada en la tabla 1, se confirmó que PEG5000 Post permitió significativamente que CPT-11 desapareciera más lentamente (valores altos de MRT y T1/2) y mantenerse en una alta concentración por un largo periodo de tiempo.

4) Conclusión

Como se describió arriba, cuando se usa PEG5000 Post con cadenas de PEG solo sobre una superficie exterior del liposoma, CTP-11 puede permanecer en la sangre en una elevada concentración por un largo periodo de tiempo, comparado al usar PEG5000 Pre con cadenas de PEG en ambas superficies interna y externa del liposoma.

Reporte de resultados experimentales 4.

1) Objetivo

Se realizaron experimentos in vitro de liberación de plasma sanguíneo de ratas usando formulaciones de liposoma encapsulado de CPT-11 (liposoma de CPT-11 PEG5000 pre, liposoma de CPT-11 PEG5000 Post).

2) Materiales y método

1. Prueba de fármaco

a) El liposoma de CPT-11 PEG5000 pre (de aquí en adelante referido como PEG5000 Pre)

b) El liposoma de CPT-11 PEG5000 post (de aquí en adelante referido como PEG5000Post)

Un método de preparación para cada prueba de fármaco se describió previamente en el Reporte de resultados experimentales 1.

2. Método de ensayo

Se realizo una laparotomía a una rata (Cri:CD(SD), macho, ratas de 8 semanas de vida) bajo anestesia nembutal para recolección de sangre desde una aorta abdominal de la rata. Después de agregar 0.2mL de heparina a la sangre recolectada y agitar ligeramente, la solución resultante se trató en una centrifuga (3,000 rpm, 15 minutos, 4°C), para así obtener un sobrenadado (plasma).

El plasma sanguíneo obtenido se almacenó en congelación a -20°C, y descongelado sobre hielo antes de ser empleado. Después, se precalentaron 0.5mL del plasma sanguíneo descongelado a 37°C por 5 minutos, 5µL de una formulación de liposoma encapsulado de CPT-11 (PEG5000 Pre o PEG5000 Post) se adicionaron al mismo para empezar la reacción.

En 0, 1, 2 y 4 horas después de la adición de la formulación, se muestrearon 0.1mL de la formulación acondicionada con plasma y se diluyeron con 0.4mL de una solución de H₃PO₄ 0.15M. Después de diluir 0.1mL del plasma sanguíneo diluido con 0.4mL de metanol, la solución resultante se trató en una centrifuga (1,500 rpm, 3 minutos, 0°C). 0.1mL del sobrenadante obtenido se diluyeron con 0.4mL de una solución interna estándar (captotecina 1µg/mL de una solución de H₃PO₄ 0.15M), para así obtener una muestra para medirle la concentración total de CPT-11.

Mientras tanto, 0.2mL del plasma sanguíneo diluido fueron sometidos a una separación centrifuga (100,000 x g, 30 minutos, 10°C). 0.05mL obtenido en la capa superior se diluyeron con 0.2mL de una solución de H₃PO₄ 0.15M y 0.25mL de una solución estándar interna, para así obtener una muestra para medir la concentración de liberación de liposoma de CPT-11 y SN38.

Entonces, se midió cada concentración de CPT-11 total, liposoma de CPT-11 liberado y SN38 mediante HPLC usando un detector de fluorescencia. La concentración de liposoma de CPT-11 liberado se calculó restando la concentración del liposoma de CPT-11 liberado de la concentración de liposoma de CPT-11 total.

El número de n usado en estos experimentos de liberación fue 3.

3) Resultados experimentales

De la figura 3 mostrada abajo, se aprecia un resultado experimental de PEG5000 Pre y en la figura 4 se muestra el resultado de PEG5000 Post. La relación (%) sobre el eje vertical en la figura 3 y 4 muestra el % en mol de cada sustancia.

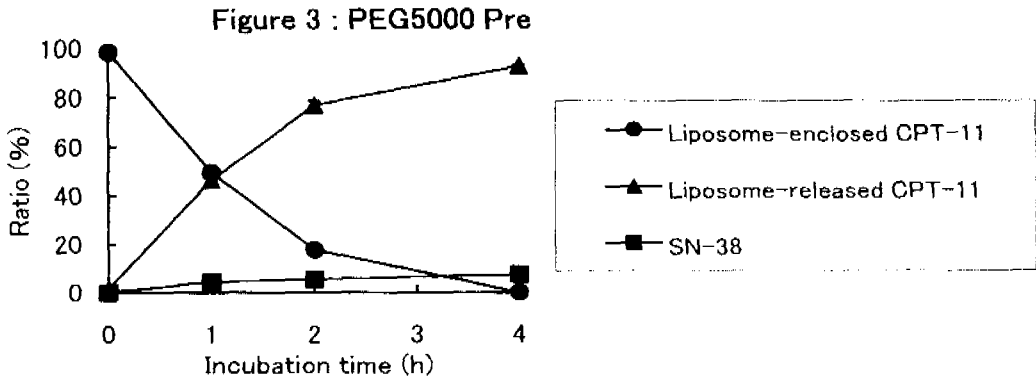


Figura 3

- Figura 3: PEG5000 Pre
- Relación (%)
- Tiempo de incubación (h)

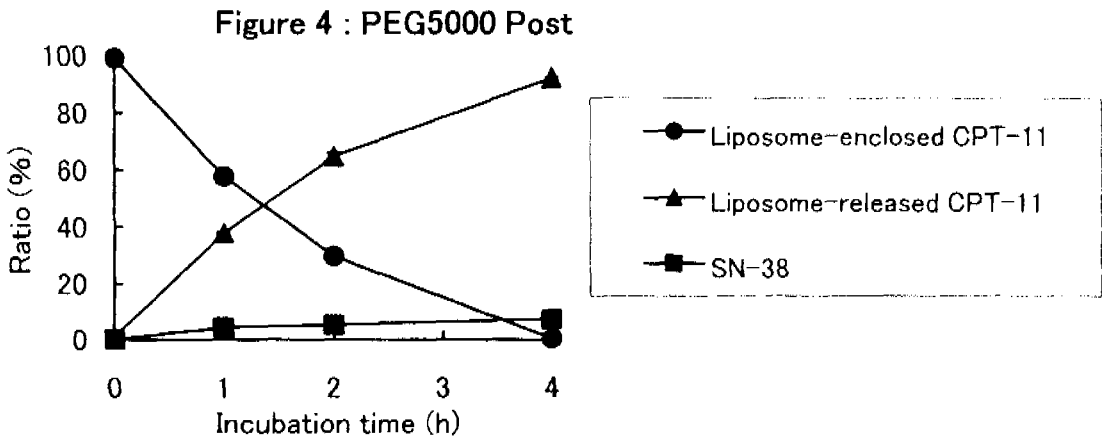


Figura 4

- Figura 4: PEG5000 Post
- Relación (%)
- Tiempo de incubación (h)

En comparación entre las figuras 3 y 4, PEG5000 Post permitió una mayor cantidad de liposoma de CPT-11 encerrada en 1 y 2 horas después de iniciada la reacción. Estos resultados indican que PEG5000 Post libera el CPT-11 en el plasma sanguíneo de una rata más lentamente en comparación al PEG5000 Pre. Esto es, se comprobó que el PEG5000 Post permitió administrar de manera estable una cantidad determinada de CPT-11 por un periodo prolongado de tiempo, comparado con PEG5000 Pre.

4) Conclusión

Se comprobó que el PEG5000 Post que tiene cadenas de PEG solo en la superficie exterior del liposoma mostró una liberación más lenta de CPT-11 y pudo administrarse establemente, comparado al PEG5000 Pre con cadenas de PEG en ambas superficies interna y externa del liposoma.

Experimento

[Experimentador]
Takeshi MATSUZAKI

Fecha y lugar de experimentación.

Fecha: agosto 19, 2008-septiembre 17, 2008.

Lugar: c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, Yakult Central, Instituto para investigaciones microbiológicas, 1796. Yaho, Kunitachi-shi, Tokio 186-8650 Japón.

Reporte de resultados experimentales 5.

1) Objetivo

Efectos antitumorales *in vivo* de formulaciones de liposoma encapsulado de CPT-11 (liposoma de CPT-11 PEG5000 pre, liposoma de CPT-11 PEG5000 Post) se compararon usando ratones desnudos a los cuales se les implantó subcutáneamente células de cáncer de colon humano (HT-29).

2) Materiales y método

1. Prueba de fármaco

- a) El liposoma de CPT-11 PEG5000 pre (de aquí en adelante referido como PEG5000 Pre)
- b) El liposoma de CPT-11 PEG5000 post (de aquí en adelante referido como PEG5000 Post)

Se diluyeron pruebas de fármaco con una solución salina fisiológica (Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd, Lot No. 80515C) para realizar los experimentos.

Un método de preparación para cada prueba de fármaco se describe previamente en el Reporte de resultados experimentales 1.

2. Animal

Se compró un grupo de 10 ratones (BALB/c ratones desnudos (CAnNCg-Foxn1^{nu}/CrJCrJ, macho, 5 semanas de edad, Charles River Japan, Inc.))

3) Células de tumor

Se compraron células de cáncer de colon humano (HT-29) de American Type Culture Collection (ATC) y se implantaron subcutáneamente bajo condiciones de 5% de CO₂ y 37°C usando Medio de águila modificado de Dubelcco (DMEM médium) (10% FBS/DMEM) que contiene 10% de suero bovino fetal (FBS), 100U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina.

4) Implementación y determinación de un ensayo de efecto antitumoral.

2×10^6 células/ 0.1mL / células de ratón (HT-29) se implantaron subcutáneamente en la región inguinal izquierda de un ratón desnudo mediante una jeringa de vidrio y una aguja de inyección. se separó el grupo de manera que se estableció el día 0 como el día en el cual el volumen de un tumor supuesto calculado por $\frac{1}{2}ab^2$ (a representa un diámetro longitudinal de un tumor y b representa un diámetro de eje corto del mismo) llegó alrededor de 100mm³. En el día 1, se administró una prueba de fármaco (PEG5000 pre o PEG5000 post) (12.5 mg/kg/por dosis) intravenosamente. Una solución salina fisiológica empleada como solvente se administró a un grupo de control. Después se extrajeron los tumores y midiendo el peso de los mismos en el día 21, se calculo la velocidad de inhibición del crecimiento del tumor I. R. (%) por la siguiente fórmula para determinar un efecto principal. El volumen del supuesto tumor se midió secundariamente para realizar una comparación total.

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

(3) Resultados experimentales

1. Cambio del volumen del supuesto tumor en un ratón portando un tumor HT-29 debido a la administración de cada prueba de fármaco.

Como se muestra en la figura 1, el volumen del supuesto tumor se ha incrementado tiempo después de implantar un tumor en un grupo de control, en el sistema de prueba. Al contrario, en ambos grupos de prueba, el crecimiento del tumor fue suprimido comparado con el grupo de control. En particular, PEG5000 Post que tiene cadenas PEG solo en la superficie exterior del liposoma demostró tener efectos supresivos superiores del crecimiento del tumor comparado con PEG5000 Pre.

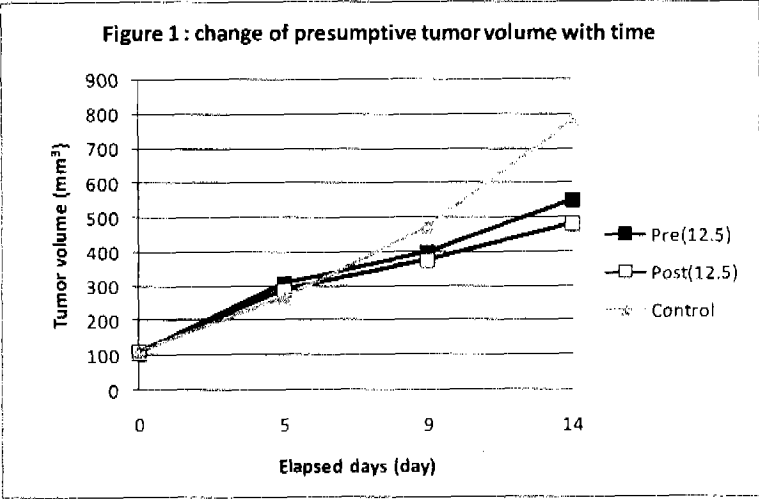


Figura 1

- Figura 1: Cambio del volumen presunto del tumor con el tiempo
- Volumen del tumor (mm³)
- Días transcurridos (días)

2. Efectos supresor del crecimiento del tumor debido a la administración de cada prueba de fármaco.

En el día 21, se determinó finalmente un efecto supresivo del crecimiento del tumor fue finalmente (Tabla 1)

Como se muestra en la tabla 1, comparando tanto PEG5000 Pre como PEG5000 Post con el grupo de control, se encontró un valor menor significativo del peso del tumor. En comparación entre PEG5000 Pre y PEG5000 Post, PEG5000 Post demostró una mayor velocidad de inhibición del crecimiento del tumor.

Tabla 1

Grupo	Dosis (mg/kg)	Peso del tumor (g) (promedio +/- S.D.)	Velocidad de inhibición
Control	-----	0.78+/-0.10	-----
PEG5000 Pre	12.5	0.56+/-0.12	27.8
PEG5000 Post	12.5	0.52+/-0.09	33.2

5) Conclusión

Se compararon los efectos antitumorales de formulaciones de liposoma encapsulado de CPT-11. Como resultado, en las dosis examinadas en esta ocasión, se comprobó que PEG5000 post con cadenas PEG solo sobre la superficie exterior del liposoma mostro una velocidad de inhibición de crecimiento del tumor mayor que la PEG5000 pre con cadenas de PEG sobre ambas superficies interna y externa del liposoma.



219

US006132763A

United States Patent [19]**Fisher**[11] **Patent Number:** **6,132,763**[45] **Date of Patent:** **Oct. 17, 2000** ✓[54] **LIPOSOMES**[75] **Inventor:** **Derek Fisher**, London, United Kingdom[73] **Assignee:** **PolyMASC Pharmaceuticals plc**, London, United Kingdom[21] **Appl. No.:** **08/459,822**[22] **Filed:** **Jun. 2, 1995****Related U.S. Application Data**

[63] Continuation of application No. 08/001,900, Jan. 7, 1993, abandoned, which is a continuation of application No. 07/678,955, Apr. 19, 1991, abandoned.

[30] **Foreign Application Priority Data**Oct. 20, 1988 [GB] United Kingdom 8824593
Oct. 20, 1998 [WO] WIPO PCT/GB89/01262[51] **Int. Cl.⁷** **A61K 9/127; A61K 9/133**[52] **U.S. Cl.** **424/450; 428/402.2**[58] **Field of Search** 424/450, 121, 424/9,321, 9,51, 417, 94.3; 436/829; 935/54; 428/402.2[56] **References Cited****U.S. PATENT DOCUMENTS**

2,310,679	2/1943	De Groote et al. .	
4,016,100	4/1977	Suzuki et al. .	
4,320,121	3/1982	Sears .	
4,415,665	11/1983	Mosbach et al. .	
4,426,330	1/1984	Sears .	
4,507,217	3/1985	Sears .	
4,534,899	8/1985	Sears 260/403	
4,684,625	8/1987	Eppstein et al. .	
4,740,304	4/1988	Tjermeld et al. .	
4,904,479	2/1990	Illum .	
4,981,692	1/1991	Popescu 424/422	
5,013,556	5/1991	Woodle 424/450	
5,192,548	3/1993	Barenolz et al. .	
5,213,804	5/1993	Martin et al. .	
5,225,212	7/1993	Martin et al. .	
5,349,052	9/1994	Delgado et al. .	

5,356,633	10/1994	Woodle et al. .
5,527,528	6/1996	Allen et al. .
5,620,689	4/1997	Allen et al. .

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

0 043 327	1/1982	European Pat. Off. .
0 072 111	2/1983	European Pat. Off. .
0098110 A2	1/1984	European Pat. Off. .
0 118 316	9/1984	European Pat. Off. .
0 140 085	5/1985	European Pat. Off. .
0 144 084	6/1985	European Pat. Off. .
0154316	11/1985	European Pat. Off. .
0 171 946	2/1986	European Pat. Off. .
0 220 797	5/1987	European Pat. Off. .
0 354 855	2/1990	European Pat. Off. .
0572 049 A2	1/1993	European Pat. Off. .
2 552 666	9/1984	France .
59-137409	8/1984	Japan .
2 078 543	1/1982	United Kingdom .
2 079 179	1/1982	United Kingdom .
2 151 203	7/1985	United Kingdom .
2185 397	7/1987	United Kingdom .
2193631	2/1988	United Kingdom .
89/05824	6/1989	WIPO .
89/06549	7/1989	WIPO .

OTHER PUBLICATIONS

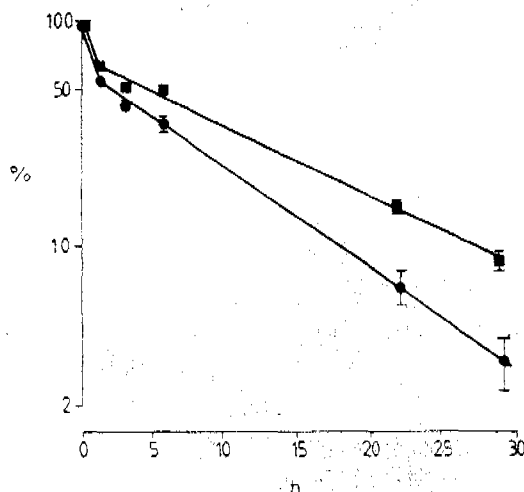
Roding in Seifen-Ole-Felle-Wachse. 116 p. 509, 1990.
Deamer in Liposomes. Chap. I. pp. 27-51, 1983.
STN File Server (Karlsruhe) Chemical Abstracts, vol. 109, No. 3, (1988) (Columbus, Ohio, U.S.). Hoffman et al., "Transfer of functional insulin receptors to receptor-deficient target cells" (abstract No. 17441m and *Endocrinology* 122 :2865-2872).

(List continued on next page.)

Primary Examiner—Gollamudi S. Kishore
Attorney, Agent, or Firm—Morrison & Foerster LLP

[57] **ABSTRACT**

Liposomes with covalently bound PEG moieties on the external surface which demonstrate improved serum half-life following intravenous administration are provided. ✓

11 Claims, 2 Drawing Sheets

2

The major fate of untreated liposomes injected in to the circulation, regardless of size, is uptake by the Kupfer cells of the liver and by fixed macrophages in the spleen. Such uptake by the reticulo-endothelial system (RES) limits the applicability of liposomes in applications such as the formation of reservoirs for the slow release of biologically active molecules and for treatment of tissues other than RES tissues. Treatment of the liposomes according to the present invention, in order to introduce PEG moieties on the external surface surprisingly reduces the interaction between serum

and the liposome and surprisingly increases the circulation life-time following intravenous administration.

A particularly preferred use of the PEG-bearing liposomes of the present invention is in the delivery of MR imaging agents such as Gd:diethylenetriaminepentacetic acid chelate.

The invention further provides the use of liposomes having PEG moieties bound to their external surfaces in therapeutic and diagnostic methods practised on the human or animal body, for instance as delivery means for drugs and for contrast agents for Magnetic resonance (MR) imaging. The invention provides a therapeutic or diagnostic process comprising intravenous administration of an effective, non toxic amount of a PEG-bearing liposomes as hereinbefore described containing a diagnostic or therapeutic agent to a human or non-human animal in need thereof.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The invention will now be illustrated by the figures of the accompanying drawings which:

FIG. 1. shows a comparison of the clearance of PEGylated SUV's and unPEGylated SUVs from the circulation in mice.

FIG. 1A: SUVs of composition DSPC:PE:Cholesterol (molar ratio 0.4:0.1:5) either PEGylated () or untreated () were injected iv into mice (0.4 mg/25 g mouse). Blood levels of CF (dose±se, 5 animals) are shown; ³H phospholipid clearance was similar (not shown).

FIGS. 1B: and 1C: Identical conditions to FIG. 1A except that the SUV preparation had been centrifuged to 100,000 g for 1 hr to remove larger vesicles and the injected dose was 0.8 mg/25 g mouse. Both CF FIG. 1B clearance and ³H phospholipid clearance FIG. 1C are shown for PEGylated () and unPEGylated () vesicles.

The invention will now be illustrated by the following Examples:

EXAMPLES 1-10

PREPARATION OF PEGYLATED LIPID VESICLES

A. Preparation of Activated Tresyl-MPEG

Tresylated monomethoxy PEG (TMPEG) was obtained by treating dry monomethoxy PEG 5000, which is available from Union Carbide, in dichloromethane, with tresyl chloride (2,2,2-trifluoroethane-sulphonyl chloride) which is available from Fluka, at room temperature, using pyridine as a base catalyst. Dichloromethane was removed under reduced pressure and the solid obtained dissolved in methanol-HCl mixture (0.3 ml conc HCl per 1000 ml) and reprecipitated at between -20 and 0°. The solid was isolated by centrifugation, the process repeated until the sample was free of pyridine (detected at 255 nm), and then the solid was reprecipitated from methanol until acid free.

B. PEGylation of Lipid Vesicle Surfaces

The resulting TMPEG was reacted with lipid vesicles at room temperature in buffered solutions (see below). The MPEG covalent attachment of the MPEG to the outer surface of the vesicles was demonstrated by the alteration in the partitioning behaviour of the vesicles in aqueous two-phase systems of PEG and dextran, by a method similar to that of Tilcock et al., *Biochim. Biophys. Acta* 979:208-214 (1989). The composition of the phase system was adjusted so that the vesicles showed a low partition in the top PEG-rich phase; vesicles were at the interface or in the MPEG bottom dextran-rich phase. Attachment of MPEG to

the vesicle surface makes them more "PEG-like" (increases their wetting by the PEG-rich phase) and they partition to the top phase.

Example 1

PEGylation of MLVs (Multilamellar Vesicles)

Multilamellar vesicles containing 20% (w/w) egg phosphatidylethanolamine (EPE) and 80% (w/w) egg phosphatidylcholine (EPC) and ¹⁴C EPC were prepared in 0.125M NaCl containing 0.05M sodium phosphate buffer, pH 7.5 (PBS) at 10 mg total lipid/ml. 0.1 ml samples of vesicles were incubated with solutions of TMPEG prepared in PBS (final concentrations 0-170 mg/ml) for 2 hours at room temperature. Samples were partitioned by adding samples (0.05 ml) to a biphasic system (1 ml of top phase and 1 ml of bottom phase of a phase system of 5% (w/w) PEG 6000 and 5% (w/w) Dextran T500 in 0.15M NaCl containing 0.01M sodium phosphate, pH 6.8, mixing the systems and measuring the radioactivity in samples taken from the mixture immediately after mixing (total) and from the top and bottom phases after phase separation was completed (20 min).

The results in Table 1 show that exposure of the liposome to TMPEG increases their partition into the PEG-rich top phase. This indicates that PEG has become attached to the liposome, presumably by the covalent attachment to the amino group of the EPE.

TABLE 1

The effect of TMPEG on the partitioning behaviour of multilamellar vesicles of EPE/EPC (2:8)

FINAL TMPEG (mg/ml)	PARTITION (%)			n
	Top Phase	Interface	Bottom	
0.0	9.1 ± 4.7	84.5 ± 4.1	6.4 ± 2.4	9
2.0	14.5 ± 5.4	80.2 ± 4.2	5.3 ± 1.6	3
8.0	44.9 ± 6.3	50.8 ± 6.5	4.3 ± 0.4	3
12.5	74.7 ± 9.5	20.1 ± 10.5	5.2 ± 1.4	3
25.0	96.3 ± 7.8	3.1 ± 3.6	4.6 ± 0.8	4
50.0	89.3	6.5	4.5	1
100.0	88.8	5.1	6.1	1
170.00	89.3	6.5	4.2	1

The presence of PE in the vesicle is required for TMPEG to have any effect. When MLVs of 100% EPC were treated with TMPEG for two hours and then partitioned in a 5%/5% PEG 6000-Dextran T500 systems in 0.15M NaCl buffered with 0.01M sodium phosphate, pH 6.8 there was no difference compared to MLVs treated with buffer (Table 2).

TABLE 2

Effect of TMPEG on eggPC Multilamellar vesicles

FINAL TMPEG (mg/ml)	PARTITION (%)			n
	Top Phase	Interface	Bottom	
0	22.5 ± 13.0	71.6 ± 12.0	5.9 ± 1.0	5
25	25.8 ± 13.0	67.8 ± 14.0	6.4 ± 1.0	5

The activity of TMPEG declines on storage. Samples that had lost their ability to PEGylate proteins were found to have no effect on the partitioning of liposomes containing EPE. This observation, taken together with the inability of TMPEG to effect non-PE containing vesicles supports the conclusion that TMPEG attaches to PE specifically, and that

altered partitioning does not arise from adsorption of TMPEG to vesicle surfaces.

Example 2

PEGylation of SUVs (Small Unilamellar Vesicles)

SUVs composed of distearoylphosphatidylcholine (DSPC), dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) and cholesterol in molar ratio 0.8:0.2:1 were prepared by the method of Senior et al., *Biochim. Biophys. Acta* 839: 1-8 (1985), with tracer ^3H -DPPC (6×10^6 dpm per 30 mg phospholipid): 25 mg DSPC, 5.5 mg DPPE and 15 mg cholesterol were hydrated in 2 ml PBS (0.125M NaCl buffered with 0.05M Naphosphate buffer, pH 8.5). To measure liposomal retention of water-soluble molecules during the coupling reaction and subsequent procedures, Carboxy-fluorescein was partially purified and entrapped at 0.15M as described by Senior et al., *Biochim. Biophys. Acta* 839: 1-8 (1985). 0.5 ml SUV were incubated with an equal volume of TMPEG, prepared in PBS (0.125M NaCl buffered with 0.05M Naphosphate buffer, pH 8.5) at 125 mg/ml. for 2 hours at room temperature (Ratio of TMPEG to total DPPE is 6.25). The vesicles were then separated from unreacted TMPEG by gel filtration on Sepharose 4B-CL and partitioned as in Example 1 in a phase system of 5% PEG 8000 (Union Carbide) and 5% Dextran T500 (Pharmacia) in 0.15M NaCl containing 0.01M sodium phosphate, pH 6.8. The results in Table 3 show that exposure of the liposomes to TMPEG increases their partition into the PEG-rich top phase compared with vesicles treated only with buffer (control). This suggests that PEF has been covalently linked to the amino group of the DPPE. PEGylation proceeded without the loss of the entrapped CF.

TABLE 3

Phase Partitioning of PEGylated and unPEGylated SUVs			
VESICLES	PARTITION ¹ (%)		
	Top Phase	Interface	Bottom
Untreated	1.4 ± 0.2	36.0 ± 5.0	62.5 ± 5.1
TMPEG-treated	96.5 ± 1.0	1.4 ± 1.1	2.1 ± 0.4

¹mean ± n = 6

Example 3

The SUVs, as used in Example 2, were treated with TMPEG (125 mg/ml) and their partitioning compared with SUVs treated with MPEG (125 mg/ml) or buffer: the TMPEG treated vesicles were completely (100%) partitioned into the top phase, whereas the MPEG-treated vesicles and buffer-treated vesicles showed no top phase partitioning, and similar even distributions between the interface and the bottom phase. This provides additional support for the suggestion that TMPEG acts by covalent attachment to the vesicle surface, and not by adsorption.

Example 4

PEGylation of LUVettes (Large Unilamellar Vesicles Prepared by Extrusion) of Defined Size

LUVettes were prepared as described by Tilcock et al., *Biochim. Biophys. Acta* 979:208-214 (1989).

LUVettes of 100 nm diameter were prepared at a final concentration of 10 mg/ml. Mixtures of dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and dioleoylphosphatidyl ethanolamine

(DOPE) in chloroform at various molar ratios (total 20 mmoles) were combined with 2uCi of ^3H DPPC and the solvent removed by evaporation under reduced pressure (<0.1 mm Hg) for 2 hours. The lipid was dispersed by vortex mixing at room temperature in 1.55 ml of 50 mM Hepes, 100 mM NaCl pH 7-9 to give a final lipid concentration of 10 mg/ml. Large unilamellar vesicles were then produced by repeated extrusion (10 times) of the lipid dispersion MLVs through two stacked 100 nm polycarbonate filters using the Extruder device (Lipex Biomembranes, Canada) by the method of Hope et al., *Biochim. Biophys. Acta* 812: 55-65 (1985). Diameters determined by QEL using a Nicomp model 270 particle analyzer.

The vesicles were PEGylated by incubation with 40 ul of buffer containing TMPEG at room temperature. At intervals 20 ul samples were removed and partitioned in a phase system of 1.5 ml top phase and 1.5 ml bottom phase of a 5% PEG 8000 (Union Carbide) and 5% Dextran T500 (Pharmacia) system prepared 0.15M NaCl buffered with sodium phosphate pH 6.8 at room temperature. Samples of top and bottom phase were removed for counting 20 min after the phase had been mixed and allowed to separate. This phase system was selected so that the partitioning of the untreated vesicles into the top phase was extremely low (<5%); the majority of the vesicles were approximately equally divided between the bottom phase and the bulk interface.

Example 5

The time course and pH dependency of the PEGylation reaction using a two-fold excess of TMPEG to the DOPE present at the outer surface of LUVettes are used in Example 4. At pH 8-9 incubation with TMPEG rapidly caused a time dependent transfer of vesicles to the top phase. At pH 7.5 the reaction was considerably slower and at pH 7.0 there was virtually no transfer to the top phase. In a separate experiment in which the bottom phase and interface partitioning was also measured it is seen that at pH 7.2, although top phase partitioning does not alter there was decrease in bottom phase partitioning with an increase in interface partitioning, indicating that PEGylation proceed at pH 7.2 albeit more slowly than at higher pHs. At pH 8 the partitioning moves from the bottom phase to the interface and then to the top phase; at pH 9 and 10 vesicles are moved rapidly from the interface and bottom phase to the top phase. Thus the PEGylation reaction is very sensitive to pH and appropriate choice of conditions of time and pH can determine the degree of PEGylation. The extent of PEGylation can also be controlled by the amount of TMPEG used. Treating 100 nm Luvettes of DOPE/DOPC (0.2:0.8) at pH 9.0 with varying molar ratios of TMPEG increased partitioning into the top phase consistent with increasing PEGylation. There was a marked increase in top phase partitioning between the molar ratios 1.0 and 1.3 from 20% to 90%. When the partitioning in the bottom phase and at the interface is also measured (Table 4) it can be seen that PEGylation at the lower ratios of TMPEG:outerDOPE molar ratio causes a progressive change in the partition from the bottom phase to the interface and subsequently to the top phase demonstrating gradations in the degree of PEGylation.

It is clear from the time course of the partitioning that reaction at pH 9 is virtually complete by 1 hour. Thus defined degrees of PEGylation are obtained by control of the TMPEG:DOPE ratio.

TABLE 4

Molar ratio TMPEG: DOPE	Partitioning (%)		
	at outer surface	Bottom	Interface
0		50	40
0.2		56	41
1.0		28	58
1.3		1	9

Measurement of the fraction of amino groups (from PE) exposed at the outer surface of the LUVettes, made by the method of Hope, M. J. and Cullis, P. R. *J. Biol. Chem.* 262: 4360-4366 (1987) in 0.05M TNBS in borate buffer at pH 8.5, gave values of 47% for DOPC:DOPE vesicles (8:2), close to the theoretical value of 50% for equal distribution of the PE between the inner and outer surfaces. PEGylation caused a decrease in the PE content detectable by this assay, suggesting covalent attachment of the MPEG to the free NH_2 group of PE. For example, when a 3-fold mole excess of TMPEG to outer PE was added to DOPC:DOPE vesicles of 7:3 molar ratio for 1 hour, the percentage of outer PE PEGylated was 36%; when a 6-fold molar excess was added, this percentage PEGylation increased to 45%.

Example 6

Stability of Lipid Vesicles to PEGylation

The stability of lipid vesicles was measured by the extent of efflux of 6CF (6-carboxyfluorescein) as described by Senior and Gregoriadis in "Liposome Technology," (G Gregoriadis ed) vol 3, p. 263 (1984) CRC Press. LUVettes of 100 nm composed of DOPC:DOPE were prepared with entrapped 50mM 6CF (6-carboxyfluorescein) in 100 mM NaCl at pH 8.5, external 6CF was removed by column chromatography on Sephadex G-25 using 50 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 8.5 as eluant. Samples for latency measurement were added to 4 ml of buffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 9) and fluorescence measured (dye released), and to 4 ml of buffer containing 25 mM octylglucoside, incubated for 30 min at 37° to ensure complete disruption of the vesicles and fluorescence measured (total dye). Fluorescence was measured at 490 nm excitation and 520 nm emission.

LUVettes of 100 nm were PEGylated with TMPEG without any loss of latency. Vesicles of DOPC:DOPE 8:2 were treated with a 3 fold molar ratio of TMPEG to DOPE present in the outer vesicle surface at pH 8.5 to ensure extensive PEGylation (demonstrated by phase partitioning). There was no leakage of 6CF out of the vesicles over a period of 2 hours demonstrating that PEGylation occurs without disruption of the lipid bilayer.

Example 7

Interaction of SUVs With Serum

0.1 ml of SUVs of composition DSPC:PE:Cholesterol (molar ratio 0.4:0.1:0.5), with or without coupled PEG (see above) were incubated at 37° with 0.5 ml of fresh plasma (mouse) or buffer. Samples were removed at intervals and partitioned as in Example 2 above. SUVs partitioned about 20% top phase, 60% interface and 20% bottom phase. Treatment with serum caused an immediate (within 1 min) alteration in the vesicle surface properties indicated by their partition: 0% top phase, 40% interface and 60% bottom

phase. The plasma proteins alone partitioned mainly to the bottom phase (68% bottom, 32% top; Partition coefficient = 0.47 ± 0.02 , $n=4$). Thus it appears that the SUVs are immediately coated with serum proteins which then cause the vesicles to partition with similar characteristics to the proteins. PEGylation of the SUVs increased their partition into the top phase (almost 100%); on exposure to serum there was a change in their partition towards the interface and the bottom phase, but importantly this process was very slow compared with the virtually instantaneous effect of serum on unPEGylated SUVs. Since the partitioning behaviour relates to the sum of the forces imposed by the PEGylation and serum binding, and with the former is not a linear function, it is not simple to determine whether the effect of serum on partition is equal for the PEGylated and for the unPEGylated liposomes. This could, however, be determined with a detailed dose response analysis of the effect of PEGylation on the partition coefficient so that the influence of serum could be determined at various parts of the dose response curve in "PEG-equivalents". This would establish whether serum had different effects on the PEGylated and unPEGylated liposomes. The order of magnitude differences in partition behaviour suggests that PEGylation slows down the adsorption of serum components onto the vesicles.

Separation of the SUVs exposed to serum by gel chromatography gave vesicles which showed partitioning behaviour close to that of the vesicles before exposure. Thus the interaction between vesicles and serum is reversed by re-isolation of the vesicles.

These experiments also demonstrate that the altered surface properties of the SUVs imposed by PEGylation are not substantially reversed by serum protein adsorption.

Example 8

Stability of LUVettes to Serum is Increased by PEGylation

To determine the stability of LUVettes to serum vesicles containing entrapped 6CF (50 ul) were incubated at 37° with 0.5 ml serum (freshly hydrated lyophilised human serum, Monitrol-ES, Dade Diagnostics) to provide a final lipid concentration of approx 1 mg/ml, a concentration corresponding to the maximum in vivo serum concentrations expected on the basis of the imaging experiments of Unger et al *Radiology* 171: 81-85. Samples were removed at intervals and the 6CF released was measured fluorimetrically. Vesicles were PEGylated with a 3-fold excess of TMPEG to outer surface DOPE overnight at room temperature, after which time there had been loss of latency.

50 nm vesicles of DOPC:DOPE at 8:2 molar ratio showed considerable loss of latency in the presence of serum (eg only 10% latency remained after 2 hrs) which PEGylation did not decrease; 100-nm vesicles showed a latency of 35% after 2 hrs which was unaffected by PEGylation; 200 nm vesicles showed a smaller loss of latency (eg 65% latency remained after 2 hrs), which also was not inhibited by PEGylation. However, for 100 nm vesicles of 7:3 molar ratio DOPC:DOPE, PEGylation decreased serum induced loss of latency by a factor of 2. Increasing the DOPE content to 40 mole % and 50 mole % increased the stability of the vesicles to serum; nevertheless PEGylation produced additional stabilisation. Table 5 summarises these data.

TABLE 5

Stabilisation of 100 nm LUVette latency to serum (2hr, 37°)		
	g	b. PEG lation
DOPC:DOPE	Latency (%)	
molar ratio	UnPEGYLATED	PEGylated
8:2	35	35
7:3	55	83
6:4	90	95
5:5	92	99

Example 9

PEGylation Does not Alter the Relativity of Encapsulated Gd-DTPA

Gd-DTPA was encapsulated in LUVettes composed of DOPC:DOPE 7:3 by the method of Tilcock et al *Radiology* 171: 77-80 (1989).

Half of the sample was PEGylated with TMPEG (molar ratio of TMPEG: PE on outer surface of 3:1). Both control and PEGylated samples were diluted in saline buffer (139 mM NaCl, 10 mM Hepes, 6 mM KCl, pH 8.5) to give four samples with effective Gd concentrations of 2, 1, 0.5, and 0.25 mM (calculated as described by Tilcock et al., *Radiology* 171: 77-80 (1989) given the known trap volume of the vesicles, the lipid concentration and assuming the concentration of entrapped Gd-DTPA was 0.67M.) Samples of 10-12 ml were imaged with a Toshiba 0.5T MRT-50A whole body scanner. Relaxivities are obtained from linear regressions of 1/T1 (spin lattice relaxation time constant) against the effective Gd-DTPA concentration. These were unaffected by PEGylation of the vesicles.

Example 10

PEGylation of SUVs Decreases Their In Vivo Clearance

SUVs of composition DSPC:PE:Cholesterol (molar ratio 0.4:0.1:0.4) (0.2 ml containing 0.4 mg phospholipid) were injected intravenously into the tail vein of male TO mice (5 in each group). Clearance of PEGylated and unPEGylated vesicles was assessed from entrapped CF and ³H-radiolabelled phospholipid measured in blood samples (25 ul) withdrawn at intervals in the method of Senior and Gregoriadis in "Liposome Technology" vol 3 pp 263-282 (1984), CRC Press. In another experiment an 0.8 mg dose of phospholipid was given as the supernatant from ultracentrifugation at 100,000 g for 1 hour, which contains small vesicles of 20-100 nm (average 50 nm) as described by Senior et al *Biochim Biophys Acta* 839: 1-8 (1985).

FIG. 1A shows the clearance of SUVs after intravenous administration of a sonicated, uncentrifuged preparation. This preparation contains, presumably, some larger vesicles which are cleared rapidly, in both the PEGylated and unPEGylated samples. However the slower clearance phase corresponds to about 50-60% of the lipid dose and showed a marked difference in the half life of the PEGylated sample (10 hr) compared with the unPEGylated preparation (7 hr). In the preparation in which the larger vesicle had been removed (FIG. 1B and FIG. 1C) the PEGylated vesicles had half life of 14 hr compared with untreated vesicles of 12 hr.

What is claimed is:

1. Liposomes having PEG moieties covalently bound to phospholipids on the external surface, wherein said liposomes are selected from large unilamellar vesicles (LUV's), small unilamellar vesicles (SUV's) and multilamellar vesicles (MLV's).
2. Liposomes according to claim 1, wherein said liposomes comprise a mixture of lipids.
3. Liposomes according to claim 2 wherein the lipid bilayers comprise a 7:3 to 5:5 molar ratio of DOPC to DOPE.
4. Liposomes according to claim 2 wherein the lipid bilayers comprise a mixture of dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE).
5. A pharmaceutical composition comprising an aqueous suspension of liposomes according to claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.
6. A process for producing a liposome according to claim 1 comprising treating liposomes with a polyethylene glycol having at least one activating group capable of coupling said polyethylene glycol to said liposome.
7. A process according to claim 6 wherein the reactive derivative is 2,2,2-trifluoroethane sulphonyl-monomethoxy-polyethylene glycol.
8. Liposomes according to claim 1, obtained by reacting 2,2,2-trifluoroethane sulfonyl-monomethoxy PEG derivatives with liposomes.
9. Liposomes according to claim 1, wherein essentially all said PEG moieties are bound on the external surface of the liposome.
10. Liposomes according to claim 1, wherein said liposomes display an enhanced partition to the PEG-rich (upper) phase of a PEG:dextran aqueous two phase system in which liposomes not having PEG moieties covalently bound to phospholipids on the external surface separate predominantly to the interface or bottom phase.
11. Liposomes according to claim 1, wherein said liposomes display a decreased adsorption of serum proteins than liposomes not having PEG moieties covalently bound to phospholipids on the external surface.

* * * * *

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado:
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

ASUNTO: Radicación No. 06 120 944
 Trámite 011
 Evento 378
 Actuación 430
 Oficio
 Folios 14140

Como resultado del Examen de Fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

Documentos estudiados:

Descripción: Folios 7 a 122 como se radicó inicialmente.

Reivindicaciones: Folios 123 a 124 como se radicó inicialmente.
 Folio 205 como se modificó en fase nacional.

Figuras: Folio 126 a 146 como se radicó inicialmente.

Prioridad: JP 2004-163742 (2004-06-01)

Objeto de la Invención

Título de la invención: "Formulación de irinotecan"

Problema Técnico Planteado: "Necesidad de una formulación cuyas características mantengan la concentración de SN-38 en el plasma por un periodo de tiempo prolongado"

Solución: "Proporcionar 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 activo/mol de lípidos totales"

IPC: A61K 31/4745 AC; A61K 9/127 AC; A61K 47/4 AC; A61K 47/18 AC; A61K 47/24 AC; A61K 47/30 AC; A61P 35/0

Se acepta el nuevo capítulo reivindicatorio para su estudio.

Determinación del Estado de la Técnica

El Estado de la Técnica se determinó con base en la fecha de prioridad 2004-06-01 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Item	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	WO03041681	<i>Lipid carrier compositions with enhanced blood stability</i>	22.05.2003
D3	US 6132763	<i>Liposomes</i>	17.10.2000

Análisis de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La nueva reivindicación 1 dice: "Una formulación de irinotecan caracterizada porque incluye un liposoma formado por una bicapa de lípidos que contiene un fosfolípido como componente principal de la membrana, en donde solo la superficie exterior del liposoma esta modificado con un agente modificador de superficie que contiene un polímero hidrofílico, en la que el irinotecan y/o una sal del mismo están encapsulados en una concentración de por lo menos 0.1 mol/mol (mol de fármaco/mol de lípido total de la membrana) por un gradiente iónico comprendido entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa del liposoma.", f.205.

D1 presenta liposomas que presentan una estabilidad mejorada en sangre (portada, f.178; párr.5) con fosfolípidos formando la membrana lipídica y que contienen irinotecan (p.5, pár.27), en donde el ingrediente activo puede ser transportado al interior del liposoma por medio de un gradiente de iones (p.16, pár.75, f.182), usando compuestos ionizables como aminas primarias, secundarias, terciarias para lograr el llenado de las vesículas (página 17). D1 sugiere que los liposomas tienen una estabilidad aumentada y que la formulación como tal posee características que la hace más estable como p.ej. la adición de proteínas (pár.70). D1 también sugiere que el lípido usado para hacer el liposoma puede afectar la estabilidad del liposoma en la sangre (pár. 103). D1 revela que la adición de polímeros hidrofílicos sobre los liposomas tenía la habilidad de aumentar la circulación del liposoma en la sangre (pár. 105). D1 revela que los liposomas proveen una liberación controlada de los activos en tanto brindan en su compartimento interno mayor protección para los activos dado que los activos no están expuestos a la sangre lo cual los aísla de la metabolización que esto puedan sufrir antes de llegar a los sitios donde pueden tener actividad, lo que sugiere que la efectividad del activo se verá mejorada en tanto logrará llegar a las dianas terapéuticas sin sufrir una alteración en su propia estructura (pár. 3)

La solicitud se diferencia de D1 en que la superficie exterior del liposoma esta modificado con un agente modificador de superficie que contiene un polímero hidrofílico

El Efecto Técnico que logra la diferencia es el aumento de la estabilidad del liposoma.

El Problema Técnico Objetivo de esta solicitud es la necesidad de composiciones de liposomas que contengan irinotecan y que aumenten la vida media del compuesto.

D3 revela liposomas con enlaces covalente de PEG sobre su superficie externa, en el fosfolípido que forma el liposoma, que demuestra tener una vida mayor mejorada después de la administración intravenosa. Enseña además que la vida en el plasma es mayor al tener el polímero hidrofílico en la parte externa del liposoma (portada, f.219). D3 revela que el enlace de PEG en la superficie externa del liposoma extiende el tiempo de vida de circulación de los liposomas sin que se desintegre la bicapa lipídica. (col.1, ln.42-47 f.220). Además dice que las unidades de PEG son unidas a grupos amino en las diversas especies de fosfolípidos que formen el liposoma (col.1, ln. 50-55, f.220). D3 sugiere que el polímero empleado es

hidrofílico (col.2, ln.19-21, f.220).

El efecto mostrado por el solicitante no es inesperado en tanto D3 mostraba que la característica técnica de colocar un residuo de algún polímero hidrofílico sobre los fosfolípidos de las vesículas lograría mejorar la estabilidad y aumentar la vida del liposoma, lo que se traduce en un aumento de la actividad biológica de los activos, una modificación de su velocidad de liberación, una mejora de su distribución del activo y una mejora de sus parámetros farmacocinéticos al ser administrados con una formulación que obedece a las combinación de dichas características técnicas presentadas por D1 y D3.

El experto en la materia, teniendo en cuenta las enseñanzas de D3 habría optado por colocar residuos de polímeros hidrofílicos sobre los fosfolípidos de la capa externa de los liposomas revelados en D1, con el fin de mejorar el desempeño de las composiciones, mejorar su estabilidad y sus características farmacocinéticas habría logrado llegar a la formulación de irinotecan presentada en esta solicitud.

Dado que no hay un efecto sorprendente o inesperado se concluye que las reivindicaciones 1 a 6 no poseen nivel inventivo.

Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud se encuentran afectados así:

Nº	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	WO03041681	1-6	Nivel inventivo
D3	US 6132763	1-6	Nivel inventivo

Respuesta a los argumentos del solicitante

Con relación a la modificación a la descripción dice el solicitante que: "Se ha modificado el valor 0.85 de la tabla 9 de la descripción en la columna de "Composición de la Resina de carga (relación molar)", "PEG-DSPE" y en la fila "equipo de preparación ejemplo 11" por 0.75."

Se acepta dicha modificación, no se observa una ampliación de materia.

Frente al nivel inventivo de la invención el solicitante se pronuncia de la siguiente manera: "D1 falla en describir un liposoma que tiene solo su superficie exterior modificada con un agente modificador de superficie que contiene un polímero hidrofílico". Prosigue de la siguiente manera: "D2 no describe un liposoma en el cual solo la superficie exterior del liposoma este modificada con un agente modificador de superficie que contiene un polímero hidrofílico." Por lo que concluye el solicitante que lo reclamado en la reivindicación 1 es diferente de la materia revelada por D1 y D2 en la característica de modificar solo la superficie exterior del liposoma con el polímero hidrofílico" proporcionándole nivel inventivo a la presente solicitud.

Observa este Despacho que de acuerdo a la nueva reivindicación 1, donde se especifica – como además reposa en el memorial – que la característica técnica esencial de los liposomas acá reclamados es la presencia de un polímero hidrofílico sobre los fosfolípidos de la capa externa de los liposomas, se reconoce que D1 y D2 fallan a mencionar dicha característica. Sin embargo, han sido tenidas en cuenta sus enseñanzas y sugerencias en

el presente estudio de patentabilidad, en tanto si revelaban las características de la reivindicación 1 original.

El solicitante presentó experimentos comparativos con la formulación de CPT-11 de conformidad con la presente invención y formulaciones CPT-11 con polímeros en la superficie interior como en la exterior. Las formulaciones de la presente invención mostraron tener un comportamiento superior con respecto a varias características como retención en la sangre, estabilidad y un efecto supresor del crecimiento tumoral. Lo que no está descrito ni en D1 ni en D2.

Se observa que en efecto, D1 y D2 no logran el mismo tipo de efecto en tanto no poseen el polímero en la superficie externa del liposoma.

Se reveló que la formulación de CPT-11 en la cual se modificó solo la superficie exterior del liposoma con PEG logró: (1) la supresión de la liberación de CPT-11 por un periodo prolongado de tiempo, (2) proporcionar excelente estabilidad en el tamaño de la partícula y en la tasa de liberación del CPT-11 incluso al almacenarlo por 6 meses a 4°C, (5) lograr una excelente retención en la sangre por un largo periodo de tiempo

Además el solicitante presenta estudios de farmacocinética de una formulación de CPT-11 en la cual se modificó solo la superficie exterior del liposoma con PEG (PEG5000 Post) y una formulación de CPT-11 en la cual se modificaron tanto la superficie interior como exterior del liposoma con PEG (PEG5000 Pre), y se observó que PEG5000 Post en comparación con PEG5000 Pre, permite: (1) una retención en sangre del fármaco superior, (2) lograr una concentración de CPT-11 mayor por un periodo prolongado de tiempo, (3) una liberación más lenta de CPT-11, (4) la administración estable de CPT-11 por un periodo prolongado de tiempo (5) un elevado efecto antineoplásico y retener la concentración en plasma y la concentración intratumoral de CPT-11 y su metabolito activo, SN-38, por un periodo prolongado de tiempo, (6) tener un efecto supresor mayor del crecimiento del volumen del tumor (7) mantener la estabilidad de la membrana incluso si el valor de pH de la fase acuosa interna es bajo, (8) mayor estabilidad de preservación, (9) excelente estabilidad de preservación con un efecto supresor superior del ofrecimiento del tumor, comparado a la formulación de liposoma que tiene polímeros hidrofílicos sobre ambas superficies interna y externa del liposoma.

Tal mejora en varias características de la formulación al tener un polímero hidrofílico solo sobre la superficie exterior del liposoma no se encuentra descrito en D1 ni en D2. Esto es, se puede decir que estos efectos obtenidos son para un experto en la materia no predecibles.

Este despacho considera que a la luz de lo reclamado por la nueva reivindicación 1, ni D1, ni D2 revelan la característica técnica esencial mostrada por el solicitante en el presente capítulo reivindicatorio. Sin embargo, D3 presenta sugerencias acerca de los residuos de polímeros hidrofílicos sobre los fosfolípidos de la capa externa de los liposomas como se observa en el análisis de patentabilidad realizado al capítulo reivindicatorio modificado.

Sin embargo, se deja de presente que los dos documentos están relacionados con el campo de la presente invención en tanto, presentan composiciones con liposomas que pueden contener como principio activo irinotecan, así como también, estas anterioridades revelan la naturaleza de los polímeros hidrofílicos que son empleados en la presente solicitud de patente.

En efecto, D1 revela que el uso de polímeros hidrofílicos aumenta la estabilidad y el tiempo de circulación de los liposomas en sangre sin que estos sean destruidos; y además muestra que la estabilidad de la formulación es también parte fundamental del desarrollo de este tipo de formulaciones. D1 además, muestra que los liposomas son capaces de liberar activos en lugares adecuados, lo que se traduce en un aumento de la eficacia del medicamento.

Por tal motivo, estas anterioridades han sido tenidas en cuenta para la evaluación del presente capítulo reivindicatorio.

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de 60 días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

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 N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL

Directora de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 29 OCT. 2010

CONCEPTO TECNICO NUMERO: 2804	EXAMINADOR TÉCNICO Código:202092
----------------------------------	-------------------------------------