



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-45772

21 EXPEDIENTE No.

54 TÍTULO FORMULACION LIPOSOMAL DE BORTEZOMIB (PS-842).

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 9/127
A61K47/26 // A61K47/10
A61P7/00

71 SOLICITANTE ALBA CORPORATION

DOMICILIO MONTEREY, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74 APODERADO JIMENA ESCOBAR URIBE

22 BOGOTÁ, D. C., 08/05/2007

05 06 2007

SS



No. 07-045772- -00000-0000

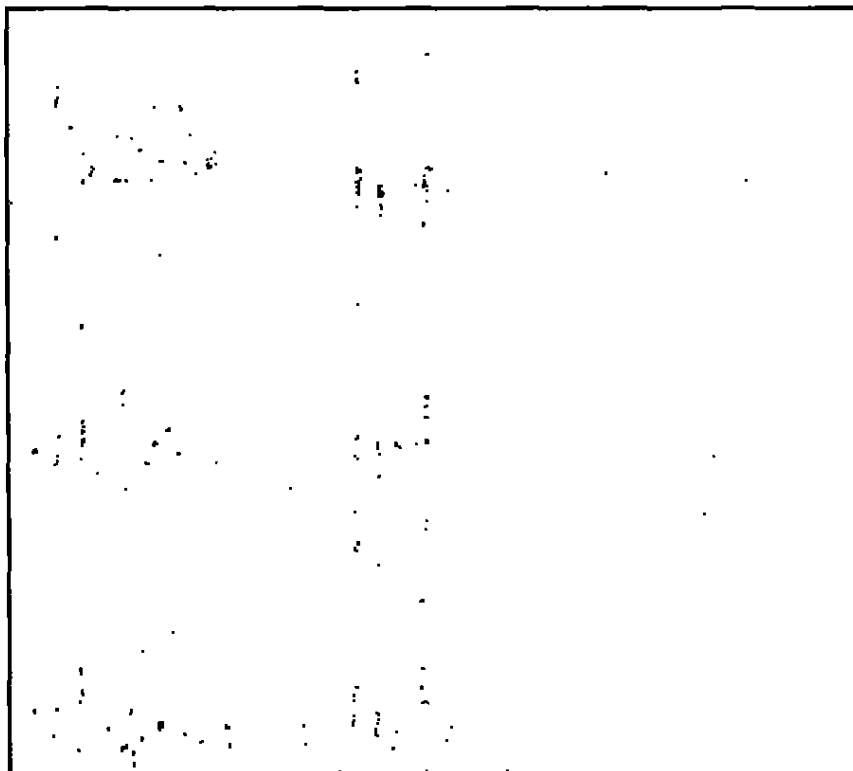
Fecha: 2007-05-08 16:54:44 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 65

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: ALZA CORPORATION Dirección: 1900 Charleston Road, P.O. Box 7210, Mountain View, California 94039-7210, Estados Unidos de América. Nacionalidad o Domicilio: Mountain View, California, Estados Unidos de América. Lugar de Constitución : Delaware Teléfono: Fax: E-mail:		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número
3 REPRESENTANTE APODERADO (74)	Nombre: JIMENA ESCOBAR URIBE Dirección: Cra. 11A No. 94-76 (Of. 305) Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889 E-mail: tm-patent@escobaruribe.com		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número 39.779.452 T.P.68.228
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: VER ANEXO Dirección: Nacionalidad o domicilio:		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2005/039972</u> Fecha <u>04 de noviembre de 2005</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2006/052733 A1</u> Fecha <u>18 de mayo de 2006</u>			
6 TÍTULO (54) <u>FORMULACION LIPOSOMAL DE BORTEZOMIB (PS-341).</u>			
7 Clasificación Internacional (51) <u>A61K 8/127</u> <u>A61K 47/26</u> // <u>A61K 47/10</u>			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>Estados Unidos de América</u>	(32) Fecha <u>05 de noviembre de 2004</u>	(31) Número de Solicitud <u>60/625.216</u>
9 Comprobante de pago N . <u>07 - 30.856</u> Fecha <u>17 de abril de 2007</u>			

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ 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 de 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 12 X 12 .
- ☐ 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

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA: *Jimena Escobar Uribe*

C.C. 39.779.452 de Usaquén T.P. 68.228

3063/PCT

22

3063

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 30,856
FECHA : ABRIL 17 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-045772-00000-0000

Fecha: 2007-05-08 16:54:44 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE/II Evo: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 65

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	63069516	17/04/2007	8,312,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.

SOM: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

3 3

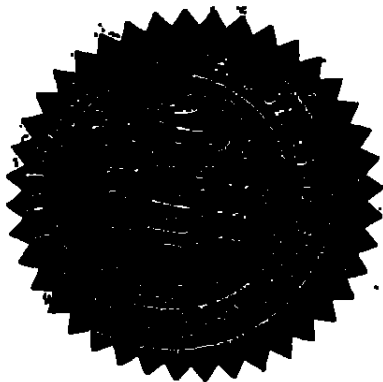
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

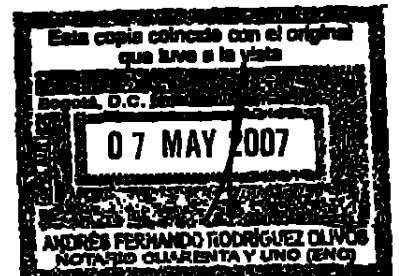
1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
CHRISTINA A CLICKNER
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
CHRISTINA A CLICKNER, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 17TH DAY OF MAY 2005
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A226807
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



John E McCormac



ESCOBAR-URIBE ASSOCIATION
ABOGADOS

Carrera 11A No. 94 - 76 OF 305 - PO Box 94948, Santaró de Bogotá Colombia S.A
Tela (571)6162051 - 6162061 - 616859 - 6161869
FAX (571) 6161889

POWER OF ATTORNEY

The undersigned
PAUL A. COLETTI

acting on behalf of and representing
ALZA CORPORATION

domiciled in
**1900 CHARLESTON ROAD, P.O. BOX 7210,
BUILDING M10-3B, MOUNTAIN VIEW,
CALIFORNIA 94043-7210, USA**

herely appoint
**JIMENA ESCOBAR-URIBE Y/O IGNACIO
ESCOBAR-URIBE**

domiciled in Bogotá, Colombia
CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

as our true and legal attorneys with the necessary powers: 1. to apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial designs, commercial emblems and names, trademarks, copyrights and neighbouring rights, plant varieties, health licenses as well as their assignments, extensions, renewals, changes of name and domicile; 2. to prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3. to intervene as plaintiffs or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial administrative or police action, such as: actions dealing with commercial emblems and names; oppositions against trademark registrations, caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to industrial property matters, copyrights and neighbouring rights and obtention of plant varieties' rights.

To this effect, we hereby authorize them to file applications, make descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted; to receive all kinds of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the abovementioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect our interests, with all other necessary legal faculties, and we hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to our benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on our behalf any action, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, conciliating, substituting and revoking substitutions, taking notifications and appointing judicial or extrajudicial attorneys.

Signed in
New Brunswick, New Jersey

Date: April 28, 2005

ALZA CORPORATION

PAUL A. COLETTI
Assistant Secretary

Done and signed at New Brunswick, New Jersey

Christina A. Clickner
NOTARY PUBLIC

My Commission Expires: March 2, 2010

powercol.doc

DOCUMENTO DE PODER

El suscrito

Paul A. Coletti
obrando a nombre y representación de
Alza Corporation

con domicilio en

**1900 Charleston Road, P.O. Box 7210,
Building M10-3B, Mountain View,
California 94043-7210, Estados
Unidos de América.**

**JIMENA ESCOBAR-URIBE Y/O IGNACIO
ESCOBAR-URIBE**

domiciliados en Bogotá, Colombia
CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente: 1. para recibir de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, registro de marcas, registro de derechos de autor y derechos conexos, registro de variedades vegetales, depósito de nombres comerciales y onomas, registros sanitarios, así como sus traspaños, prorrogas, renovaciones, cambios de nombre y de domicilio; 2. elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clase; 3. intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso, y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario, público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas del nombre o sistema comerciales; oposición al registro de marcas; acciones de caducidad y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad industrial; el ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad industrial, los derechos de autor y derechos conexos y los derechos de obtentor de variedades vegetales.

A este efecto, los facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, emiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores cuando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses, con todas las demás facultades necesarias y por este documento desde ahora declaramos válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en nuestro beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en nuestro nombre lo actuado, así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, conciliar, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en

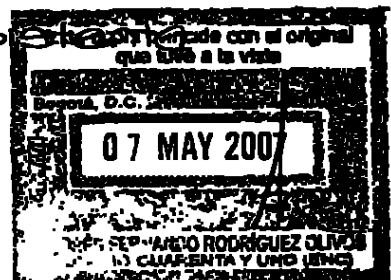
New Brunswick, Nueva Jersey.

el 28 de Abril de 2005.

Alza Corporation

Paul A. Coletti
FIRMA

Secretario Asesor



AZ0020 CO

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

El abajo firmante Notario Público certifica que el día 28 de Abril de 2005 compareció (cieron) ante mí Paul A. Coletti, quien (s) me consta que es (son) la (s) persona (s) que firma (n) el instrumento que antecede en su calidad de *Secretario* *asistente* de la compañía Alza Corporation, sociedad existente, debidamente constituida y que ejerce su objeto social de conformidad con las leyes de California, domiciliada en Mountain View, California. Certifico, además, que dicha persona está facultada para firmar el documento que antecede en nombre de la citada sociedad, y que los objetivos y finalidades para los que se otorga el mencionado instrumento están comprendidos dentro de los objetivos o actividades de la mencionada sociedad.

Notario Público

NOTARIAL CERTIFICATION

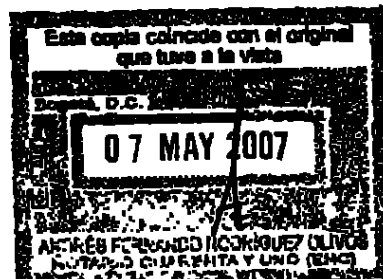
The undersigned Notary Public certifies that on April 28, 2005 before me personally appeared Paul A. Coletti, who signed the forgoing instrument as Assistant Secretary of Alza Corporation, a corporation existing, duly organized and complying with its corporate purposes in conformity with the laws of California, whose home office is located in Mountain View, California. I further certify that said individual is duly authorized to sign the forgoing instrument in the name of said corporation and that the purposes for which said instrument is granted are within the scope of the objects or activities of said corporation.

**CHRISTINA A. CLICKNER
NOTARY PUBLIC, STATE OF NEW JERSEY
MY COMMISSION EXPIRES MAR. 2, 2010**

Christina A. Clickner

Notary Public

**Esta certificación notarial debe ser llenada en su totalidad y legalizarse por
Apostilla
This notarial certification must be filled in completely and be legalized by Apostille**



6 1/2

Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 del Ministerio de Justicia, del documento legalizado mediante la APOSTILLA No. A226807 de 17 de mayo de 2005 expedida en Estados Unidos de América, el cual corresponde a un documento de poder en inglés con su correspondiente traducción al español (razón por la cual no se hace traducción del mismo texto), otorgado por la sociedad Alza Corporation, domiciliada en Mountain View, Estado de California, Estados Unidos de América a Jimena Escobar-Uribe y/o Ignacio Escobar-Uribe firmada por Paul A. Coletti, Secretario Asistente, en New Brunswick, New Jersey, el 28 de abril de 2005.

Sello y firma: Christina A. Clickner, Notario Público. Mi comisión termina el 2 de marzo de 2010.

Certificación notarial con su correspondiente traducción al español, razón por la cual no se hace traducción del mismo texto.

Sello y firma: Christina A. Clickner, Notario Público de Nueva Jersey. Mi comisión termina el 2 de marzo de 2010.

APOSTILLA

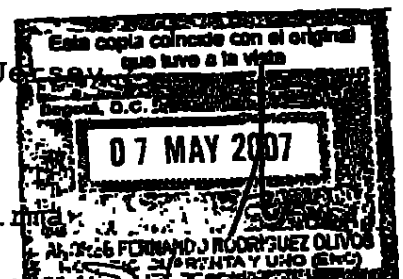
(Convención de la Haya de 5 de octubre de 1961)

1. País: **Estados Unidos de América**
2. Este documento público ha sido firmado por **Christina A. Clickner**.
3. Actuando en su calidad de **Notario Público de Nueva Jersey**
4. Lleva el sello/estampilla de **Christina A. Clickner, Notario**

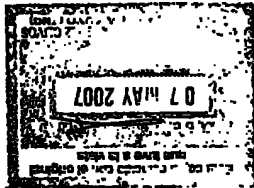
CERTIFICADO

5. En **Trenton, Nueva Jersey**
6. El día **17 de mayo 2005**
7. Por **John E. McCormac, Tesorero de Nueva Jersey**
8. NO. **A226807**
9. Sello/Estampilla
(fdo) firma ilegible
Sello oficial

10. Firma




JIMENA ESCOBAR URIBE
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

376541
Jimena Escobar
COTA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO QUE SEMPLA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 JUN 13 P 2:27

ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

7-7

ANEXOS

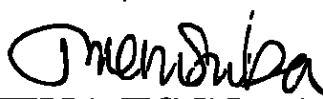
INVENTORES

1.) **ZALIPSKY, Samuel**
(1202 Truman Street, Redwood City, California 94061, Estados Unidos de América);
2.) **MARTIN, Francis**
(160 San Fernando Way, San Francisco, California 94127, Estados Unidos de América).

8
7

Solicito expresamente a nombre de **ALZA CORPORATION.**, sociedad constituida de conformidad con las leyes del estado de Delaware, Estados Unidos de América, domiciliada en 1900 Charleston Road, P.O. Box 7210, Mountain View, California, Estados Unidos de América, el otorgamiento de Patente para la invención titulada **"FORMULACION LIPOSOMAL DE BORTEZOMIB (PS-341)".**

Clase: A61K 9/127


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen.
T.P. 68.228

9-7

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad Estadinense (31) No. Prioridad 00/025,216 (32) Fecha 05/11/04 (33) Pais US		(51) Int Cl: A61K 9/127 (71) Solicitante(s) ALZA CORPORATION (72) Inventor(es) ZALIPSKY, Samuel // MARTIN, Francis. (74) Agente: JIMENA ESCOBAR URIBE	
(85) Fecha inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: Fecha 04/11/05 No. de solicitud PCT/US2005/039872		(87) Publicación internacional Fecha: Fecha (dd/mm/aa) 18/05/05 N° publicación: WO 2006/062733 A1	
(54) Título: FORMULACION LIPOSOMAL DE BORTEZOMIB (PS-341)			

Reivindicación(es):

- 1.- Una composición que comprende: liposomas formados de un lípido de formación de vesícula, y atrapado en dichos liposomas, un compuesto de éster de boronato preparado a partir de bortezomib y un poliol.
- 19.- Una composición para uso en la destrucción selectiva de tejido tumoral en un sujeto portador de tumor que experimenta terapia de radiación, que comprende liposomas que tienen (I) una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y (II) un isótopo de boro.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describe una composición de liposomas conformada por liposomas que tienen un compuesto peptídico de ácido borónico inhibidor de proteasoma bortezomib atrapado en el liposoma; el compuesto de ácido borónico se atrapa en el liposoma en forma de un éster de boronato, después de la interacción con un poliol atrapado en liposoma; en una modalidad, los liposomas tienen un revestimiento externo de cadenas poliméricas hidrófilas y se utilizan para tratar una malignidad en un sujeto.

10

15

20

4A*1A*6A*8A/todas

P07/800F

FORMULACIÓN LIPOSOMAL DE BORTEZOMIB (PS-341)

CAMPO TECNICO

5 El tema en cuestión descrito aquí se relaciona aquí con una composición de liposoma que comprende un compuesto de ácido borónico, y en particular que contiene el compuesto de ácido borónico peptídico bortezomib.

TECNICA ANTECEDENTE

Los liposomas, o vesículas bicapa lipídicas, son vesículas esféricas que comprenden bicapas lipídicas ordenadas concéntricamente que encapsulan una fase acuosa. Los liposomas funcionan con un vehículo de suministro para agentes terapéuticos y de diagnóstico contenidos en la fase acuosa o en las bicapas lipídicas. El suministro de fármacos en forma atrapada en liposomas puede proporcionar una variedad de ventajas, dependiendo del fármaco, incluyendo por ejemplo una menor toxicidad de fármaco, farmacocinética alterada o una mejor solubilidad del fármaco. Los liposomas cuando se formulan para incluir un revestimiento superficial de cadenas de polímero hidrófilo, llamado Stealth® o liposomas de circulación larga, ofrecen la ventaja adicional de una vida útil prolongada de circulación en la sangre, debido en parte a la menor remoción de los liposomas por el

sistema de fagocitos mononucleares. Frecuentemente una vida útil extendida es necesaria para que los liposomas alcancen su región objetivo deseada o célula a partir del sitio de inyección.

Idealmente tales liposomas pueden prepararse para que incluyan
5 un compuesto terapéutico o de diagnóstico (i) con una elevada eficiencia de carga, (ii) en una alta concentración de compuesto atrapado, e (iii) en forma estable, es decir con escasa fuga de compuesto al almacenarse.

Métodos para formar liposomas bajo condiciones en las cuales el
compuesto a ser contenido se carga pasivamente en los liposomas son bien
10 conocidos. Típicamente una película lipídica seca se hidrata con un medio de fase acuosa para formar vesículas multilamelares que atrapan pasivamente el compuesto durante la formación de liposoma. El compuesto puede ser ya sea un compuesto lipófilo incluido en la película lipídica seca o un compuesto soluble en agua contenido en el medio de hidratación. Para compuestos
15 solubles en agua, este método da eficiencias más bien escasas de encapsulado, en las cuales típicamente sólo 5-20% del compuesto total en la suspensión de liposoma final está en forma encapsulada. El compuesto adicional puede perderse si las vesículas se procesan adicionalmente, es decir mediante extrusión, para producir liposomas de tamaño más uniforme y
20 pequeño. La escasa eficiencia de encapsulado limita la cantidad de compuesto que puede cargarse en los liposomas y puede presentar costos de recuperación del compuesto elevados en la fabricación.

Se han propuesto una variedad de otros métodos de atrapamiento pasivos para formar liposomas cargados con compuesto, incluyendo métodos de inyección de solvente y un enfoque de fase de valoración inversa (Szoka, F. y Papahadjopoulos, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4194-4198, (1978)). Estos métodos tienden a sufrir de eficiencias relativamente escasas de carga y/o problemas en el manejo de solventes.

También se ha propuesto cargar pasivamente compuestos en liposomas al incubar el compuesto con liposomas preformados a una temperatura elevada en la cual el compuesto es relativamente soluble, permitiendo al compuesto equilibrarse en los liposomas a esta temperatura, luego bajar la temperatura de los liposomas para precipitar el compuesto dentro de los liposomas. Este método está limitado por las eficiencias de encapsulado relativamente bajas que son características de métodos de carga pasivos. También el compuesto puede perderse rápidamente a partir de los liposomas a temperatura elevada, por ejemplo temperatura del cuerpo.

La carga del compuesto contra un gradiente de liposoma electroquímico o de pH de adentro hacia fuera ha probado ser útil para cargar compuestos ionizables en liposomas. En teoría se pueden lograr eficiencias de carga muy elevadas al emplear gradientes adecuados, por ejemplo gradientes de pH de 2-4 unidades y mediante la selección apropiada de condiciones de carga iniciales (Nichols y Deamer, D., *Biochim. Biophys. Acta* 455:269-171, (1976)). Con este método la fuga de compuestos de los liposomas seguirá a la pérdida de gradiente de iones a partir de los liposomas.

Por ello el compuesto puede retenerse establemente en forma encapsulada en liposoma únicamente si el gradiente de iones se mantiene.

Este problema de estabilidad de gradiente se trató y se resolvió por lo menos parcialmente al emplear un gradiente de sal de amonio para la carga del compuesto (Haran, G., et al, *Biochim. Biophys. Acta* 1151:201-215, (1993)). Los iones de amonio sobrantes, que actúan como una fuente de protones en los liposomas, funcionan como una batería para reabastecer protones perdidos durante el almacenamiento, incrementando así la vida útil delgadita de protones y por ende reduciendo el porcentaje de fuga de los liposomas. El método se limita a compuestos de amina ionizables.

El problema de estabilidad de gradientes también ha sido tratado al incluir un agente de atrapamiento ionizable en los liposomas, que funciona como un contraión al compuesto ionizable y para formar un complejo de ionización y un precipitado con éste (Patente de los Estados Unidos No. 6,110,491). Otro enfoque descrito en la técnica para cargar y retener un compuesto ácido débil que contiene al menos un grupo carboxilo dentro de liposomas e incluye un catión en los liposomas que se salará o precipitará el compuesto (patente de los Estados Unidos 5,939,096).

La patente de los Estados Unidos 5,380,531 describe liposomas que tiene un aminoácido o péptido atrapado, en donde la C-terminal del aminoácido péptido se modifica a un grupo no ácido, como una amida o un éster metílico y el aminoácido o péptido modificado se carga en los liposomas contra un gradiente iónico de transmembrana. El aminoácido o péptido

modificado actúa como una base débil y el compuesto es impulsado hacia los liposomas en virtud de un pH de liposoma interno bajo y un gradiente de pH de liposoma externo elevado. El compuesto se protona al alcanzar el espacio de liposoma interno y se mantiene en el liposoma en forma protonada.

5 A pesar de estos varios enfoques para carga compuestos terapéuticos en liposomas, algunos compuestos siguen siendo difíciles de cargar en un liposoma, particularmente en una relación elevada de fármaco a lípido para eficacia clínica.

Los compuestos de ácido borónico peptídicos son derivados
10 peptídicos usualmente cortos de 2-4 aminoácidos que contienen ácido aminoborónico en el extremo ácido, extremo C-terminal, de las secuencias (Zembower et al., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 47(5):405-413 (1996)). Debido a la capacidad de formar un complejo de borato tetrahédrico estable entre el grupo de ácido borónico y la serina de sitio activo o en la porción de histidina, los
15 ácidos borónicos peptídico son poderosos inhibidores de serina proteasa. Esta actividad frecuentemente se mejora y se hace altamente específica a una proteasa en particular al variar la secuencia de los ácidos borónicos peptídico e introducir residuos aminoácidos no naturales y otros sustituyentes. Esto llevó a la selección de ácidos borónicos peptídico con poderosas actividades
20 antiviral (Priestley, E. S. y Decicco, C.P., *Org. Lett.*, 2(20):3095-3097 (2000); Bukhtiyarova, M. et al., *Antivir. Chem. Chemother.*, 12(6):367-73 (2001); Archer, S. J. et al., *Chem. Biol.*, 9(1):79-92 (2002); Priestley, E. S. et al., *Bioorg. Med. Chem, Lett.*, 12(21):3199-202 (2002)) y citotóxica (Teicher, B. A.

et al., *Clin. Cancer Res.*, 5(9):2638-2645 (1999); Frankel *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6(9):3719-3728 (2000); Lightcap, E. S. *et al.*, *Clin. Chem.*, 46(5):673-683 (2000); Adams, J., *Semin. Oncol.*, 28(6):613-619 (2001); Cusack, J. C., Jr. *et al. Cancer Res.*, 61(9):3535-3540 (2001); Shah, S. A. *et al.*, *J. Cell Biochem.*, 82(1):110-122 (2001); Adams J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6(4):493-500 (2002); Orlowski, R. Z. y Dees, E. C., *Breast Cancer Res.*, 5(1):1-7 (2002); Orlowski, R. Z. *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 20(22):4420-4427 (2002); Schenkein, D., *Clin. Lymphoma*, 3(1):49-55 (2002); Ling, Y. H., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 9(3):1145-1154 (2003)). Estos derivados sufren de los mismos problemas que otros péptidos cortos, muy notablemente un aclaramiento muy rápido y la incapacidad de alcanzar el sitio objetivo *in vivo*.

Un compuesto tal es bortezomib, previamente conocido como PS-341(Velcade[®], Millennium Pharmaceuticals, Inc, Cambridge, MA). Bortezomib es un derivado de ácido borónico dipeptídico y se sintetizó como un inhibidor de proteasoma reversible altamente selectivo y potente con un K_i de 0.6 nmoles/L (Adams, *et al.*, *Semin. Oncol.*, 28(6):613-619 (2001)). Utilizando el análisis *in vitro* del Instituto Nacional de Cáncer, el bortezomib mostró citotoxicidad contra una gama de líneas tumorales (Adams, *id.*) y tuvo actividad antitumores en próstata de humanos (Frankel *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6(9):3719-3728 (2000); DiPaola *et al.*, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 15(3):509-524 (2001)) y en modelos de xenoinjerto de cáncer de pulmón (Oyaizu *et al.*, *Oncol. Rep.*, 8(4):825-829 (2001)).

Sería deseable atrapar bortezomib en un portador liposomal. Sin embargo, hay dificultades asociadas con cómo cargar eficientemente estos dipéptidos relativamente no polares. A juzgar por sus estructuras y la ausencia de grupos amino fácilmente ionizables, los compuestos muy probablemente no se acumulen en liposomas mediante un gradiente de pH o método de gradiente de amonio, que se discutieron arriba. El encapsulado pasivo es una opción, pero dada la naturaleza no polar del compuesto, es probable que pasen a través de la membrana lipídica con facilidad y así el fármaco encapsulado se ha liberado con tiempo y al diluirse.

Los ejemplos anteriores de la técnica relacionada y limitaciones relacionadas con esta pretenden ser ilustrativos y no exhaustivos. Otras limitaciones de la técnica relacionada serán evidentes para los expertos en la técnica al leer la especificación y estudiar los dibujos.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

En consecuencia, en un aspecto, se proporciona una composición de liposoma que comprende un compuesto de ácido borónico peptídico atrapado establemente en los liposomas.

En otro aspecto, se proporciona una suspensión de liposomas que tiene bortezomib atrapado en los liposomas en forma de un éster de boronato peptídico.

En un aspecto, el tema en cuestión descrito aquí se relaciona con una composición que comprende liposomas formados de un lípido de formación de vesículas, y atrapado en los liposomas, un compuesto de éster de boronato preparado a partir de bortezomib y un poliol.

5 En otra modalidad el poliol es un compuesto que tiene una funcionalidad cis 1,2-diol o 1,3-diol. Un poliol de ejemplo es alcohol polivinílico. Otro poliol de ejemplo es un catecol. Otros polioles de ejemplo son un monosacárido, un disacárido, un oligosacárido y polisacárido. El monosacárido puede ser por ejemplo maltosa, glucosa, ribosa, fructosa o
10 sorbitol. El poliol también puede ser glicerol o poliglicerol o un aminopoliol, como aminosorbitol. En particular los copolímeros del alcohol vinílico y aminas de vinilo se contemplan.

 En otra modalidad, los liposomas además comprenden un gradiente iónico inferior exterior/superior interior. El gradiente iónico puede
15 ser, por ejemplo, un gradiente iónico de hidrógeno (pH). Cuando el gradiente iónico es un gradiente pH, el pH de interior de los liposomas puede estar entre alrededor de 7.5-8.5 y el pH del ambiente fuera de los liposomas puede estar entre alrededor de 6-7.

 En otra modalidad, los liposomas además incluyen entre
20 alrededor 1-20% en mol de una porción hidrófoba derivada con un polímero hidrófilo.

 En modalidades en donde los liposomas incluyen una porción hidrófoba vinculada covalentemente con un polímero hidrófilo, un polímero

preferido es polietilenglicol. Una porción hidrófoba preferida es un lípido y es preferiblemente un lípido formador de vesícula.

En incluso otro aspecto, se provee un método de tratamiento. El método comprende preparar una suspensión de liposomas en una solución acuosa, los liposomas teniendo atrapado en los mismos un éster de boronato de bortezomib preparado al hacer reaccionar bortezomib y un poliol, y administrar la suspensión de liposomas a un sujeto.

En una modalidad los liposomas se administran por inyección.

En incluso otro aspecto, se describe un método para destruir selectivamente tejido de tumor en un sujeto que porta un tumor que sufre terapia de radiación. El método comprende administrar a un sujeto que porta un tumor; liposomas que tienen en forma atrapada, bortezomib unido covalentemente a un poliol para formar un compuesto de éster de boronato de peptídilo y un isótopo de boro; y someter al sujeto a una terapia de radiación de neutrones.

En una modalidad, el isótopo de boro está en el compuesto bortezomib, tal como ^{10}B .

Además de los aspectos de ejemplo y modalidades descritas arriba, aspectos y modalidades adicionales serán evidentes mediante referencia a los dibujos y mediante estudio de las siguientes descripciones.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A a 1Q muestran estructuras de diversos compuestos de ácido borónico peptídicos;

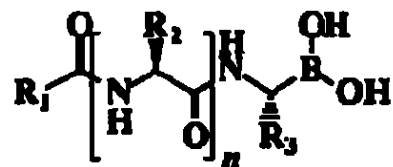
5 la figura 2 ilustra la carga de bortezamib en un liposoma contra un gradiente de pH inferior exterior/superior interior para reacción con un poliol atrapado y formación de un compuesto de éster de boronato dentro del liposoma.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

"Poliol" pretende describir un compuesto que tiene más de un grupo hidroxilo (-OH).

15 "Compuesto de ácido borónico peptídico" pretende describir un compuesto de la forma



20 en donde R¹ R² y R³ son porciones seleccionadas independientemente que pueden ser iguales o diferentes una de otra y n es de 1-8, preferiblemente 1-4. En las figuras 1A a 1Q se proveen compuestos ejemplares.

Bortezomib se refiere a un compuesto de ácido borónico monomérico que tiene el nombre químico de ácido [(1R)-3-metil-1-[[[(2S)-1-oxo-3-fenil-2-[pirazinilcarbonil)amino]propil]amino]butil]borónico.

Un "polímero hidrófilo" se refiere a un polímero que tiene cierta
5 cantidad de solubilidad en agua a temperatura ambiente. Polímeros hidrófilos de ejemplo incluyen polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxi propiloxazolina, polihidroxi propilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polihidroxi propilmetacrilato, polihidroxi etilacrilato, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polietilenglicol,
10 poliaspartámina y secuencias peptídicas hidrófilas. Los polímeros pueden ser empleados como homopolímeros o como copolímeros de bloque o aleatorios. Una cadena de polímero hidrófila preferida es polietilenglicol (PEG), preferiblemente como una cadena PEG que tiene un peso molecular entre 500-10,000 daltons, más preferiblemente entre 750-10,000 daltons, aún más
15 preferiblemente entre 750-5000 daltons.

"Gradiente de pH elevado interior/inferior exterior" se refiere a un gradiente de pH de transmembrana entre el interior de los liposomas (mayor pH) y el medio externo (menor pH) en el cual los liposomas están suspendidos. Típicamente el pH de liposoma interior es de al menos una
20 unidad de pH mayor que el pH del medio externo, y preferiblemente 2-4 unidades mayor.

"Liposoma atrapado" se refiere a un compuesto secuestrado en el compartimento acuoso central de los liposomas, en el espacio acuoso entre bicapas lipídicas de liposoma o dentro de la bicapa en sí.

5 II. Formulación de liposoma

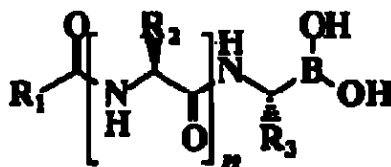
En un aspecto, la invención proporciona una composición de liposoma que tiene bortezomib atrapado en los liposomas en el compuesto de ácido borónico peptídico en forma modificada. En esta sección la composición de liposoma y método de preparación serán descritos.

10

A. Componentes de liposoma

Como se notó arriba, la formulación de liposoma comprende liposomas que contienen bortezomib en forma de éster de boronato. Los compuestos de ácido borónico peptídico, tales como bortezomib, son péptidos que contienen un ácido α -aminoborónico en el extremo ácido, o C-terminal, de la secuencia peptídico. En general, los compuestos de ácido borónico peptídico son de la forma:

20



en donde R^1 , R^2 , y R^3 son independientemente porciones seleccionadas que pueden ser iguales o diferentes unas de otras y n es de 1-8, preferiblemente

1-4. Compuestos que tienen un residuo de ácido aspártico o ácido glutámico con un ácido borónico como cadena lateral también son contemplados.

Preferiblemente R^1 , R^2 , y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, alcoxi, arilo, ariloxi, aralquilo, aralcoxi, cicloalquilo o
5 heterociclo; o cualquiera de R^1 , R^2 y R^3 puede formar un anillo heterocíclico con un átomo de nitrógeno adyacente en la estructura peptídico. Alquilo, incluyendo el componente alquilo de alcoxi, aralquilo y aralcoxi, preferiblemente tiene 1 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente 1 a 6 átomos de carbono y puede ser lineal o ramificado. Arilo, incluyendo el
10 componente arilo de ariloxi, aralquilo y aralcoxi, preferiblemente es mononuclear y binuclear (es decir dos anillos fusionados), más preferiblemente mononuclear como bencilo, benciloxi o fenilo. Arilo también incluye heteroarilo, es decir un anillo aromático que tiene uno o más átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre en el anillo, como furilo, pirrolo, piridina,
15 pirazina, o indolo. Cicloalquilo preferiblemente es 3 a 6 átomos de carbono. Heterociclo se refiere a un anillo no aromático que tiene uno o más átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre en el anillo, preferiblemente un anillo de 5 a 7 miembros que tiene incluidos 3 a 6 átomos de carbono. Tales heterociclos incluyen, por ejemplo, pirrolidina, piperidina, piperazina y morfolina.
20 Cualquiera de cicloalquilo o heterociclo puede combinarse con alquilo, por ejemplo ciclohexilmetilo.

Cualquiera de los grupos anteriores (excluyendo hidrógeno) puede sustituirse con uno o más sustituyentes seleccionados de halógeno,

— preferiblemente fluoro o cloro; hidroxí; alquilo inferior; alcoxi inferior como metoxi o etoxi, ceto; aldehído; ácido carboxílico, éster, amida, carbonato o carbamato; ácido sulfónico o éster; ciano; amino primario, secundario o terciario; nitro, amidino; y tio o alquiltio. Preferiblemente el grupo incluye
5 cuando más dos de tales sustituyentes.

Varios compuestos de ácido borónico peptídico se muestran en las figuras 1A a 1Q. Ejemplos específicos de R^1 , R^2 y R^3 mostrados en las figuras 1A a 1Q incluyen n-butilo, isobutilo y neopentil(alquilo); fenil o piracil(arilo); 4-((t-butoxicarbonil)amino)butilo, 3-(nitroamidino)propilo, y (1-
10 ciclopentil-9-ciano)nonil (alquilo sustituido), naftilmetilo y bencil (aralquilo); benciloxi(aralcoxi); y pirrolidina (R^2 forma un anillo heterocíclico con un átomo de nitrógeno adyacente).

En general, el compuesto de ácido borónico peptídico puede ser un monopeptido, dipéptido, tripéptido o un compuesto peptídico de mayor
15 orden. Otros compuestos de ácido borónico peptídico de ejemplo se describen en la patente de los Estados Unidos 6,083,903, 6,297,217, 6,617,317, que se incorporan mediante referencia en la presente.

Muchos compuestos de ácido borónico peptídico no tienen un grupo amino fácilmente ionizable o son muy polares y por ende son difíciles
20 de cargar en un liposoma utilizando procedimientos de carga remota convencional discutidos arriba. Así, un método de carga para compuestos de ácido borónico peptídico se ha diseñado para proporcionar una formulación de liposoma en donde el compuesto de ácido borónico peptídico es atrapado en

el liposoma en forma de un éster de boronato peptídico como se describirá ahora con respecto a la figura 2.

La figura 2 muestra un liposoma 10 teniendo una membrana bicapa lipídica representada por una línea sólida individual 12. Se observará que en liposomas multilamelares la membrana bicapa lipídica está comprendida por bicapas lipídicas múltiples con espacios acuosos que intervienen. El liposoma 10 está suspendido en un medio externo 14 en donde el pH del medio externo es de alrededor de 7.0 o menor, en una modalidad siendo menor que 7.0 y en otra modalidad siendo entre alrededor de 5.5-7.0, más generalmente entre alrededor de 6.0-7.0. El liposoma 10 tiene un compartimiento acuoso interno 16 definido por la membrana bicapa lipídica. Atrapado dentro del compartimiento acuoso interno hay un poliol 18, ejemplos de los cuales se dan a continuación. El pH del compartimiento acuoso interno preferiblemente es mayor que alrededor de 7.0, más preferiblemente entre alrededor de 7.1-9.0, incluso más preferiblemente entre alrededor de 7.5 y alrededor de 8.5.

También atrapado en el liposoma está un compuesto de ácido borónico peptídico bortezomib. Podrá apreciarse que bortezomib cuando se atrapa en el liposoma tiene la forma de un compuesto de éster de boronato es una forma modificada del bortezomib, ya que una o más porciones de hidroxilo en el bortezomib han reaccionado covalentemente con el poliol para formar un enlace de éster. En la presente la referencia a bortezomib incluye bortezomib en una forma nativa y en forma modificada después de la reacción

con un poliol. Se apreciará también que el poliol después de la reacción con bortezomib está en forma modificada, ya que se han removido uno o más átomos de hidrógeno de uno o más grupos hidroxilo en el poliol. La referencia en la presente a un poliol como un compuesto que tiene más de un grupo

5 hidroxilo (-OH) pretende significar el poliol antes de la reacción con el compuesto de ácido borónico peptídico, ya que después de la reacción el poliol se puede quedar sin un grupo hidroxilo restante, con un grupo hidroxilo restante, o con más de un grupo hidroxilo. Un poliol modificado pretender significar un poliol que tiene por lo menos un átomo de hidrógeno removido

10 del grupo hidroxilo. Siguiendo con la referencia a la figura 2, el compuesto bortezomib se muestra en el medio acuoso externo, antes de pasar a través de la membrana de bicapa lipídica. En el medio acuoso externo, el compuesto no está cargado, debido al medio ligeramente ácido. En este estado sin cambio, el compuesto es libremente permeable a través de la bicapa lipídica.

15 La formación de un éster de boronato cambia el equilibrio para provocar que un compuesto adicional permee desde el medio externo a través de la bicapa lipídica, dando como resultado la acumulación del compuesto en el liposoma. En otra modalidad, el pH inferior en el medio de suspensión externo y el pH en cierto modo más alto en el interior liposomal, combinado con el poliol adentro

20 del liposoma, induce la acumulación del fármaco dentro del compartimiento interno acuoso de liposoma. Una vez dentro del liposoma, el compuesto reacciona con el poliol para formar un éster de boronato. El éster de boronato es esencialmente incapaz de cruzar la bicapa del liposoma, de manera que el

compuesto de fármaco, en forma de un éster de boronato, se acumula dentro del liposoma.

La concentración del poliol dentro de los liposomas de preferencia es tal que la concentración de los grupos cargados, por ejemplo, grupos hidroxilo, es mayor que la concentración del compuesto de ácido borónico. En una composición que tiene una concentración final del fármaco de 100 mM, por ejemplo, la concentración interna del compuesto de los grupos cargados con polímero, normalmente será por lo menos así de grande. El poliol está presente en una concentración alta-interna/baja-externa; es decir, hay un gradiente de concentración del poliol a través de la membrana de bicapa lipídica de liposoma. Si el poliol está presente en cantidades significativas en la fase en bruto externa, el poliol reacciona con el compuesto de ácido borónico peptídico en un medio externo, haciendo más lenta la acumulación del compuesto dentro del liposoma. De preferencia, de esta manera los liposomas se preparan, como se describió antes, de tal manera que la composición esté sustancialmente libre de poliol en la fase en bruto (afuera de la fase acuosa).

Como se dijo antes, un poliol como se utiliza en la presente, significa un compuesto que tiene más de un grupo hidroxilo. Están contemplados los compuestos monoméricos y poliméricos que contienen grupos hidroxilo alcohólicos. El poliol puede ser un compuesto alifático, un diol compuesto de anillo, un polifenol, o similares, y a continuación se proporcionan ejemplo.

Ejemplos no limitantes de polioles monoméricos incluyen azúcares, glicerol, glicoles, carbohidratos, amino-azúcares (especialmente aminio-sorbitol). Azúcar-alcoholes, desoxisorbitol, ácido glucónico, ácido tartárico, ácido gálico, etc. Se conoce que todos los azúcares simples, tales como maltosa, glucosa, ribosa, fructuosa, y sorbitol, forman ésteres de boronato, con una creciente propensión para la formación del éster en el orden enlistados (Myohanen, T.A., *Biochem. J.*, 197(3):883-888 (1981)). 1-amino-2-deoxisorbitol como una tendencia todavía más alta para la formación de éster de boronato (Shiino, D. *et al.*, *Biomaterials*, 15: 121-128 (1994)). También se contempla que las diferencias de reactividad entre los azúcares enlistados se puedan utilizar para preparar formulaciones de liposoma con un gradiente de resistencias de atrapamiento, logrando de esta manera la fina calibración de las características de liberación del fármaco.

Ejemplos no limitantes de polioles poliméricos incluyen copolímeros de alcohol vinílico y vinilamina, poliéteres, poliglicóles, poliésteres, polialcoholes, y similares. Ejemplos específicos de polioles poliméricos incluyen, pero no están limitados a oligosacáridos, polisacáridos, poliglicerol (Hebel, A. *et al.*, *J. Org. Chem.*, 67(26):9452-9455 (2002)), poli(vinil alcohol)(Gitano, S. *et al.*, *Makromol. Chem. Rapad Común.*, 12:227-233 (1991)). Los polímeros de polioli son un agente preferido de atrapamiento debido a que con la unión de una o varias moléculas de fármaco estos no tienden a cambiar sus propiedades, como su solubilidad y su capacidad de cruzar la membrana lipídica de bicapa.

Los polifenoles como el poliol también son adecuados, particularmente aquellos con un ortodiol, como catecol (catequinas, flavenoles). En una modalidad, se contemplan los polifenoles de té verde, solos o mezclados en cualquier combinación, para usarlos como el poliol. Se encuentran por lo menos seis catequinas en el té verde, con (-)-epigallocatechina 3-gallato en abundancia. También son adecuados los polifenoles del vino rojo.

Un compuesto de poliol preferido es uno que tiene una pluralidad de grupos cis 1,2- y/o 1,3-diol.

Para identificar un poliol adecuado, un poliol seleccionado, por ejemplo, uno que tiene una funcionalidad de cis 1,2- y/o 1,3-diol, se solubiliza en un solvente adecuado, normalmente en agua, a una concentración deseada y a un pH normalmente de aproximadamente 6 a 8. El compuesto de ácido borónico seleccionado se añade al poliol solubilizado, a una concentración que corresponde a la concentración deseada atrapado en liposoma. Después de un tiempo de incubación adecuado, la mezcla se inspecciona para la formación de un éster de boronato, por ejemplo mediante una inspección visual para un precipitado o por una técnica analítica. En una modalidad, se contempla la formación de un precipitado de un éster de boronato, exclusivo de un precipitado de una sal ácida débil dentro de los liposomas. Este método para identificar un poliol adecuado es particularmente útil para la identificación de polioles poliméricos.

Los liposomas en la composición están compuestos principalmente de lípidos formadores de vesícula. Dicho lípido formador de vesícula es un lípido que puede formar espontáneamente vesículas bicapa en agua. Como se ejemplifica por los fosfolípidos, con su porción hidrófoba en contacto con el interior, la región hidrófoba de la membrana de bicapa, y su porción del grupo principal orientada hacia la superficie polar exterior de la membrana. Los lípidos que son capaces de una incorporación estable dentro de las bicapas lipídicas, tales como el colesterol y los distintos análogos, también se pueden utilizar en los liposomas. De preferencia los lípidos formadores de vesícula son lípidos que tienen dos cadenas de hidrocarburo, normalmente cadenas acilo, y un grupo principal, ya sea polar o no polar. Existe una variedad de lípidos formadores de vesículas sintéticos y lípidos formadores de vesícula naturales, incluyendo los fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, y esfingomielina, en donde dos cadenas de hidrocarburo normalmente son de aproximadamente 14 a 22 átomos de carbono de longitud, y tienen grados variables de insaturación. Los lípidos y los fosfolípidos antes descritos cuyas cadenas alifáticas tienen grados variables de saturación se pueden obtener comercialmente o se pueden preparar de acuerdo con métodos publicados. Otros lípidos adecuados incluyen glicolípidos, cerebrosidas y esteroides, tales como colesterol.

El lípido formador de vesícula se puede seleccionar para lograr un grado específico de fluidez o de rigidez, para controlar la estabilidad de

liposoma en el suero, y/o para controlar la relación de liberación del agente atrapado en el liposoma. Los liposomas que tienen una bicapa lipídica más rígida, o una bicapa cristalina líquida, se logran con la incorporación de un lípido relativamente rígido, por ejemplo, un lípido que tiene una temperatura de transición de fase relativamente alta, por ejemplo de hasta 60°C. Los lípidos rígidos, es decir, saturados, contribuyen a una mayor rigidez de membrana en la bicapa lipídica. Otros componentes lipídicos, tales como colesterol, también son conocidos por contribuir a la rigidez de membrana en las estructuras de bicapa lipídica. Por otro lado, la fluidez de lípido se logra con la incorporación de un lípido relativamente fluido, normalmente un lípido que tiene una fase lipídica con una temperatura de transición de fase de líquido a líquido-cristalino, por ejemplo a temperatura ambiente o inferior.

Los liposomas pueden incluir opcionalmente un lípido formador de vesícula covalentemente enlazado con un polímero hidrófilo. Como se describió antes, por ejemplo en la patente de E.U.A. No.5,013,556, que incluye un lípido derivado de polímero en la composición de liposoma que forma un revestimiento de superficie de cadenas de polímero hidrófilo alrededor de liposoma. El revestimiento de superficie de cadenas de polímero hidrófilo es efectivo para aumentar el tiempo de vida de circulación en la sangre *in vivo* de los liposomas en comparación con los liposomas que carecen de dicho revestimiento. Los lípidos derivados de polímero que comprenden metoxi(polietilenglicol) (mPEG) y una fosfatidiletanolamina (ej. dimiristoil fosfatidiletanolamina, dipalmitoil fosfatidiletanolamina, distearoil

fosfatidiletanolamina (DSPE). O dioleoil fosfatidiletanolamina) se pueden obtener con Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL) en varios pesos moleculares de mPEG (350, 550, 750, 1000, 2000, 3000, 5000 Daltons). Los lipopolímeros de mPEG-ceramida también se pueden comprar con Avanti Polar Lipids, Inc. La preparación de conjugados de lípido-polímero también se describe en la literatura, ver las patentes de E.U.A. Nos. 5,631,0018, 6,586,001 y 5,013,556; Zalipsky, S. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 8:111 (1997); Zalipski, S. *et al.*, *Meth. Enzimol.*, 387:50 (2004). Estos lipopolímeros se pueden preparar como materiales homogéneos bien definidos de alta pureza, con una dispersión de peso molecular mínima (Zalipsky, S. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 8:111 (1997); Wong, J. *et al.*, *Science*, 275:820 (1997)). El lipopolímero también puede ser un lipopolímero "neutral" como un conjugado de polímero-diestearoil, como se describe en la patente de E.U.A. No. 6,586,001 que se incorpora en la presente como referencia.

15 Cuando se incluye un conjugado de lípido-polímero en los liposomas, normalmente se incorpora entre uno y 20 por ciento molar del conjugado de lípido-polímero en la mezcla total de lípido (ver, por ejemplo, la patente de E.U.A. No. 5,013,556).

Los liposomas pueden incluir adicionalmente un lipopolímero modificado para incluir un ligando, formando un conjugado de lípido-polímero-ligando al cual también se hace referencia en la presente como "conjugado de lipopolímero-ligando". El ligando puede ser una molécula terapéutica, como un fármaco o una molécula biológica que tiene actividad *in vivo*, una molécula de

diagnóstico, como un agente de contraste o una molécula biológica, o una molécula objetivo que tiene afinidad de unión para un miembro de unión, de preferencia un miembro de unión en la superficie de una célula. Un ligando preferido tiene una afinidad de unión para la superficie de una células y facilita la entrada de liposoma en el citoplasma de una célula a través de la internalización. Un ligando presente en los liposomas que incluye dicho lipopolímero está orientado hacia afuera desde la superficie de liposoma, y por lo tanto está disponible para la interacción con su receptor cognado.

Se conocen métodos para unir ligandos a lipopolímeros, en donde el polímero puede ser funcionalizado para una reacción subsecuente con un ligando seleccionado. (E.U. Patent No. 6,180,134; Zalipsky, S. *et al.*, *FEBS Lett.*, 353:71 (1994); Zalipsky, S. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 4:296 (1993); Zalipsky, S. *et al.*, *J. Control. Rel.*, 39:153 (1996); Zalipsky *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 8(2):111 (1997); Zalipsky, S. *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 387:50 (2004)). Los conjugados de polímero-lípido funcionalizados también se pueden obtener comercialmente, como conjugados de PEG-lípido de extremo funcionalizado (Avanti Polar Lipids, Inc.). El enlace entre el ligando y el polímero puede ser un enlace covalente estable o un enlace liberable que es dividido como respuesta a un estímulo, como un cambio en el pH o la presencia de un agente reductor.

El ligando puede ser una molécula que tiene afinidad de unión por un receptor celular o por un patógeno que circula en la sangre. El ligando también puede ser una molécula terapéutica o de diagnóstico, en particular

moléculas que cuando se administran en forma libre tienen un tiempo de vida corto de circulación en la sangre. En una modalidad, el ligando es un ligando biológico, y de preferencia es un ligando que tiene afinidad de unión por un receptor celular. Los ligandos biológicos ejemplares son moléculas que tienen

5 afinidad de unión a receptores para CD4, folato, insulina, LDL, vitaminas, transferina, asialoglicoproteína, selectinas, tales como las selectinas E, L y P, Flk-1,2,FGF, EGF, integrinas, en particular las integrinas $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, Her2, y otros. Los ligandos preferidos incluyen proteínas y péptidos, incluyendo anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, tales como F(ab')₂, F(ab)₂,

10 Fab', Fab, Fv (fragmentos que consisten en regiones variables de cadenas pesadas y ligeras), y scFv moléculas de polipéptido de cadena sencilla recombinantes en las cuales las regiones variables ligeras y pesadas están conectadas por un enlazador de polipéptido), y similares. El ligando también puede ser una pequeña molécula peptidomimética. Podrá apreciarse que un

15 receptor de superficie celular, o un fragmento del mismo, puede servir como el ligando. Otros ligandos objetivo ejemplares incluyen, pero no están limitados a moléculas de vitamina (por ejemplo, biotina, folato, cianocobalamina), oligopéptidos, oligosacáridos. Otros ligandos ejemplares se presentan en la patente de E.U.A. Nos. 6,214,388; 6,6316,024; 6,056,973; 6,043,094, que se

20 incorporan en la presente como referencia.

B. Preparación de la formulación de liposoma

El compuesto de bortezomib es acumulado y atrapado dentro de los liposomas mediante la formación de un éster de boronato entre las funcionalidades de hidroxilo en un poliol atrapado en liposoma y bortezomib.

5 En resumen, se dispone un poliol dentro de los liposomas, el bortezomib se difunde a través de la membrana de bicapa lipídica del liposoma, el compuesto reacciona con el poliol atrapado para formar un compuesto de éster de boronato, atrapando de esta manera el bortezomib (en forma modificada) dentro de liposoma.

10 En una modalidad, el procedimiento es accionado por el pH, en donde un pH inferior (e.g. pH 6-7) afuera del liposoma y un pH de alguna manera más alto (pH 7.5-8.5) en el interior de liposoma, combinado con la presencia de un poliol, induce la acumulación y la carga del compuesto. En esta modalidad, la composición se prepara formulando liposomas que tienen
15 un gradiente alto-interior/bajo-exterior de un poliol. Una solución acuosa de poliol, seleccionado como se describió antes, se prepara a una concentración deseada, determinada como se describió antes. Es preferible que la solución de poliol tenga una viscosidad adecuada para la hidratación del lípido, como se describe a continuación. El pH de la solución de poliol acuosa de
20 preferencia es de más de aproximadamente 7.0.

La solución acuosa de poliol se utiliza para la hidratación de una película lipídica seca, preparada a partir de la mezcla deseada de lípidos formadores de vesícula, lípidos que no son formadores de vesícula (como

colesterol, DOPE, etc.), lipopolímero, como mPEG-DSPE, y cualquier otro componente deseado de bicapa lipídica. Una película lipídica seca se prepara disolviendo los lípidos seleccionados en un solvente adecuado, normalmente un solvente orgánico volátil, y evaporando el solvente para dejar una película
5 seca. La película lipídica se hidrata con una solución que contiene el poliol, ajustada con un pH de más de aproximadamente 7.0, para formar liposomas.

El ejemplo 1 describe la preparación de liposomas compuestos de los lípidos fosfatidilcolina del huevo (PC), colesterol (CHOL) y diestearoilfosfatidil etanolamina derivada de polietilenglicol (PEG-DSPE). Los
10 lípidos, a una relación molar de 10:5:1 PC:CHOL:PEG-DSPE se disuelven en cloroformo y el solvente es evaporado para formar una película lipídica. La película lipídica se hidrata con una solución acuosa de alcohol polivinílico, pH 7.5, para formar liposomas que tienen el poliol atrapado adentro.

Después de la formación de liposoma, los liposomas pueden ser
15 configurados para obtener una población de liposomas que tengan una escala de tamaño sustancialmente homogénea, normalmente de entre aproximadamente 0.01 a 0.5 micras, más preferiblemente de entre 0.03-0.40 micras. Un método de configuración efectivo para REVes y MLVs comprende extruir una suspensión acuosa de los liposomas a través de una serie de
20 membranas de policarbonato que tienen un tamaño de poro uniforme seleccionado en la escala de 0.03 a 0.2 micras, normalmente de 0.05, 0.08, 0.1, ó 0.2 micras. El tamaño de poro de la membrana corresponde más o menos a los tamaños más grandes de los liposomas producidos por extrusión

a través de esta membrana, particularmente en donde la preparación es extruida dos o más veces a través de la misma membrana. Los métodos de homogeneización también son útiles para liposomas de tamaño bajo a tamaños de 100 nm o menos (Martin, F. J., in SPECIALIZED DRUG
5 DELIVERY SYSTEMS – MANUFACTURING AND PRODUCTION TECHNOLOGY, P. Tyle, Ed., Marcel Dekker, New Cork, pp. 267-316 (1990)9.

Después de la configuración, se remueve el poliol de la fase en bruto no encapsulado mediante una técnica adecuada, como diafiltración diálisis, centrifugado, cromatografía por exclusión de tamaño, o intercambio
10 iónico, para lograr una suspensión de liposomas que tenga una alta concentración de poliol dentro, y de preferencia poco o ningún poliol a fuera. También después de la formación de liposoma, la fase externa de los liposomas se ajusta, mediante titulación, diálisis o similares, a un pH de menos de aproximadamente 7.0.

15 El bortezomib se agrega después a la dispersión de liposoma para la carga activa dentro de los liposomas. La cantidad del bortezomib que se añade se puede determinar a partir de la cantidad total de fármaco que será encapsulado, asumiendo 100% de eficiencia de encapsulación, es decir, en donde todo el compuesto añadido eventualmente se carga dentro de los
20 liposomas en la forma de éster de boronato.

La mezcla del compuesto y de dispersión de liposoma se incuba bajo condiciones que permiten la captación del bortezomib del compuesto por los liposomas a una concentración de compuesto que es varias veces la del

compuesto en el medio en bruto, como lo evidencia la formación de precipitado en los liposomas. Esto último se puede confirmar, por ejemplo, mediante una microscopia de electrones estándar o por técnicas de difracción de rayos x. Normalmente, la incubación se lleva a cabo a una temperatura elevada, y de preferencia a, o a más de la temperatura principal de transición de fase T_m de los lípidos de liposoma. Por ejemplo, para lípidos de transición de fase alta que tiene una T_m de 55°C , la incubación se puede llevar a cabo a entre aproximadamente $55-70^{\circ}\text{C}$, más preferiblemente entre aproximadamente $60-70^{\circ}\text{C}$. El tiempo de incubación puede variar de entre una hora o menos a hasta 12 horas o más, dependiendo de la temperatura de incubación.

Al final de este paso de incubación, la suspensión puede ser tratada adicionalmente para remover el compuesto libre (no encapsulado), por ejemplo, utilizando cualquiera de los métodos que se mencionaron antes para remover el polímero libre de la dispersión inicial de liposoma que contienen el poliol atrapado.

El ejemplo 2 describe un método para preparar liposomas que comprenden un compuesto de éster de boronato preparado a partir del bortezomib y un poliol, en donde el poliol es sorbitol. En este ejemplo, se prepara una película lipídica delgada de PC del huevo y colesterol. La película lipídica se hidrata con una solución de sorbitol para formar liposomas que tienen sorbitol atrapado en el compartimiento acuoso interno. El sorbitol no atrapado se remueve mediante una técnica adecuada, como diálisis,

centrifugado, cromatografía por exclusión de tamaño, o intercambio iónico, para lograr una suspensión de liposomas que tenga una concentración alta de poliol adentro, y de preferencia poco o ningún poliol afuera. Después, se agrega el compuesto de bortezomib al medio externo. El compuesto que se encuentra en su estado no ionizado es libremente permeable a través de las bicapas lipídicas liposomales. Una vez adentro de los liposomas, el compuesto reacciona con el poliol atrapado para formar un éster de boronato, cambiando el equilibrio para el paso de más fármaco a través de la bicapa lipídica. De esta forma el compuesto se acumula en los liposomas y queda atrapado establemente en los mismos.

Las composiciones de liposoma que incluyen un conjugado objetivo de lípido-polímero-ligando se pueden preparar por varios enfoques. Un enfoque comprende la preparación de vesículas lipídicas que incluyen un derivado de lípido-polímero funcionarizado en el extremo; es decir un conjugado de lípido-polímero en donde el extremo del polímero libre es reactivo o "activado" (ver, por ejemplo, la patente de E.U.A. Nos. 6,326,353 y 6,132,763). Dicho conjugado activado se incluye en la composición de liposoma y los extremos del polímero activado reaccionan con un ligando objetivo después de la formación de liposoma. En otro enfoque, el conjugado de lípido-polímero-ligando se incluye en la composición de lípido en el momento de la formación del liposoma (ver, por ejemplo, la patente de E.U.A. Nos. 6,224,903; 5,620,689). En otro enfoque, una solución micelar del conjugado de lípido-polímero-ligando se incuba con una suspensión de

liposomas y el ligando de lípido-polímero-ligando se inserta dentro de los liposomas preformados (ver, por ejemplo la patente de E.U.A. Nos. 6,058,973; 6,316,024).

5 **III. Métodos de uso**

En una modalidad se utiliza la formulación de liposoma que tiene bortezomib atrapado en forma de un éster de boronato, para el tratamiento de los pacientes con tumor. En las modalidades en las que el compuesto de ácido borónico peptídico incluye un isótopo de boro, la formulación de liposoma se puede utilizar para la terapia de captura de neutrones en boro. Ahora se explicarán estos usos ejemplares.

A. Tratamiento de tumor

Los compuestos de ácido borónico se encuentran en la clase de fármacos a los cuales se hace referencia como inhibidores de proteasoma. Los inhibidores de proteasoma inducen la apoptosis de las células por su capacidad de inhibir la actividad de proteasoma celular. Más específicamente, en las células eucarióticas, la ruta de ubiquitin-proteasoma es la ruta central para la degradación de proteínas, de las proteínas intracelulares. Las proteínas inicialmente son dirigidas para la proteólisis mediante la unión de una cadena de poliubiquitina, y después se degradan rápidamente a pequeños péptidos por la proteasoma, y la ubiquitina es liberada y reciclada. Esta ruta proteolítica coordinada depende de la actividad sinérgica del

sistema de conjugación de ubiquitina y de la 25S proteasoma. La 26S proteasoma es un gran complejo de múltiples subunidades (1500-2000 kDa) que están presentes en el núcleo y el citoplasma de los eucariotes. El núcleo catalítico de este complejo, al cual se hace referencia como la 20S proteasoma, es una estructura cilíndrica que consiste en cuatro anillos heptaméricos que contienen sub-unidades α - y β -. La proteasoma es una treonina proteasa, la treonina N-terminal de la subunidad β - que produce el nucleófilo que ataca al grupo carbonilo del péptido unido en proteínas objetivo. Por lo menos tres actividades proteolíticas distintas están asociadas con el proteasoma: quimotriptica, triptica y peptidilglutamilo. La capacidad de reconocer y unirse a sustratos poliubiquitinados es conferida por subunidades 19S (PA700), las cuales se unen a cada extremo del proteasoma 20S. Estas subunidades accesorias desdoblan sustratos y los alimentan en el complejo catalítico 20S, al tiempo de eliminar las moléculas de ubiquitina unidas. Tanto el ensamble del proteasoma 26S como la degradación de sustratos proteicos son dependientes de ATP (Almond, Lukemia, 16:433 (2002)).

El sistema de ubiquitina-proteasoma regula muchos procesos celulares a través de la degradación coordinada y temporal de proteínas. Al controlar los niveles de muchas proteínas celulares clave, el proteasoma actúa como un regulador de crecimiento celular y apoptosis y la interrupción de su actividad tiene efectos profundos en el ciclo celular. Por ejemplo, la apoptosis defectuosa está implicada en la patogénesis de varias

enfermedades incluyendo ciertos cánceres, tales como leucemia linfocítica crónica de células B, en donde existe una acumulación de células tumorales inactivas.

Los inhibidores de proteasomas como una clase de compuestos, en general actúan al inhibir la degradación proteica mediante el proteasoma. La clase incluye aldehídos peptídicos, vinilsulfonas peptídicas, las cuales actúan al unirse a y directamente inhibir sitios activos dentro del núcleo 20S del proteasoma. Los aldehídos peptídicos y vinilsulfonas peptídicas, sin embargo, se unen a la partícula del núcleo 20S de una manera irreversible, para que la actividad proteolítica no pueda ser restablecida después de su eliminación. En contraste, los compuestos peptídicos de ácido borónico confieren inhibición estable del proteasoma, pero se disocian lentamente del proteasoma. Los compuestos peptídicos de ácido borónico son más potentes que sus análogos de aldehído peptídico, y actúan de manera más específica ya que la débil interacción entre boro y azufre significa que los boronatos peptídicos no inhiben las tiol proteasas (Richardson, P.G. et al., *Cancer Control.*, 10(5):361 (2003)).

La exposición de una variedad de líneas celulares derivadas de tumor a inhibidores de proteasoma desencadena la apoptosis, probablemente como resultado de efectos en varias rutas, incluyendo proteínas reguladoras del ciclo celular, p53, y factor nuclear kappa B (NF-κB) (Grimm, L. M. y Osborne, B A, *Results Probl. Cell Differ*, 23 209-228 (1999); Orlowski, R Z., *Cell Death Differ*, 6(4) 303-313 (1999)). Muchos de los estudios iniciales que

documentan apoptosis mediada por inhibidor de proteasoma utilizaron células de origen hematopoyético, incluyendo monoblastos (Imajoh-Ohmi, S et. al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217(3):1070-1077 (1995)), células linfocíticas de leucemia y células T (Shinohara, K. et. al., *Biochem. J.*, 317(Pt 2):385-388 (1996)), células de linfoma (Tanimoto, Y. et. al., *J. Biochem. (Tokio)*, 121(3):542-549 (1997)), y células de leucemia promielocíticas (Drexler, H. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(3):855-860 (1997)). La primera demostración de actividad antitumoral *in vivo* de un inhibidor de proteasoma utilizó un modelo de xenoinjerto de linfoma de humano (Orlowski, R. Z. et. al., *Cancer Res.*, 58(19):4342-4348 (1998)) Además, se informó que los inhibidores de proteasoma inducen apoptosis preferencial de linfoma derivado de paciente (Orlowski, R. et. al. *Cancer Res.*, 58:(19):4342 (1998)) y células de leucemia (Masdehors, P. et. al., *Br J Haematol* 105(3):752-757 (1999)) y que inhiben preferencialmente la proliferación de células de mieloma múltiple (Hideshima, T. et. al., *Cancer Res.*, 61(7):3071-3076 (2001)) con conservación relativa de células control, no transformadas. De esta manera, los inhibidores de proteasoma son particularmente útiles como agentes terapéuticos en pacientes con malignidades hematológicas refractarias.

En una modalidad, una formulación de liposomas que comprende el compuesto bortezomib atrapado en la forma de un éster de boronato con un poliol se usa para tratamiento de cáncer, y en particular, para el tratamiento de un tumor en un paciente con cáncer.

El mieloma múltiple es una malignidad incurable que se diagnostica cada año a aproximadamente 15,000 personas en los Estados Unidos (Richardson, P.G. et al., *Cancer Control* 10(5): 361 (2003)). Es una malignidad hematológica típicamente caracterizada por la acumulación de células plasmáticas clonales en sitios múltiples en la médula ósea. La mayoría de los pacientes responden a tratamiento inicial con quimioterapia y radiación, sin embargo la mayoría recae eventualmente debido a la proliferación de células tumorales resistentes. En una modalidad, se provee un método para tratar mieloma múltiple, en donde se administra una formulación de liposomas que comprende bortezomib atrapado en la forma de un éster de boronato, a un sujeto que padece de mieloma múltiple.

La formulación de liposomas también es efectiva en tratamiento de cáncer de mama al ayudar a superar algunas de las principales rutas a través de las cuales las células cancerosas resisten la acción de quimioterapia. Por ejemplo, la señalización a través de NF- κ B, un regulador de apoptosis, y la trayectoria de proteína cinasa activada por mitógeno p44/42, pueden ser anti-apoptótica. Debido a que los inhibidores de proteasomas bloquean estas trayectorias, los compuestos son capaces de activar la apoptosis. De esta manera, se provee un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer de mama, al administrar liposomas que comprenden un compuesto peptídico de ácido borónico atrapado en los liposomas en forma de un éster de boronato. Además, debido a que los agentes quimioterapéuticos tales como taxanos y antraciclinas han demostrado activar

una o ambas de estas trayectorias, el uso de un inhibidor de proteasoma en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales actúa para mejorar la actividad antitumoral de fármacos, tales como paclitaxel y doxorubicina. Por lo tanto, en otra modalidad, se provee un método de

5 tratamiento, en donde un agente quimioterapéutico en forma libre o en forma atrapada en liposomas, se administra en combinación con un compuesto peptídico de ácido borónico atrapado en liposomas (atrapado en los liposomas en forma modificada).

Las dosis y un régimen de dosificación para la formulación de

10 liposomas dependerán del cáncer que es tratado, la etapa del cáncer, el tamaño y salud del paciente, y otros factores fácilmente evidentes para un proveedor de cuidados médicos de cabecera. Además, los estudios clínicos con el inhibidor de proteosoma bortezomib, Pyz-Phe-boroLeu (PS-341) proveen una amplia guía para dosificaciones y regímenes de dosificación

15 adecuados. Por ejemplo, administrada de manera intravenosa una o dos veces a la semana, la dosis máxima tolerada en pacientes con tumores sólidos fue de 1.3 mg/m² (Orlowski, R.Z. et al., *Breast Cancer Res.*, 5:1-7 (2003)). En otro estudio, bortezomib administrado como un bolo intravenoso en los días 1, 4, 8 y 11 de un ciclo de 3 semanas, sugirió una dosis máxima

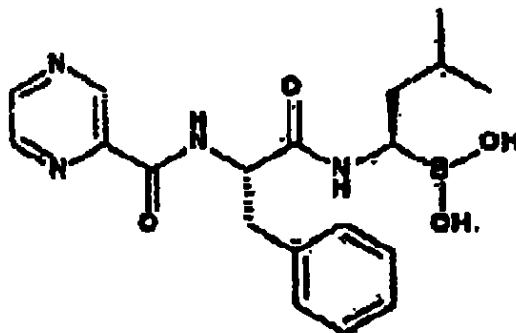
20 tolerada de 1.56 mg/m² (Vorhees, P.M. et al., *Clinical Cancer Res.*, 9:6316 (2003)).

La formulación de liposomas generalmente se administra de manera parenteral, prefiriéndose la administración intravenosa. Se apreciará

que la formulación puede incluir cualquier excipiente farmacéutico necesario o aconsejable para facilitar el suministro.

En los métodos de tratamiento descritos arriba, el inhibidor de proteosoma es bortezomib, Pyz-Phe-boroLeu; ácido 2,5-pirazincarboxílico;

5 PS-341), que tiene la estructura:



10

Bortezomib ha mostrado tener actividad contra una variedad de tejidos cancerosos incluyendo mama, ovárico, de próstata, pulmón y contra varios tumores, como tumores pancreáticos, linformas y melanoma. (Teicher, B. A. et al., Clin. Cancer Res., 5(9):2638-2645 (1999); Adams, J., Semin. Oncol., 28(6):613-619 (2001); Orlowski, R. Z. y Dees, E. C1 Breast Cancer Res., 5(1): 1-7 (2002); Frankel et al., Clin. Cancer Res., 6(9):3719-3728 (2000); Shah, S. A. et al., J. Cell Biochem., 82(1):110-122 (2001)).

15

B. Terapia de captura de neutrones en boro

20

En otro aspecto, se provee un método para administrar un isótopo de boro-10 a un tumor, para terapia de captura de neutrones en boro (^{10}B -NCT). La terapia de captura de neutrones para tratamiento de cáncer se

47

basa en la interacción de isótopo ^{10}B con neutrón térmico, cada uno relativamente inocuo, de acuerdo con la siguiente ecuación:



La reacción da como resultado una radiación ionizante intensa
5 que está confinada a células cancerosas individuales o adyacentes. De esta manera, para un tratamiento exitoso, es aconsejable suministrar a tumores cantidades adecuadas de un isótopo de boro-10. La formulación de liposomas descrita en la presente provee un medio para atrapar un compuesto peptídico de ácido borónico que porta un isótopo ^{10}B en un liposoma. El compuesto
10 peptídico de ácido borónico que porta un isótopo ^{10}B es atrapado en los liposomas en forma modificada, típicamente como un boronato peptídico, como se discutió anteriormente. Los liposomas que incluyen una superficie que reviste cadenas poliméricas hidrófilas se acumulan de preferencia en tumores, debido al prolongado tiempo de vida de circulación sanguínea de
15 tales liposomas (ver patentes de E.U.A. Nos. 5.013,556; 5,213,804). Los liposomas cargados con un compuesto peptídico de ácido borónico que portan un isótopo ^{10}B erradican tumores a través de dos mecanismos independientes: los liposomas actúan como un depósito de fármaco en el tumor y gradualmente liberan el compuesto anti-cáncer en el tumor y los
20 liposomas sirven para acumular cantidades considerables de isótopo de boro-10 en el tumor que ayudan en la eficacia de la terapia de captura de neutrones en boro.

A partir de lo anterior, son evidentes los diversos aspectos y características de la materia en cuestión contemplada. Se describen liposomas que comprenden un compuesto de poliol impermeable, soluble en agua, de bicapa lipídica asociado con un compuesto peptídico de ácido borónico para formar un éster de boronato. Los liposomas se preparan, por ejemplo, al encapsular el poliol en los compartimientos acuosos internos de liposomas, eliminar cualquier poliol no encapsulado del medio externo, añadir el compuesto de ácido borónico permeable de bicapa lipídica, que pasa a través de la membrana de bicapa lipídica para formar un enlace éster reversible con las porciones hidroxilo en el poliol. De esta manera, el compuesto de ácido borónico, el cual normalmente es libremente permeable a través de la bicapa lipídica, es atrapado de manera estable en los liposomas en forma de un compuesto de éster de boronato. La acumulación del compuesto peptídico de ácido borónico en los liposomas ocurre en ausencia de un gradiente iónico, sin embargo, si se desea puede estar presente un gradiente iónico.

IV. Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención aquí descrita y de ninguna manera intentan limitar el alcance de la misma.

EJEMPLO 1**Liposomas cargados con bortezomib**

5 Alcohol polivinílico (peso molecular 2,000; Aldrich Corporation, Milwaukee, WI) se disuelve en agua y se ajusta a pH 7.4 con solución concentrada de alcohol polivinílico. Una mezcla de fosfatidil colina del huevo, colesterol, y polietilenglicol-diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE, PEG peso molecular 2,000 Da, Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL) en una
10 relación molar de 10:5:1 se disuelve en cloroformo, el solvente se evapora al vacío, la película lipídica se incuba con agitación en la solución de alcohol polivinílico, y la dispersión lipídica se extruye bajo presión a través de dos membranas apiladas Nucleopore® (Pleasanton, CA) con tamaño de poro 0.2 µm. El regulador de pH externo se intercambia por NaCl 0.14 M que contiene
15 5 mm de hidroxietilpiperazina de sodio-etanosulfonato (HEPES) a pH 6.5 utilizando cromatografía de gel en Sepharose CL-4B (Pharmacia, Piscataway, NJ); al mismo tiempo, se elimina el alcohol polivinílico no atrapado. A los liposomas así obtenidos, se añade bortezomib. La mezcla se incuba durante la noche a 37°C con agitación, se trata con Dowex® 50Wx4 (Sigma Chemical
20 Co., St. Louis, MO), y se equilibra con solución de NaCl-HEPES para eliminar bortozemib no encapsulado. Los liposomas resultantes son esterilizados mediante filtración a través de un filtro de 0.2 µm.

EJEMPLO 2

Liposomas cargados con bortezomib

Se disuelve sorbitol en agua y el pH se ajusta a 7.4. Una mezcla
5 de fosfatidil colina del huevo, colesterol, y polietilenglicol-
diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE, PEG peso molecular 2,000 Da)
en una relación molar de 10:5:1 se disuelve en cloroformo y el solvente se
evapora bajo vacío. La película lipídica se hidrata con la solución de sorbitol y
se incuba con agitación para formar el liposoma. Los liposomas son extruidos
10 bajo presión a través de dos membranas apiladas Nucleopore® (Pleasanton,
CA) con tamaño de poro 0.2 µm. La solución externa se trata para eliminar
cualquier sorbitol no atrapado. Posteriormente, se añade bortezomib al medio
de suspensión externo y la mezcla se incuba durante la noche a 37°C con
agitación. Luego se elimina cualquier compuesto no encapsulado.

15

EJEMPLO 3

Actividad *in vitro* de bortezomib atrapado en liposoma

Células de mieloma múltiple se cultivan para confluenciar en
20 placas de microtítulo. Las células se incuban con liposomas preparados como
se describió en el ejemplo 1 a diversas concentraciones de compuesto
peptídico de ácido borónico. Después de un período de incubación de 24
horas, se inspeccionan las células para apoptosis. Se encuentra que las

51

células tratadas con la formulación de liposomas tienen una mayor incidencia de apoptosis que las células control.

EJEMPLO 4

5 Actividad *in vivo* de compuesto peptídico de bortezomib

Los liposomas preparados según lo descrito en el ejemplo 1 se administran en una dosis de bolo intravenoso a ratas que tienen un tumor sólido. El tamaño del tumor se mide como una función de tiempo y se
10 encontró que disminuyó para animales tratados con la formulación de liposomas.

Aunque se ha discutido anteriormente un número de aspectos y modalidades ejemplares, los expertos en la técnica reconocerán ciertas modificaciones, permutaciones, adiciones y subcombinaciones de la misma.
15 Por lo tanto, se pretende que la interpretación de las siguientes reivindicaciones anexas y reivindicaciones posteriormente introducidas incluya todas esas modificaciones, permutaciones, adiciones y subcombinaciones tal como encuentran dentro de su verdadero espíritu y alcance.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

5 1.- Una composición que comprende: liposomas formados de un lípido de formación de vesícula, y atrapado en dichos liposomas, un compuesto de éster de boronato preparado a partir de bortezomib y un poliol.

 2.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque dicho poliol es un compuesto que tiene una
10 funcionalidad cis 1,2-diol o una funcionalidad cis 1,3-diol.

 3.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque dicho poliol es alcohol polivinílico.

 4.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque dicho poliol es un monosacárido, un disacárido,
15 un oligosacárido o un polisacárido.

 5.- La composición de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada además porque dicho poliol es un monosacárido seleccionado de maltosa, glucosa, ribosa, fructosa y sorbitol.

 6.- La composición de conformidad con la reivindicación 1,
20 caracterizada además porque dicho poliol es glicerol o poliglicerol.

 7.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque dicho poliol es un aminopoliol.

8.- La composición de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada además porque dicho aminopoliol es un aminosorbitol.

9.- La composición de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada además porque dicho aminopoliol es un copolímero de alcohol
5 vinílico y vinilamina.

10.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque dichos liposomas comprenden adicionalmente un gradiente iónico interior superior/exterior inferior.

11.- La composición de conformidad con la reivindicación 10,
10 caracterizada además porque dicho gradiente iónico es un gradiente iónico de hidrógeno.

12.- La composición de conformidad con la reivindicación 11, caracterizada además porque dicho gradiente iónico de hidrógeno provee un pH interno de entre aproximadamente 7.5-8.5 y un pH externo de entre
15 aproximadamente 6-7.

13.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque dichos liposomas comprenden adicionalmente entre aproximadamente 1-20% molar de una porción hidrófoba derivada con un polímero hidrófilo.

20 14.- La composición de conformidad con la reivindicación 13, caracterizada además porque dicha porción hidrófoba derivada con un polímero hidrófilo es una porción hidrófoba derivada con polietilenglicol.

15.- La composición de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada además porque dicha porción hidrófoba es un lípido.

16.- Una composición para uso en el tratamiento de una malignidad que comprende liposomas que tienen una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

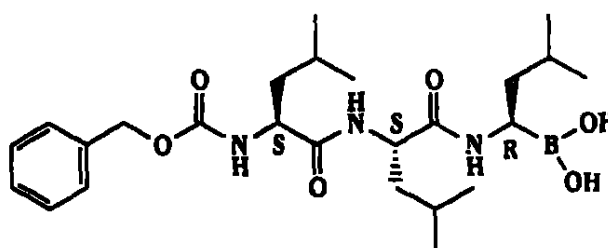
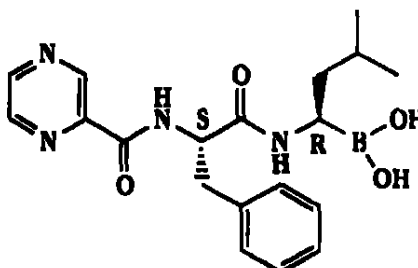
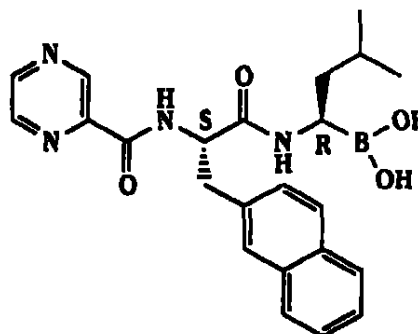
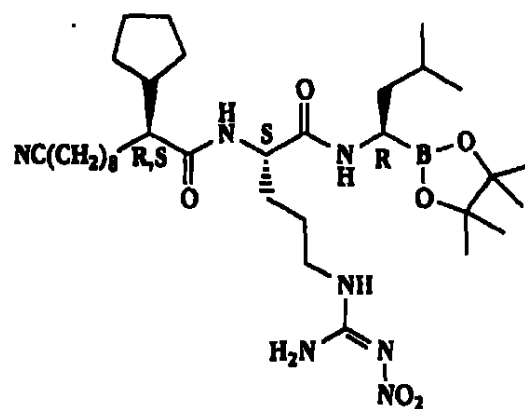
17.- La composición de conformidad con la reivindicación 16, caracterizada además porque dicha malignidad es una malignidad hematológica.

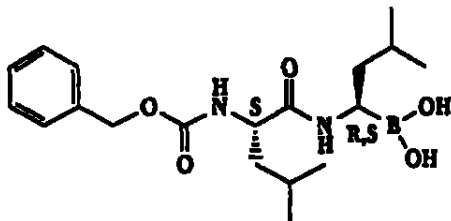
18.- La composición de conformidad con la reivindicación 17, caracterizada además porque dicha composición es administrada a través de inyección.

19.- Una composición para uso en la destrucción selectiva de tejido tumoral en un sujeto portador de tumor que experimenta terapia de radiación, que comprende liposomas que tienen (i) una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y (ii) un isótopo de boro.

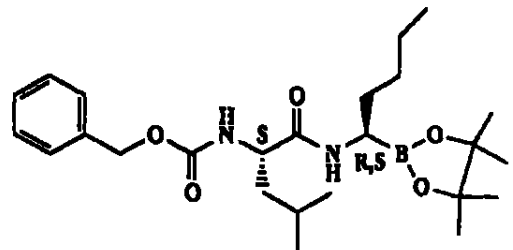
20.- La composición de conformidad con la reivindicación 19, caracterizada además porque dicho isótopo de boro está en bortezomib.

21.- La composición de conformidad con la reivindicación 20, caracterizada además porque dicho isótopo de boro es un ^{10}B .

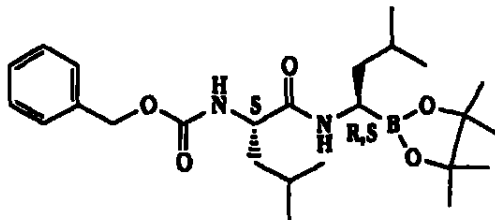
85
55**Fig. 1A****Fig. 1B****Fig. 1C****Fig. 1D**



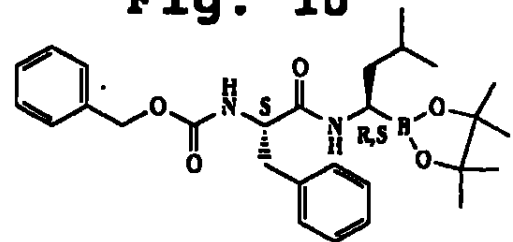
Cbz-Leu-boroLeu (acido libre)

Fig. 1E

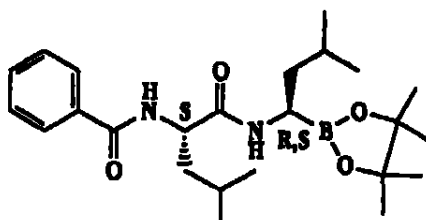
Cbz-Leu-boroNic (éster de pinacol)

Fig. 1J

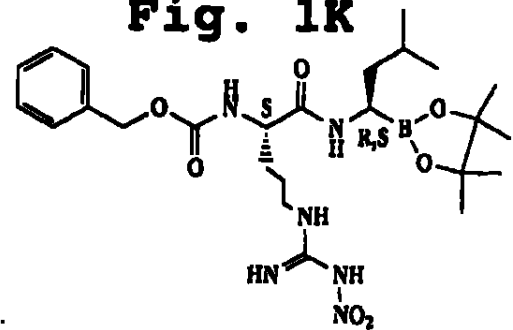
Cbz-Leu-boroLeu (éster de pinacol)

Fig. 1F

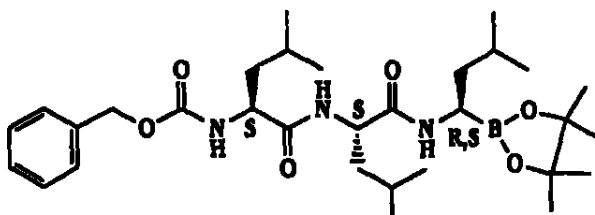
Cbz-Phe-boroLeu (éster de pinacol)

Fig. 1K

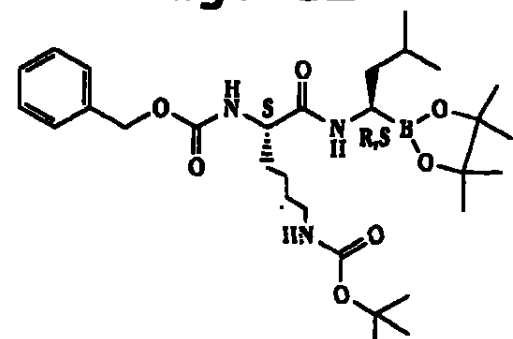
Bz-Leu-boroLeu (éster de pinacol)

Fig. 1G

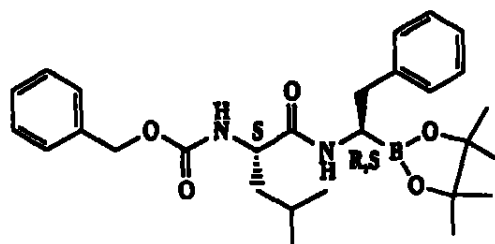
Cbz-nitroArg-boroLeu (éster de pinacol)

Fig. 1L

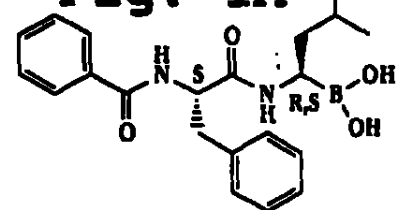
Cbz-Leu-boroLeu (éster de pinacol)

Fig. 1H

Cbz-Lys (boc)-boroLeu (éster de pinacol)

Fig. 1M

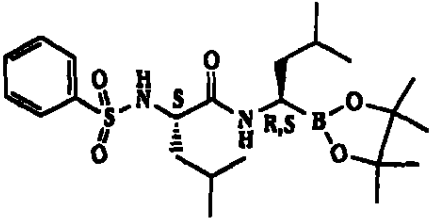
Cbz-Leu-boroPhe (éster de pinacol)

Fig. 1I

Bz-Phe-boroLeu (acido libre)

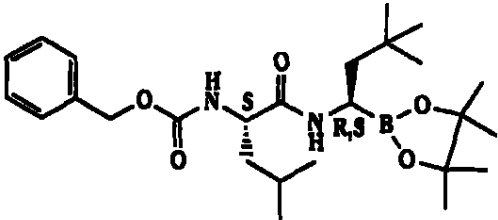
Fig. 1N

SA
5X



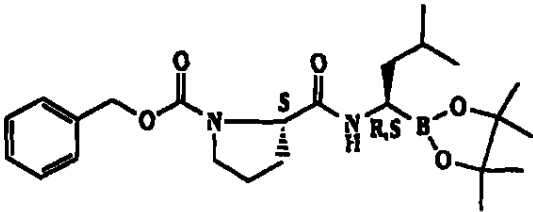
PhSO₂-Leu-boroLeu (éster de pinacol)

Fig. 10



Cbz-Leu-t-butylboroLeu (éster de pinacol)

Fig. 1P



Cbz-Pro-boroLeu (éster de pinacol)

Fig. 1Q

58

98

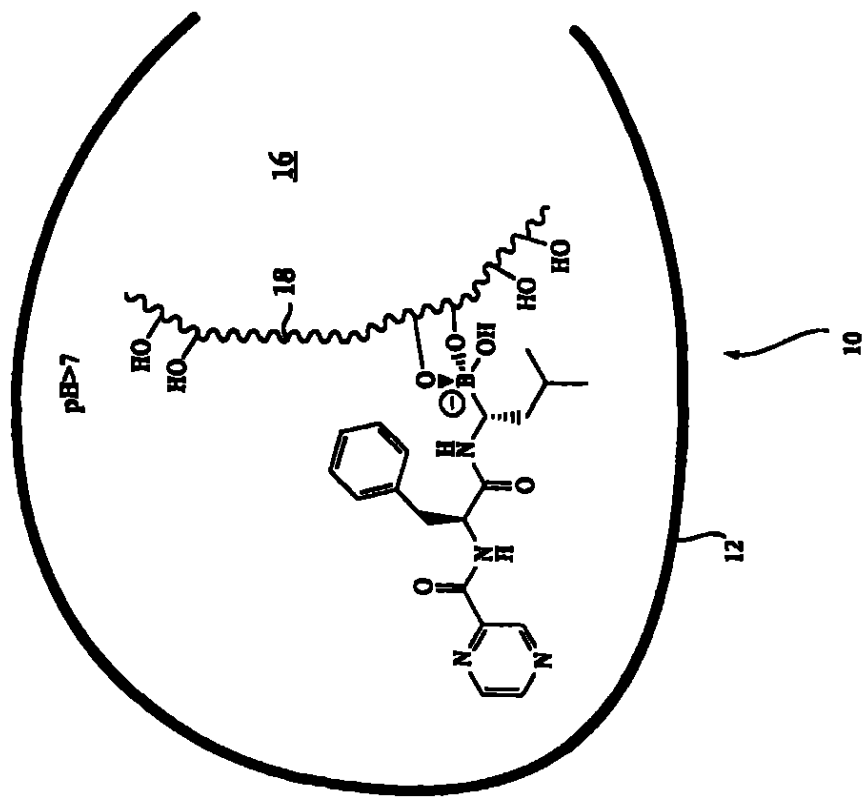
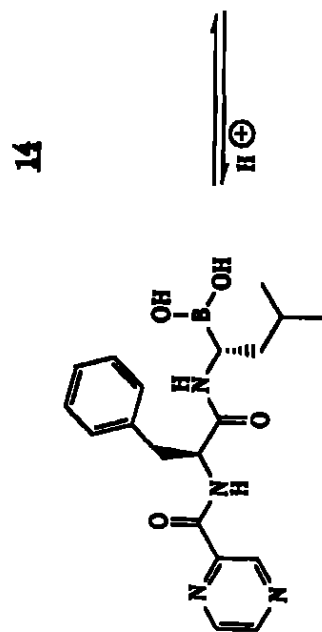


Fig. 2



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 May 2006 (18.05.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/052733 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2005/039972

(22) International Filing Date:

4 November 2005 (04.11.2005)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/625,216 5 November 2004 (05.11.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ALZA CORPORATION [US/US]; 1900 Charleston Road, Mountain View, CA 94043 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ZALIPSKY, Samuel [US/US]; 1202 Truman Street, Redwood City, CA 94061 (US). MARTIN, Francis [US/US]; 160 San Fernando Way, San Francisco, CA 94127 (US).

(74) Agents: MOHR, Judy et al.; Perkins Cole LLP, P.O. Box 2168, Menlo Park, CA 94026 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of national protection available): 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, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, 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) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KB, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: LIPOSOMAL FORMULATION OF BORTEZOMIB (PS-341)

(57) Abstract: A liposome composition comprised of liposomes having the peptide boronic acid proteasome inhibitor compound bortezomib entrapped in the liposomes is described. The boronic acid compound is entrapped in the liposomes in the form of a boronate ester, subsequent to interaction with a liposome-entrapped polyol. In one embodiment, the liposomes have an outer coating of hydrophilic polymer chains and are used to treat a solid tumor in a subject.

59

WO 2006/052733 A1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2005/039972

60

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K9/127 A61K47/26 A61K47/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/043374 A (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC; ANDERSON, KENNETH, C; HIDESHIMA, TE) 27 May 2004 (2004-05-27) page 2, line 9 - line 11 page 19, line 13 - line 26 page 25, line 35 - line 37 page 24, line 17 - line 19	1-21
A	WO 01/35966 A (TOPGENE, INC; MILJKOVIC, DUSAN) 25 May 2001 (2001-05-25) page 4, line 25 - page 5, line 3 example 3 ----- -/-	1-21
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 March 2006		Date of mailing of the international search report 11/04/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5018 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sindel, U

61
6)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 110 491 A (KIRPOTIN ET AL) 29 August 2000 (2000-08-29) cited in the application column 2, line 53 - line 57 example 1 column 5, line 7 - column 6, line 38 abstract	1-21
A	GRAY C W ET AL: "Boronate derivatives of bioactive amines: potential neutral receptors for anionic oligosaccharides" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 44, no. 16, 14 April 2003 (2003-04-14), pages 3309-3312, XP004417103 ISSN: 0040-4039 figure 1 page 3309, column 1, paragraph 1	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/039972

62

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 16-21 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATI NAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/039972

63

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004043374 A	27-05-2004	AU 2003291356 A1 CA 2504933 A1 EP 1565193 A2	03-06-2004 27-05-2004 24-08-2005
WO 0135966 A	25-05-2001	AU 1658401 A EP 1233772 A1 JP 2003514023 T	30-05-2001 28-08-2002 15-04-2003
US 6110491 A	29-08-2000	NONE	

Retina folios 64 y 65 "Togethos"



No. 07-045772- -00000-0000

Fecha: 2007-05-08 18:54:44 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la Invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha 08 MAYO 2007

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

65

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
ESCOBAR URIBE JIMENA
Apoderado(a) y/o Representante de
ALZA CORPORATION

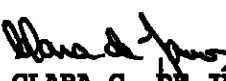
REFERENCIA	Radicación No.	7 45772
	Solicitud internacional	PCT/US2005/039972
	Fecha inicio fase nacional	05/06/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	8500

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. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

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.


CLARA C. DE JAIMES
Jefe de la división de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 13 JUL 2007
adpall