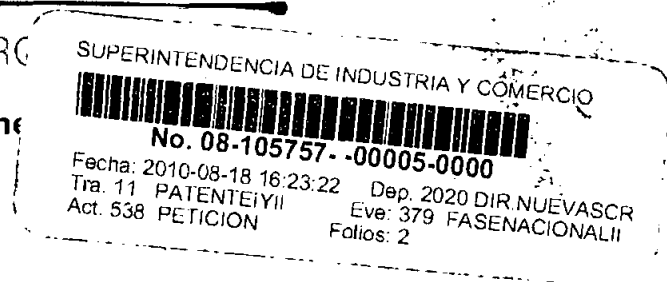


GÓMEZ-PINZÓN ZULETA

ASEMARC

Señores
Superintendencia de Industria y Comercio
Dirección de Nuevas Creaciones
E. S. D.



Ref.: Asunto: No. de Radicación: **08-105757**
Trámite: **PCT Patente de Invención**
Título: **TRATAMIENTO PARA EL CANCER.**
Solicitante: **BOULIKAS PARTHENIOS**
Gaceta: **613**

SOLICITUD DE EXAMEN DE PATENTABILIDAD

MAURICIO JARAMILLO C, mayor de edad, identificado como aparece al pie de mi firma, obrando en mi calidad de apoderado del señor **BOULIKAS PARTHENIOS**, conforme a lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486 del 2000, solicito respetuosamente a ese despacho proceda a realizar el examen de patentabilidad de la solicitud de la referencia.

A tal fin, respetuosamente me permito anexar el correspondiente recibo de pago, por concepto del examen de patentabilidad.

NOTIFICACIONES

Informo que mi representada y el suscrito recibiremos las notificaciones en la secretaría de su despacho o en mi oficina de abogados, situada en la calle 67 # 7-35, Of. 1204 de Bogotá D.C., teléfonos 3192900.

Atentamente,

MAURICIO JARAMILLO C.
C.C. No. 80'421,942 de Usaquén
T.P. No. 74,555 del C.S.J.

WF 2664

Adjunto: lo anunciado.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 68,239
FECHA : AGOSTO 18 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

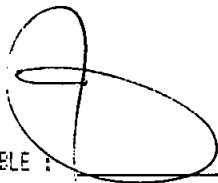
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ACMEZ PINZON ASEMARCA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	354515954	18/08/2010	\$,045,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50905-01-01	SOLICITUDES	
		114 PTC CAP-II EXAMEN DE PATENTIBILIDAD	470,000.00
		TOTAL :	\$ 470,000.00

SON: CUATROCIENTOS SETENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

PETITO



No. 08-105757- -00000-0000

Fecha: 2008-10-03 16:34:57 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 241

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad							
☒ Capítulo I (Ver folio 245) ☒ Capítulo II							
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: PARTHENIOS BOULIKAS Dirección: GR. AFXENTIOU 7 174 55 ALIMOS, ATTIKI, GRECIA Teléfono: Fax: E-Mail: Domicilio: GRECIA IDENTIFICACION C.C. NIT C.E. Otro Número						
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO Dirección: CRA. 9 No. 73-24, BOGOTA COLOMBIA Teléfono: 310 7055 Fax: 310 6657 E-Mail: mjaramillo@gomezpinzon.com IDENTIFICACIÓN C.C. X NIT C.E. Otro Número 80.421.942 TP 74.555 C.S.J.						
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: PARTHENIOS BOULIKAS Dirección: GR. AFXENTIOU 7 174 55 ALIMOS, ATTIKI, GRECIA Domicilio: GRECIA C.C. NIT						
5 PTC (86) Solicitud internacional No. PCT/GR2007/000015 Fecha: 05.03.2007 Publicación Internacional No. WO/2007/099377 A2 Fecha: 07.09.2007							
6 TITULO (54) TRATAMIENTOS PARA CÁNCER (Ver nuevo título folio 246)							
7 Clasificación Internacional (51) A61K 9/127 (2006.01)							
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	<table><tr><td>(33) País de Origen</td><td>(32) Fecha</td><td>(31) Número de Solicitud</td></tr><tr><td>GRECIA</td><td>03.03.2006</td><td>20060100144</td></tr></table>	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud	GRECIA	03.03.2006	20060100144
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud					
GRECIA	03.03.2006	20060100144					
9 Comprobante de pago No. Fecha:							

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACION SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N. De solicitud :		(51) Int. Cl:	
(22) fecha de solicitud :		A61K 9/127 (2006.01)	
(30) prioridad (31) <i>No. Prioridad</i> (32) <i>fecha</i>		(71) Solicitante (s)	
1: 20060100144 – 03.03.2006 – GR		PARTHENIOS BOULIKAS	
(33) país		(72) Inventor (es)	
GRECIA		PARTHENIOS BOULIKAS	
		(74) Apoderado:	
		MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional:		(87) publicación internacional	
03.10.2008			
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud		fecha (dd/mm/aa): 07.09.2007	
PCT		N. publicación: WO/2007/099377	
Fecha de presentación de la solicitud: 05.03.2007			
No. De solicitud: PCT/GR2007/000015			
(54) Titulo:			
TRATAMIENTOS PARA CÁNCER.			

RESUMEN

La presente invención se refiere a liposomas que comprenden oxaliplatina encapsulada y a métodos para elaborar oxaliplatina encapsulada. La invención también se refiere a liposomas que comprenden oxaliplatina y otros fármacos anticáncer. Los liposomas de la invención son útiles en los tratamientos para cáncer.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 September 2007 (07.09.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/099377 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 9/127 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/GR2007/000015

(22) International Filing Date: 5 March 2007 (05.03.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

20060100144 3 March 2006 (03.03.2006) GR

(71) Applicant and

(72) Inventor: BOULIKAS, Parthenios [GR/GR]; Gr. Afx-
entiou 7., 174 55 Alimos, Attiki (GR).

(74) Agent: MALAMIS, Alkisti-Irene; Skoufa 52 str., 106 72
Athens (GR).

(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, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, 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, MT, 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).

Declaration under Rule 4.17:

— as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

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

(54) Title: CANCER TREATMENTS

(57) Abstract: The present invention relates to liposome comprising encapsulated oxaliplatin and methods for making encapsu-
lated oxaliplatin. The invention also relates to liposomes comprising oxaliplatin and another anticancer drug. The liposome of the
invention are useful in cancer treatments.



WO 2007/099377 A2

Cancer treatments

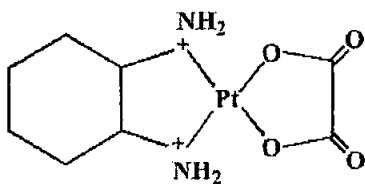
Field of the Invention

The present invention relates to liposome comprising encapsulated oxaliplatin and methods for making encapsulated oxaliplatin. The oxaliplatin liposome can be used for killing cancer cells in a variety of human and animal malignancies. The invention also relates to liposomes comprising oxaliplatin and another anticancer drug.

Background

Immunotherapy, vaccines, angiogenesis inhibitors, telomerase inhibitors, apoptosis inducers, signal transduction therapies, gene therapy and a number of targeted therapies for cancer are promising arsenals in the fight against cancer but have not demonstrated their virtues in a clinical setting. Cancer research undergoes extensive investments; yet, the five-year relative survival from the four main cancers (breast, lung, colorectal and prostate) have not changed much in the last 25 years. Tumour heterogeneity within the same individual is partly responsible for the failure of targeted therapies (Miklos, 2005). Therefore, classical chemotherapy and hormonal therapies (for breast and prostate cancers) along with radiation and surgical intervention remain the mainstay treatments for the vast majority of cancer patients.

However, improvement of delivery and tumour targeting of preexisting chemotherapy drugs with nanotechnology provides alternative treatment. Oxaliplatin is an antineoplastic agent with the molecular formula $C_8H_{14}N_2O_4Pt$ and the chemical name of cis-[(1 R,2 R)-1,2-cyclohexanediamine-N,N] [oxalato(2-)- O,O] platinum. Its chemical structure is shown below.



The structure of oxaliplatin

The use of oxaliplatin in cancer therapy has advanced the management of cancer, in particular colorectal cancer. The success of oxaliplatin lies in its ability to induce DNA

damage, resulting in bulky adducts as well as intra- and inter-strand crosslinks (Takahara et al, 1995), but also in its ability to induce apoptosis (Boulikas and Vougiouka, 2003). The platinum atom of oxaliplatin forms 1,2-intrastrand crosslinks between two adjacent guanosine residues bending the double helix by approximately 30 degrees toward the major groove. Oxaliplatin has a non-hydrolyzable diaminocyclohexane (DACH) carrier ligand that is maintained in the final cytotoxic metabolites of the drug. Its reaction with DNA and other macromolecules proceeds by hydrolysis of one or both carboxylester groups of oxalate leaving a DACH platinum monoadduct or a bifunctional DACH-platinum crosslink. The intrinsic chemical and steric characteristics of the DACH-platinum adducts appear to contribute to the lack of cross-resistance with cisplatin (reviewed in Di Francesco et al, 2002). Alkaline hydrolysis of oxaliplatin gives the oxalato monodentate complex (pKa 7.23) and the dihydrated oxaliplatin complex in two consecutive steps. The monodentate intermediate is assumed to rapidly react with endogenous compounds (Jerremalm et al, 2003). The crystal structures of oxaliplatin bound to a DNA dodecamer duplex with the sequence 5'-d(CCTCTGGTCTCC) has been reported; the platinum atom forms a 1,2-intrastrand cross-link between two adjacent guanosine residues bending the double helix by approximately 30 degrees towards the major groove. The crystallography provided structural evidence for the importance of chirality in mediating the interaction between oxaliplatin and duplex DNA (Spingler et al, 2001).

However, despite its advantages, the use of oxaliplatin is associated with a unique pattern of side-effects which include neurotoxicity, hematologic toxicity and gastrointestinal tract toxicity. There is a significant risk of grade 3/4 neutropenia to patients. Nausea and vomiting is usually mild to moderate. Nephrotoxicity is mild allowing administration of oxaliplatin without hydration. Sometimes, severe side effects may be observed such as tubular necrosis.

Furthermore, cellular resistance to free oxaliplatin has been observed, preventing the potential efficacy of free oxaliplatin. Resistance develops by clonal expansion of a tumor cell that has an advantage and can grow in the presence of oxaliplatin. Several mechanisms have been proposed to explain development of resistance to oxaliplatin in tumors of patients:

1. Resistant cells have developed a mechanism to limit transport of oxaliplatin across their cellular membrane and thus limit the intracellular levels of the drug. This is the most important mechanism for acquisition of resistance to oxaliplatin by tumor cells. The liposomal encapsulation of oxaliplatin described here circumvents this mechanism of resistance to oxaliplatin because of the fusogenic lipid DPPG in the liposomally

encapsulated oxaliplatin formulation and because of the nanoparticles size of the drug (average 100 nm) that is avidly phagocytosed by tumor, compared to normal cells.

2. Resistant cells have higher levels of glutathione, metallothioneins or other compounds that detoxify oxaliplatin.

5 3. Resistant cells have developed a faster repair in DNA lesions after oxaliplatin damage.

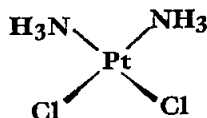
4. Other mechanisms for resistance have been proposed that are connected to the signaling of mitochondrial or nuclear apoptotic pathways responsible for the decision of the damaged cell to undergo apoptosis or to repair the damage; it is the decision to repair the damage that will result in the accumulation of mutations at the DNA level that can further change the phenotype of the tumor clone (chromosomal breakpoints resulting in translocations and other chromosomal aberrations).

Therefore, the development of less toxic and more efficient alternatives to the administration of the free drug oxaliplatin is a major challenge. The development of such alternatives could solve several of the problems of cancer therapy.

Liposomes are microscopic vesicles composed of a phospholipid bilayer that are capable of encapsulating active drugs. Liposomal drugs are promising nanovehicles for drug delivery. The liposomally encapsulated cisplatin (sold under the TM Lipoplatin® by Regulon Inc., Mountain View, CA, US 6,511,676) has been shown to reduce the nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin, while targeting tumors after systemic delivery in patients.

Oxaliplatin is a drug that has a spectrum of activity, mechanisms of action and resistance different from those of cisplatin. Oxaliplatin adduct lesions are repaired by the nucleotide excision repair system. Oxaliplatin is detoxified by glutathione (GSH)-related enzymes. ERCC1 and XPA expression was predictive of oxaliplatin sensitivity in six colon cell lines in vitro (Arnould et al, 2003). Oxaliplatin has been reported to have better efficacy than cisplatin for colorectal cancers.

Cisplatin and oxaliplatin have substantial structural differences which lead to different side effects during chemotherapy.



The structure of cisplatin

For example, the side effects of cisplatin are nephrotoxicity, peripheral neuropathy, ototoxicity, and severe gastrointestinal toxicity

(for references see McKeage MJ: Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. Drug Saf 13: 228-44, 1995, Hanigan MH and Devarajan P: Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. Cancer Ther 1, 47-61, 2003).

There exists a need of reducing the difficulties in the administration of oxaliplatin to reduce the high toxicity of free oxaliplatin when used in therapy, and of targeting tumours and providing efficient treatment to patients with tumours resistant to chemotherapy.

Furthermore, as different drugs appear to have better efficacy in the fight against different cancer cells and in respect of the position and the stage and anatomy of the malignancy, there exists the need to be able and administer in an effective way simultaneously more than one drug or genes in a combination therapy.

The present invention is aimed at solving or at least mitigating these problems by encapsulating oxaliplatin and, in another aspect, oxaliplatin and another anti cancer drug into a liposome. This increases the efficacy of the drug.

Summary of the invention

The present invention provides liposomes comprising encapsulated oxaliplatin and having a different composition of lipids in their outer and inner membrane and methods for making such liposomes. The liposomes comprise a lipid molecule with a negatively charged (anionic) headgroup. The invention also provides liposomes having encapsulated oxaliplatin and another drug and methods for making such liposomes. Further provided are the use of such liposomes in the treatment of cancer.

In a first aspect, the invention relates to a method for forming a micelle comprising oxaliplatin, the method comprising combining an effective amount of oxaliplatin and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid with a solvent.

In a second aspect, the invention relates to a method for encapsulating oxaliplatin into a liposome comprising combining an oxaliplatin micelle according to the invention with a preformed liposome or lipids.

In a third aspect, the invention relates to a method for encapsulating oxaliplatin into a liposome comprising the following steps:

- a) forming a micelle comprising oxaliplatin by combining an effective amount of oxaliplatin and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid with solvent and
- b) combining said oxaliplatin micelle with a preformed liposome or lipids.

In a fourth aspect, the invention relates to a micelle comprising an effective amount of oxaliplatin and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid.

In a fifth aspect, the invention relates to a liposome comprising an effective amount of oxaliplatin wherein the inner and outer layer of the liposome comprise different lipids. Other aspects of the invention relate to the use of the liposome in the treatment of cancer and a method of treating cancer by administration of the liposome.

In another aspect, the invention relates to a liposome comprising an effective amount of oxaliplatin and another anticancer drug.

In a further aspect, the invention relates to a liposome comprising an effective amount of oxaliplatin and an anticancer gene.

The invention also provides administration schedules for the pharmaceutical formulations, i.e. the liposomes, of the invention.

In a related further aspect, the invention concerns a combination therapy comprising administering an effective amount of gemcitabine and a liposome encapsulating an effective amount of cisplatin. Also provided is the use of a liposome having encapsulated cisplatin in the preparation of a medicament for the treatment of a human patient affected by cancer and a method for treating cancer, by combination therapy involving administration of said liposome and gemcitabine.

Detailed description

The present invention will now be further described. In the following passages different aspects of the invention are defined in more detail. Each aspect so defined may be combined with any other aspect or aspects unless clearly indicated to the contrary. In particular, any feature indicated as being preferred or advantageous may be combined with any other feature or features indicated as being preferred or advantageous.

The invention relates to a method for the encapsulation of oxaliplatin into liposomes having a different lipid composition in their inner than in the outer membrane bilayer.

In a first aspect, the invention relates to a method for forming a micelle comprising oxaliplatin, the method comprising combining an effective amount of oxaliplatin and a negatively charged with a solvent solution. The lipid is characterised in that it comprises a negatively charged (anionic) headgroup. Preferably, the lipid is phosphatidyl glycerol lipid.

Preferably, the solvent is ethanol. However, other solvents known to the skilled person, such as a carbohydrate solvent, may also be used. Methanol may be another suitable solvent.

The term oxaliplatin as used herein refers to oxaliplatin and any oxaliplatin analogues or derivatives. The liposomally encapsulated oxaliplatin of the invention is also referred to herein by its brand name LIPOXAL®.

The term negatively charged phosphatidyl glycerol lipid according to the invention relates to a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid or a derivative thereof. These lipids are characterised in that they comprise a negatively charged (anionic) headgroup. Thus, the term is used to describe any lipid having the ability to form micelles and having a net negatively charged head group. The negatively charged phosphatidyl glycerol lipid according to the different aspects of the invention may be selected from dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG), dimyristoyl phosphatidyl glycerol (DMPG), diaproyl phosphatidyl glycerol (DCPG), distearoyl phosphatidyl glycerol (DSPG) or dioleoyl phosphatidyl glycerol (DOPG). In a preferred embodiment, the negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is DPPG.

The ethanol solution according to the invention is preferably at 20 to 40%, preferably about 30% ethanol. The molar ratio of oxaliplatin to the negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is in a range of 1:1 to 1:2. Preferably, the ratio is 1:1.

Thus, according to one embodiment of the first aspect of the invention, oxaliplatin is mixed with DPPG, at a 1:1 to 1:2 molar ratio in 20-40% ethanol, in the presence of a buffer such as ammonium sulfate (10-200 mM), or Tris buffer (10-100 mM), or sodium Phosphate buffer (10-200 mM) at a pH 6.5-8.0 to achieve about 5 mg/ml final oxaliplatin concentration. The mixture is heated at 30-60 degrees Celsius and incubated for 20 min to 3h. Under these conditions the positively-charged imino groups on the oxaliplatin molecule are brought with interaction with the negatively-charged groups on the DPPG molecule forming reverse micelles in ethanolic solutions.

In a second aspect, the invention relates to a method for encapsulating oxaliplatin into a liposome comprising combining an oxaliplatin micelle according to the invention with a preformed liposome or lipids.

In a third aspect, the invention relates to a method for encapsulating oxaliplatin into a liposome comprising the following steps:

- c) forming a micelle comprising oxaliplatin by combining an effective amount of oxaliplatin and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid with a solvent and
- d) combining said oxaliplatin micelle with a preformed liposome or lipids.

In one embodiment of the methods, the micelle is mixed with a preformed liposome.

The preformed liposome or lipids used in the methods of the invention and thus, the liposome of the invention may comprise negatively and/or positively charged lipids, such as phospholipids. Many phospholipids can be used in the present invention. For example, phosphatidylcholines, phosphatidylethanolamines, distearoylphosphatidyl-ethanolamine, phosphatidylserines, phosphatidylinositols, lysophosphatidylcholines, phosphatidylglycerols, sphingomyelins or phosphatidic acid all find use in the present invention. Also used can be ceramide or other lipid derivatives. For the purpose of modifying the stability or permeability of the lipid membrane, an additional lipophilic component can be added such as, for example, cholesterol or another steroid, stearylamine, phosphatidic acid, dicetyl phosphate, tocopherol, or lanolin extracts.

The lipids may be selected from but are not limited to DDAB, dimethyldioctadecyl ammonium bromide; DMRIE: N-[1-(2,3-dimyristyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-(2-hydroxyethyl) ammonium bromide; DMTAP: 1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonium propane; DOGS: Dioctadecylamidoglycylspermine; DOTAP: N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride; DOTMA: N-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-n,n,n-

trimethylammonium chloride; DPTAP: 1,2- dipalmitoyl-3-trimethylammonium propane;
DSTAP: 1,2-disteryl-3-trimethylammonium propane.

5 In one embodiment of the invention, the oxaliplatin liposomes comprise DPPG, cholesterol and HSPC (hydrogenated soy phosphatidyl choline). Said encapsulation intends to reduce the adverse reactions of the cytotoxic agents without reducing effectiveness.

10 The liposomal preparation of the invention may also comprise an ammonium salt, such as ammonium chloride, ammonium sulfate or any other ammonium salt.

The negatively charged phosphatidyl glycerol lipids according to the invention, which are used to form the micelle and which are part of the liposome membrane, provide the advantage that they enhance the permeability of the cell membrane for delivery of drug
15 into the cytosol. The liposome can thus fuse with the membrane of the cell and release its contents into the inside of the cell. These properties are termed fusogenic. Thus, because of these fusogenic properties and the phagocytosis mechanism, the liposomal formulations of oxaliplatin according to the invention are capable of passing through the cell membrane of the tumour cell and thus have applications in the treatment of
20 oxaliplatin-resistant or drug-resistant tumours.

According to another embodiment, the complexation into the same liposome of oxaliplatin with negatively-charged phosphatidyl glycerol lipids results in very high (50-100%) encapsulation efficiency, minimizing drug loss during product manufacturing.

25

The method for encapsulation according to the invention is based on the formation of reverse micelles between oxaliplatin with a negatively-charged lipid molecule as described herein. Reverse micelles are held by electrostatic interaction between the positively-charged amino groups of oxaliplatin and a negatively-charged phosphate groups of the
30 phosphatidyl glycerol lipid, for example DPPG, and direct their hydrophobic chains of the phosphatidyl glycerol lipid toward the ethanolic solution, thus engulfing oxaliplatin molecules. The oxaliplatin- phosphatidyl glycerol lipid reverse micelles are converted into liposomes by mixing them with pre-made liposomes or lipids, this may be followed by dialysis and extrusion through membranes, to remove the ethanol, or dilution with water,
35 extrusion through filters, with or without concentration with high pressure filtration. This results in entrapping and encapsulating oxaliplatin to very high yield. The lipid composition

of the liposomes during the preparation method determines to a high extent the lipid composition of the outer surface of the nanoparticle.

In one embodiment of the different aspects of the invention, a coating which enables the liposome of the invention to evade immune surveillance can be added. Preferably, the coating is a polymer. The coating can be added either at the liposome stage or post-insertionally at the formed nanovehicle. Thus, the liposomes of the invention may comprise such coating. Polymers that can be used according to the invention include polyethylene glycol (PEG), polymethylethylene glycol, polyhydroxypropylene glycol, polypropylene glycol, polymethylpropylene glycol, polyhydroxypropylene oxide, polyoxyalkylenes, polyetheramines. Additional polymers include polyvinylpyrrolidone, polyvinylmethylether, polymethyloxazoline, polyethyloxazoline, polyhydroxypropyloxazoline, polyhydroxypropylmethacrylamide, polymethacrylamide, polydimethylacrylamide, polyhydroxypropylmethacrylate, polyhydroxyethylacrylate, hydroxymethylcellulose, hydroxyethylcellulose, polyethyleneglycol, and polyaspartamide, hyaluronic acid. A preferred polymer is PEG. For example, distearoylphosphatidylethanolamine may be derivatised with PEG to lead to PEG-derivatized distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE). The polymers may be employed as homopolymers or as block or random copolymers.

20

The liposomal oxaliplatin nanovehicles disclosed in the present invention can evade immune surveillance because of polymer coating, can circulate for extended periods in body fluids, can redistribute from tissue pools into tumors and can concentrate preferentially into solid tumors and metastases after intravenous injection to animals and humans by extravasation through the compromised vasculature that has imperfections in its endothelium during the process of neoangiogenesis.

25

An advantage of the encapsulation method described in the present invention is that the drug in the liposome nanovehicle will reach primary tumors and metastases by preferential extravasation through the leaky tumor vasculature and thus have an enhanced anticancer activity. The fusogenic lipid DPPG enhances the fusion of the nanoparticles with the tumor cell membrane whereas a higher uptake of the liposomal oxaliplatin is also enhanced by the avidity of tumor cells for phagocytosis.

30

Furthermore, a ligand may be conjugated to the polymer coating of the liposomes of the invention.

35

For example, the ligand may be a peptide, for example an antibody. Peptides may be inserted postinsertionally, for example as Peptide-PEG-DSPE conjugates. Peptides according to the invention include, but are not limited to those that are derived from the endostatin, antithrombin, anastellin, angiostatin, PEX, pigment epithelial-derived factor, thrombospondin (TSP)-1 and -2 primary structures and those that are able to exert a dual anticancer activity: that of restricting tumor angiogenesis via, for example, a 27-amino-acid peptide corresponding to the NH₂-terminal domain of endostatin attached to PEG-DSPE (Figure 17) and also exerting antitumor activity from the oxaliplatin molecules encapsulated into the same antiangiogenesis peptide-carrying liposome.

A preferred peptide is endostatin. Endostatin, the 20-kDa C-terminal proteolytic fragment of the noncollagenous domain 1 (NC1) of the basement membrane protein collagen XVIII, inhibits cell proliferation and migration and is an endogenous inhibitor of tumor angiogenesis and tumor growth. A major problem in reconciling the many reported *in vitro* effects of endostatin is the lack of a high-affinity receptor. Chronic exposure to endostatin blocks endothelial cell proliferation, and migration and induces endothelial cell apoptosis thereby inhibiting angiogenesis; endostatin stimulated acute phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at Ser116, Ser617, Ser635, and Ser1179, and dephosphorylation at Thr497 in cultured bovine aortic endothelial cells, events associated with eNOS activation. Indeed, nitric oxide (NO) is promoting angiogenesis. Short-term exposure of endothelial cell to endostatin, therefore, unlike long-term exposure which is anti-angiogenic, may be pro-angiogenic (Li et al, 2005). A 27-amino-acid peptide corresponding to the NH₂-terminal domain of endostatin elicited its full antiangiogenic activity and had strong antitumor activity; three histidines that are responsible for zinc binding were essential for the anticancer properties of the peptide (Tjin Tham Sjin et al, 2005, Tjin Tham Sjin RM, Satchi-Fainaro R, Birsner AE, Ramanujam VM, Folkman J, Javaherian K. A 27-amino-acid synthetic peptide corresponding to the NH₂-terminal zinc-binding domain of endostatin is responsible for its antitumor activity (Cancer Res. 2005 May 1;65(9):3656-63. Li C, Harris MB, Venema VJ, Venema RC. Endostatin induces acute endothelial nitric oxide and prostacyclin release. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Apr 15;329(3):873-8.)

Peptide ligands are derived easily to those skilled in the prior art by selection of peptide libraries for ligands able to interact specifically with peptide epitopes derived from tumor-specific antigens overexpressed at the surface of the tumour cell. Attachment of these peptides at the end of PEG with the chemistry shown in Figure 17 gives oxaliplatin encapsulating liposomes able to be directed to specific tumours. Table 1 diagrammatically

depicts tumour antigens from which peptides exposed to the external cell surface can be derived, synthesized, and used to derive peptide ligands from random peptide libraries with high affinity for the tumour antigen. Such peptide ligands are then covalently attached to the lipid-polymer molecule, for example a PEG-DSPE molecule, that is inserted at the liposome particle.

Other ligands may be selected from the group consisting of transferrin, folic acid, hyaluronic acid, a sugar chain such as galactose or mannose, a monoclonal antibody, pyridoxal phosphate, vitamin B12, sialyl Lewis X, epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, vascular cell adhesion molecule (VCAM-1), intercellular adhesion molecule (ICAM-1), platelet endothelial adhesion molecule (PECAM-1), an Arg-Gly-Asp (RGD) peptide, or an Asp-Gly-Arg (NGR) peptide, and a Fab' fragment of a monoclonal antibody.

In one embodiment, the liposomal oxaliplatin particles are modified on their surface with PEG-DSPE-folate conjugates inserted after formation of the liposome particle to direct the particles to tumors overexpressing folate receptors.

Molecule	Disease indication	Reference
EGFR	NSCLC, breast cancer, bladder, ovarian cancer	Yarden Y. & Slivkowski M.X. (2001); Lynch et al. (2004)
HER/NEU	Breast, ovarian, lung cancer, ovarian, colorectal, prostate cancer	Koeppen H. K., et al., (2001), Slamon D. J., et al., (1989)
VEGFR	Angiogenesis, NSCLC	Cardones A.R. & Banez-L.L. (2006), Rosen L.S. (2005)
FR (Folate Receptor)	Ovarian, breast, brain, lung, colorectal cancer	Sudimack J. and Lee R.J. (2000), Garin-Chesa P. et al., (1993), Ross J.F., et al., (1994)
MUC	Breast, lung, colorectal, prostate, kidney, pancreatic cancer	Liu, et al., (2004), Finn O. J. et al., (1995)
Hsp90 (Molecular chaperone)	Breast, lung cancer (involved in the chaperoning of many cancer antigens)	Whitesell L. & Linquist S. L. (2005), Yu X. et al., (2002)
CD20	Non-Hodgkin's lymphoma, autoimmune diseases	Perosa F., et al., (2005), Wojciechowski W., et al., (2005)
CEA	Colorectal cancer	Liu K., et al., (2004)
TAA (Tumor-associated antigens: MAGE)	breast cancer, NSCLC, ovarian, gastric cancer	Bandic D., et al., (2006), Ito S., et al., (2005)
EpCAM	breast, ovarian, colon cancer	Osta W.A., et al., (2004)

Table 1: Ligands

Peptides directed against tumor antigens can also be added at the end of a polymer, for example a PEG-polymer for multifunctionalization giving to the nanoparticles the property to target specific tumors overexpressing specific surface antigens.

5 In one embodiment, the liposomal oxaliplatin particles are also modified with folic acid directing the oxaliplatin lipo-nano-particles to ovarian (and other) malignant cells overexpressing folate receptors.

10 In another embodiment, the liposomal oxaliplatin particles are also modified with Her2/neu ligands directing the oxaliplatin nano-particles to breast cancer cells overexpressing Her2/neu.

The liposomal formulations of oxaliplatin according to the invention circumvent the problem of resistance to free oxaliplatin caused by reduced uptake of the drug in resistant tumors. Thus, the formulations have applications in the treatment of oxaliplatin-resistant tumors. The liposomal formulations of oxaliplatin according to the invention also display a lower toxicity profile than the free drug oxaliplatin (free oxaliplatin) in human clinical trials against a variety of solid malignancies. Further, because the spectrum of side effects of these liposomal formulations of oxaliplatin are different than those of free oxaliplatin and the mechanism of entry into tumor cells is also different, the liposomal formulations of oxaliplatin according to the invention may have advantages clinical applications in non-small cell lung cancer, in breast cancer, in ovarian cancer, in head and neck cancer, in metastatic prostate cancer and in several other solid tumours, in addition to colorectal and gastric cancers.

25

In one embodiment, the liposomally encapsulated oxaliplatin of the invention is able to lower the levels of bilirubin (Figure 2) or the bone metastases (Figure 3) in treated patients.

30 In another embodiment, the liposomal preparations described herein can be used after intravenous infusion to lower the side effects of oxaliplatin, especially gastrointestinal toxicity and of the other co-encapsulated drugs.

The liposomal preparations according to the invention can be directed preferentially to human tumours and their metastases.

35

17

13

Thus, in a further aspect, the invention relates to a liposome comprising oxaliplatin as described herein for use as a medicament.

5 In another aspect the invention relates to the use of a liposome having encapsulated oxaliplatin in the manufacture of a medicament for the treatment of cancer.

The invention also relates to a method of treatment of cancer comprising administering a liposome having encapsulated oxaliplatin according to the invention to a patient.

10 Different types of cancer may be treated, including colorectal cancer, gastric cancer, pancreatic, breast cancer, non-small cell lung cancer, in ovarian cancer, head and neck cancer, prostate cancer, testicular, intestinal cancer, oesophageal or urothelial cancer. Preferably, the treatment is for colorectal, gastric or pancreatic cancer.

15 The liposome is administered weekly by intravenous infusion at a dosage of 100 to 350mg/m². Preferably, administration is at a dosage of 300mg/m², but other possible dosages are 100 mg/m², 150 mg/m², 200 mg/m² or 250 mg/m². In one embodiment, the administration is in 2 to 5 cycles. Each cycle is 8 to 12 weeks and is followed by a one or two weeks rest. Preferably, the intravenous weekly infusion is for 3 hours.

20

In another embodiment, administration is very two weeks.

These administration schedules described above may also be used when oxaliplatin is administered as a combination therapy as described herein.

25

In another aspect, the invention relates to a method for making micelles and/or liposomes comprising two anticancer drugs, oxaliplatin and another drug. The method is as described herein with reference to making oxaliplatin liposomes but includes the step of including another anticancer drug in the micelle or liposome.

30

Thus, in a further aspect, the invention relates to liposomes comprising encapsulated oxaliplatin and another anticancer drug. The drugs are thus encapsulated within the same liposome. This has the advantage that they can be delivered together to the target. It is also possible and within the scope of the invention to include more than one other
35 anticancer drug in the liposome.

In one embodiment, at least two anticancer drugs with different mechanisms of action are included in the same liposome according to the invention. Therefore, the tumour cell can be targeted with two independent mechanisms, leading to a better clinical success.

5 The other anticancer drug can be selected from compounds such as platinum compounds (such as cisplatin, carboplatin), antimetabolite drugs (such as 5-fluorouracil, cytarabine, gemcitabine, pentostatin and methotrexate), anthracycline drug which targets DNA (such as doxorubicin and epirubicin), drugs which target DNA or drugs which target topoisomerases or other chemotherapy drugs.

10

In a preferred embodiment, the other drug is selected from cisplatin, docetaxel, paclitaxel, gemcitabine, navelbine, doxorubicin, irinotecan, SN-38, gemcitabine or 5-fluorodeoxyuridine.

15

By including the two drugs in the same liposome, it is possible to use a lower dose of each drug than when each drug is administered alone. The two drugs may act in a synergistic manner, thus incurring more damage to the tumour cell with lower side effects.

20

In another preferred embodiment, cisplatin and oxaliplatin are coencapsulated into the same liposome nanoparticle. Thus, the same tumor cell can be attached simultaneously by both, cisplatin and oxaliplatin. The side effects of cisplatin (nephrotoxicity, neurotoxicity, nausea/vomiting) are different from the side effects of liposomal cisplatin (hematological toxicity). The side effects of oxaliplatin are also different from the side effects of liposomal oxaliplatin (neuropathy). Thus, the same tumor cell can be targeted

25

with at least two independent mechanisms, while otherwise (if not administered encapsulated in the same liposome) the two drugs (oxaliplatin and cisplatin) would most probably each target a different cell. Besides, the administration of a combination of different drugs encapsulated in the same liposome makes it possible to use lower dosages for attaining efficacy thus avoiding or reducing the toxicity of the drugs. More

30

particularly, by lowering the dosage of oxaliplatin the inventors have found that the side effect of neurotoxicity may be limited whilst by lowering the dosage of cisplatin the side-effect of myelotoxicity may be limited. As a result, there is improvement of the profile of neurotoxicity and myelotoxicity of the administered liposomal oxaliplatin and liposomal cisplatin, respectively, whereas at the same time it is possible to incur the same or a higher damage to the tumours after systemic administration. Thus, the combination of

35

cisplatin and oxaliplatin into the same liposome allows the administration of each of the

19

15

said drugs at lower doses, under conditions where the side effects of the liposomal drugs are even more minimized.

In another embodiment, the liposomally encapsulated oxaliplatin of the invention is
5 combined with the drug doxorubicin (DOX) which is encapsulated into the same liposomal
oxaliplatin particle as oxaliplatin as described in the methods of the invention. Surprisingly,
the inventors have found that this may lower the dose of oxaliplatin and by consequence
the neurotoxicity of the administered liposomal oxaliplatin whilst also reducing the dose of
DOX. This reduces the cardiotoxicity and other side effects of DOX whilst inflicting the
10 same or a higher damage to the tumours.

In another embodiment, the liposome comprises oxaliplatin and 5-fluorouracil. Oxaliplatin
in combination with 5-fluorouracil has been recently approved for the treatment of
metastatic colorectal cancer. However, there are serious problems in the administration of
15 such drugs, mainly due to the important side effects of either drugs, which are minimized
with their liposomal encapsulation as described in the invention. Furthermore, by
combining the drugs as described herein, effectiveness of the treatment is increased.

The invention also relates to the encapsulation of oxaliplatin and an anticancer gene in the
20 same liposome. Thus, liposomes according to the invention may comprise oxaliplatin and
an anticancer gene. The anticancer genes used include, but are not limited to p53, IL-2,
IL-12, angiostatin, and oncostatin.

In another aspect, the invention relates to a combination therapy wherein oxaliplatin is
25 administered together with another drug or gene as specified herein wherein both drugs
are encapsulated in the same liposome. Thus, the liposomes comprising oxaliplatin and
another anticancer drug or gene can be used in the manufacture of a medicament for the
treatment of cancer or in a method of treating cancer. Furthermore, the invention relates
to a first medical use of the combination liposomes:

30

A skilled person will appreciate that administration schedules and dosage of the
components vary according to the other drug present. As for oxaliplatin, a dosage and
dosage range as described herein can be used. Furthermore, the administration schedule
of the combination liposome may be as described herein for oxaliplatin.

35

In one embodiment, the liposomally encapsulated oxaliplatin of the invention is
administered to cancer patients 150-300 mg/m² weekly (Days 1, 8, 15) for 12 weeks as

monotherapy or in combination with 1 g/m² gemcitabine on days 1, 8 in a 21-day cycle or in combination with docetaxel, paclitaxel, irinotecan.

In a related aspect, the invention is directed to liposomally encapsulated cisplatin wherein
5 cisplatin is encapsulated in combination with another anticancer drugs as defined herein. Cisplatin can thus be combined in the same liposome particle with any one of the anticancer drugs of paclitaxel, docetaxel, irinotecan, SN-38, gemcitabine, 5-fluorodeoxyuridine. The advantage is that the same tumor cell is being attacked simultaneously by cisplatin and one other drug, thus, achieving a more effective killing
10 because of the two independent molecular mechanisms involved. For example, cisplatin will elicit mitochondrial and nuclear signalling for apoptosis as well as DNA crosslinks arresting replication whereas docetaxel will act at the tubulin polymerization.

Advantageously, liposomally encapsulated cisplatin is encapsulated into the same
15 liposome in combination with gemcitabine, using the methods as described herein.

In another aspect, the oxaliplatin comprising liposome of the invention may be administered together with another anticancer drug, but the other drug does not form part of the same liposome. The other drug is as described herein and is preferably selected
20 from cisplatin, docetaxel, paclitaxel, gemcitabine, navelbine, doxorubicin, irinotecan, SN-38, gemcitabine or 5-fluorodeoxyuridine.

Furthermore, in a separate aspect, the invention relates to the administration of Lipoplatin® in combination with gemcitabine. Thus, a combination therapy of Lipoplatin®
25 and gemcitabine is an object of the invention. Also provided is the use of Lipoplatin® in the preparation of a medicament for the treatment of a human patient affected by cancer, by combination therapy involving administration of Lipoplatin® and another drug that is not encapsulated in the same liposome.

30 The other drug can be administered at the same time as Lipoplatin® or at a different time.

Preferably, the other drug is gemcitabine and the administration leads to clinical improvement. Preferably, the cancer treated is pancreatic cancer, but other cancers, such as colorectal cancer, gastric cancer, breast cancer, non-small cell lung cancer, ovarian
35 cancer, head and neck cancer, prostate cancer, testicular, intestinal cancer, bladder, esophageal or urothelial cancer, may also be treated. The dosage used for gemcitabine is

800 to 1000mg/m², preferably 1000mg/m². The lipoplatin dose is 100 to 125 mg/m², preferably 100mg/m².

Administration of Lipoplatin® and gemcitabine is intravenous. Lipoplatin® is preferably administered as an 8 hour IV infusion every two weeks (day 1 and day 15). Gemcitabine is preferably administered as a 60 min iv infusion every two weeks. Administration of the compounds may be in cycles of 4 weeks.

The invention is further illustrated with reference to the following figures and examples. The examples show that the administration of oxaliplatin liposomes leads to clinical improvement, i.e. has a clinical effect in the treatment of cancer. Example II shows, that administration of Lipoplatin® and gemcitabine provides clinical benefits, thus leading to clinical improvement.

15 **Description of the Figures**

Figure 1: Schematic representation of the liposomal oxaliplatin shown as yellow rectangles. Lipid molecules are depicted with spherical hydrophilic heads. Red random chains on the surface of the particle represent the PEG molecules that give to the particle its ability to escape destruction from macrophages in the liver, opsonization (interaction with serum proteins and other macromolecules) in the blood and the ability to extravasate into solid tumors and metastases after systemic delivery (also its small size of 100 nm).

Figure 2: Reduction in bilirubin levels in a patient (TK) with colorectal cancer and liver metastases. The patient was going into hepatic coma from the very high levels of bilirubin in the blood (50 mg/100 ml). Injection of Liposomal oxaliplatin at doses of 200 mg/m² on day 1, day 8, day 15 and day 22 resulted in progressive reduction of total bilirubin from 50 to 12 mg/m². Most likely this resulted from reduction in the liver metastases that occluded the biliary tract. Further treatments on days 31 and 37 did not stop the disease progression as deduced from bilirubin levels.

Figure 3: Reduction in bone metastases after monotherapy with liposomal oxaliplatin. A patient (EK) suffering with gastric cancer and bone metastases was treated with 150 mg/m² every 7 days for 10 weeks. There was a significant improvement in quality of life, much less pain, lesser use of analgesics and the patients was able to perform his work on a daily basis.

Figure 4: Coencapsulation of cisplatin and oxaliplatin into the same liposome particle and further postinsertional modification of the particles with peptide-PEG-LIPID conjugates to direct these to specific cell types with surface receptors recognized by the peptides or

ligands. The scheme also depicts peptide chains (red color) added at the end of PEG molecules for the multifunctionalization of the liposome particles and their preferential direction to specific tumors. In this case, specific tumor antigens are recognized by the peptide moiety on the surface of the liposome. For example, epidermal growth factor) peptide epitopes able to bind to the part of the EGFR exposed to the outer surface directs said liposomes to tumors overexpressing EGFR.

Figure 5A: shows maxima levels of ~14 mg total platinum /ml plasma after liposomally encapsulated oxaliplatin compared to ~8 mg total platinum /ml plasma after oxaliplatin and these were reached at 20 min for liposomally encapsulated oxaliplatin and at 10 min for oxaliplatin.

Figure 5B: shows that total platinum levels in rat plasma reached zero at ~ 100 h post-injection for free oxaliplatin.

Figure 6A: shows the total platinum levels in rat plasma in animals treated also with Lipoplatin®.

Figure 7A: shows the total Platinum levels in kidney tissue in animals treated for 5 hrs and Figure 7B shows the same treated for 190 hrs.

Figure 8A: shows the total Platinum levels in liver tissue in animals treated for 5 hrs and Figure 8B shows the same treated for 190 hrs.

Figures 9A and 9B: show the total Platinum levels in spleen tissue in animals treated for 190 hrs.

Figure 10A: shows the total Platinum distribution in rat tissue in animals treated with both free oxaliplatin and liposomally encapsulated oxaliplatin for 5 hrs and Figure 10B Figures 11A and 11B are charts of rats treated repeatedly (11 times) with liposomally encapsulated oxaliplatin.

Figure 12 is a chart of rats treated repeatedly (6 times) with liposomally encapsulated oxaliplatin.

Figure 13: Lipoxal can induce complete disappearance of human breast cancers in mice after 6 intravenous injections with 4 days intervals at doses of 16 mg/Kg. Oxaliplatin at its MTD (Maximum tolerated dose) can only cause shrinkage, not disappearance of human breast tumors in mice.

Figure 14: The dose of 16 mg/Kg liposomal oxaliplatin (Lipoxal) is the most effective in eradicating breast cancer in mouse xenografts. Oxaliplatin at its maximum tolerated dose of 4 mg/Kg has a lower anticancer efficacy in this mouse model followed by a dose of 5 mg/Kg Lipoxal.

Figures 15 and 16 show the results of the clinical trials of liposomally encapsulated oxaliplatin.

Figure 17: Chemical procedure for coupling peptides to PEG-DSPE.

Examples

EXAMPLE I

Making liposomes

- 5 Oxaliplatin is mixed with DPPG (dipalmitoyl phosphatidyl glycerol) or other negatively-charged lipid molecules at a 1:1 molar ratio in 30% ethanol, 0.1 M Tris HCl, pH 7.5 at 5 mg/ml final oxaliplatin in the presence of ethanol solutions at a concentration of 20-40% and under temperature conditions of 30-60 degrees Celsius in the presence of ammonium sulfate (10-200 mM), or Tris buffer (10-100 mM), or sodium Phosphate buffer (10-200 mM) at a pH 6.5-8.0 is incubated for 20 min-3h. Under these conditions the positively-charged imino groups on the oxaliplatin molecule are brought with interaction with the negatively-charged groups on the DPPG molecule forming in ethanolic solutions reverse micelles (see also the Lipoplatin US patent 6,511,676). The resulting reverse micelles of oxaliplatin-DPPG are then converted into liposomes encapsulating the oxaliplatin-DPPG monolayer by rapid mixing with preformed liposomes composed of cholesterol, phosphatidyl choline, mPEG-DSPE (polyethylene glycol - distearoyl phosphatidyl ethanolamine), followed by dialysis against saline and extrusion through membranes to downsize the particles to 80-120 nm in diameter. It is the lipid composition of added liposomes that determines the composition of the outer surface of the final oxaliplatin formulation (Figure 1).

EXAMPLE II

A. Preliminary Clinical experience with liposomally encapsulated oxaliplatin

25 I.A. Animal studies

- The animal studies carried from May 2003 till December 2004 in USA, France, Switzerland and Hellas (Pasteur Institute, Athens) on mouse xenografts by independent laboratories have shown a better therapeutic efficacy of the liposomally encapsulated oxaliplatin compared to mere oxaliplatin as well as a lower toxicity profile and was shown to be better tolerated in mice and rats compared to the free drug oxaliplatin. Furthermore, liposomally encapsulated oxaliplatin could induce complete disappearance or shrinkage of a variety of human cancers in mice after 6-8 intravenous injections in a more effective and less toxic treatment than oxaliplatin.
- 35 Liposomally encapsulated oxaliplatin has shown to induce complete disappearance of human breast cancers in mice after 6 intravenous injections with 4 days intervals at doses

of 16 mg/Kg. On the other hand the free drug oxaliplatin at its MTD (Maximum tolerated dose) can only cause shrinkage, not disappearance of tumours.

Mice injected with 5 mg/Kg free oxaliplatin died of toxicity and the dose was lowered to 4 mg/Kg. The dose of liposomally encapsulated oxaliplatin was 16 mg/Kg i.v. and the toxicity was lower than 4 mg/Kg free oxaliplatin. The anticancer efficacy of 4 mg/Kg free oxaliplatin was lower than that of 16 mg/Kg liposomally encapsulated oxaliplatin in animals with human tumours.

10 In the said study animal studies of a liposomally encapsulated oxaliplatin was reported. Intraperitoneal (i.p.) injection of liposomally encapsulated oxaliplatin, or free oxaliplatin as a control, to rats was used to study tissue biodistribution from 10 minutes to 7 days postinjection. Maximum levels of total platinum (Pt) in plasma at a dose of 15 mg/Kg were 14.0 mg/ml plasma after liposomally encapsulated oxaliplatin injection compared to 7.5 mg/ml plasma after free oxaliplatin treatment; these levels were attained at 10-15 min from injection. A similar to plasma pharmacokinetic behavior was observed for kidney tissue; plasma and kidney had the highest levels of platinum among all tissues examined during the first 20 min from injection. Spleen tissue exhibited over 2 times higher levels of platinum after free oxaliplatin treatment compared to liposomally encapsulated oxaliplatin at the same dose level during an extended period of 40-190h post-injection. Following 11 repetitive administrations of liposomally encapsulated oxaliplatin to rats, spleen attained astonishingly high levels of total Pt among all tissues examined (80 mg/g tissue). Liver exhibited similar pharmacokinetics of Pt accumulation as a function of time after free oxaliplatin versus liposomally encapsulated oxaliplatin treatment. Lipoplatin® for comparison, exhibited similar pharmacokinetic behavior to liposomally encapsulated oxaliplatin in rat kidney from 10 minutes to 7 days but liver pharmacokinetics were similar between the two drugs up to 4h and there was a higher accumulation of liposomally encapsulated oxaliplatin compared to Lipoplatin® over periods of 7 days. Full biochemical and blood cell counts in rats have established that liposomally encapsulated oxaliplatin exhibited a lower myelotoxicity compared to free oxaliplatin. SGOT transaminase, alkaline phosphatase, bilirubin, creatinine, blood urea, and blood uric acid levels were normal consistent with no hepatic or nephrotoxicity from liposomally encapsulated oxaliplatin in rats. The data show a more extended retention of liposomally encapsulated oxaliplatin in rat tissues consistent with its liposomal PEGylated formulation and a lower toxicity profile.

35

Injectons of rats with liposomally encapsulated oxaliplatin for pharmacokinetic studies

For pharmacokinetic studies 20 Wistar female rats, 2-3 months of age were used of an average body weight of 150g. Rats were injected in the intraperitoneal cavity with a suspension of 3 mg/ml liposomally encapsulated oxaliplatin giving a final dose of 15 mg/Kg. Two animals per time point were used. Rats were sacrificed at ~7 min, 20 min, 1.5h, 3.75h, 24h, 40h, 90h and 170-180h postinjection. Blood was collected in heparinized Eppendorf tubes and was centrifuged. Total platinum levels in plasma was determined using furnace Atomic Absorption (AA700 Perkin Elmer).

Repeated injections of rats with liposomally encapsulated oxaliplatin for histology studies
We were interested determining the damage to various tissues after repeated injection of liposomally encapsulated oxaliplatin to its maximum tolerated dose in rats.

Biochemical and hematological analysis in rats for toxicity from liposomally encapsulated oxaliplatin

Rats were injected in the intraperitoneal cavity with a suspension of 3 mg/ml liposomally encapsulated oxaliplatin giving a final dose of 15 or 30 mg/Kg. Blood from rats used for plasma pharmacokinetic studies was also analyzed (7 days postinjection) for bone marrow, renal, hepatic and gastrointestinal functions by an independent microbiology laboratory. The parameters examined were hemoglobin, hematocrit, leukocytes, granulocytes, platelets, SGOT transaminase, SGPT transaminase, alkaline phosphatase, total bilirubin, urea, uric acid and creatinine.

Results

Toxicology of liposomally encapsulated oxaliplatin in rats

Rats were injected to a final dose of 15 or 30 mg/Kg with free Oxaliplatin or liposomally encapsulated oxaliplatin. The 30 mg/Kg oxaliplatin group severely lost appetite and exhibited severe weight loss; there was a 33% weight loss in the 30 mg/Kg oxaliplatin group at 7 days post-treatment; the average weight of all animals dropped from 150 g to an average of 100g after 7 days. On the contrary, animals injected with the same dose of 30 mg/Kg liposomally encapsulated oxaliplatin, showed only a 10% reduction in weight (from an average of 150 g to a the final of 135 g on day 7).

At 7 days postinjection blood drawn into heparinized or non-heparinized tubes from the 15 mg/Kg treated animals and was given to an independent clinical laboratory for full biochemical and hematological analysis. Two animals per group were used. Table 1 shows the average of two measurements. The 15 mg/Kg oxaliplatin group displays a drop

in leukocytes to 800,000 /mm³ (Grade 4 toxicity according to WHO) compared to 3,400,000 /mm³ (Grade 1 toxicity) for the group treated with liposomally encapsulated oxaliplatin. Therefore, liposomally encapsulated oxaliplatin did not cause the extensive reduction in leukocyte counts as compared to free oxaliplatin. Platelet levels were also reduced to a higher extend by oxaliplatin compared to liposomally encapsulated oxaliplatin. The hemoglobin levels were close to normal for both treatments. Therefore, the myelotoxicity of either drug appears to be directed more to the leukocyte and platelet rather than erythropoiesis programs. The SGOT transaminase was elevated by either drug consistent with Grade 2 hepatic toxicity; however, the levels of SGPT transaminase and alkaline phosphatase were not affected; bilirubin, blood urea and creatinine levels were not affected (although blood uric acid levels dropped) consistent with absence of nephrotoxicity caused by either free oxaliplatin or liposomally encapsulated oxaliplatin in rats after i.p. administration.

	Oxaliplatin Rats i.p. 15 mg/Kg 7 days post injection	liposomally encapsulated oxaliplatin Rats i.p. 15 mg/Kg 7 days post injection	Control rats
Hemoglobin (gr/dl)	15.8	19	16.9
Hematocrit HCT (%)	42	51.5	45
Leukocytes (1,000/mm ³)	800 (Grade 4)	3,400 (Grade 1)	7,500
Granulocytes (neutrophils) % of leukocytes	44%	38%	31%
Platelets (1,000/mm ³)	57 (Grade 2)	106 (Grade 0)	624
SGOT transaminase (U/L)	172 (Grade 2)	196 (Grade 2)	84
SGPT transaminase (U/L)	24	37	42
Alkaline phosphatase (U/L)	126	197	105
Bilirubin (mg%)	0.71	0.64	0.71
Blood urea (mg%)	34	24	38
Blood uric acid (mg%)	0.08	0.28	1.7
Creatinine (mg%)	0.61	0.46	0.33

Table 2. Changes in bone marrow, hepatic and kidney functions in rats after i.p. injection of liposomally encapsulated oxaliplatin or free oxaliplatin.

Pharmacokinetics in rats

Rats were injected in the intraperitoneal cavity directly from a stock solution of 3 mg/ml liposomally encapsulated oxaliplatin or 3 mg/ml free oxaliplatin in 5% Dextrose to a final dose of 15 mg/Kg i.p. liposomally encapsulated oxaliplatin or oxaliplatin. At various time points postinjection, blood was drawn, plasma was isolated and total platinum levels were measured for pharmacokinetic studies. Figure 5A shows maxima levels of ~14 mg total platinum /ml plasma after liposomally encapsulated oxaliplatin compared to ~8 mg total platinum /ml plasma after free oxaliplatin and these were reached at 20 min for liposomally encapsulated oxaliplatin and at 10 min for free oxaliplatin. At approximately 45 min, both groups exhibited similar levels of total platinum (~ 5 mg total platinum /ml plasma), whereas at 4-5 h postinjection levels below 1 mg total platinum /ml plasma were obtained for liposomally encapsulated oxaliplatin compared to ~ 2 mg total platinum /ml plasma for free oxaliplatin. At 40h the levels of total platinum in rat plasma dropped to zero for liposomally encapsulated oxaliplatin and to ~1 mg total platinum /ml plasma for free oxaliplatin; total platinum levels in rat plasma reached zero at ~ 100 h post-injection for free oxaliplatin (Figure 5B).

Plasma						
Lipoxal® (15 mg/Kg)	AUC (h*µg/ml)	C _{max} (µg/ml)	Cl (ml/g h)	Kel (1/h)	t _{1/2} (h)	V _{ss} (ml/g)
	53.7s	14.0	0.28	0.07	10.2	4.11
Kidney						
Lipoxal® (15 mg/Kg)	AUC (h*µg/g)	C _{max} (µg/g)	Cl (1/h)	Kel (1/h)	t _{1/2} (h)	V _{ss}
	460.1	13.7	0.03	0.033	21.00	1.00

Plasma						
Dose (mg/Kg)	AUC (h*µg/ml)	C _{max} (µg/ml)	Cl (ml/g h)	Kel (1/h)	t _{1/2} (h)	V _{ss} (ml/g)
15	74.4	7.6	0.20	N/A	N/A	N/A
Kidney						
Dose (mg/Kg)	AUC (h*µg/g)	C _{max} (µg/g)	Cl (1/h)	Kel (1/h)	t _{1/2} (h)	V _{ss}
15	#####	10.5	0.01	0.002	50	7.18

Table 3

Mean pharmacokinetic parameters for total platinum calculated for the 15 mg/Kg dose of liposomally encapsulated oxaliplatin (Lipoxal®) or free oxaliplatin are shown in Table 2.

The AUC, determined using the linear trapezoidal method with extrapolation to infinity (Gibaldi et al, 1982 Gibaldi M, Perrier D: Noncompartmental analysis based on the statistical moment theory. In Pharmacokinetics, Gibaldi M, Perrier D (eds), pp 409-417, 2nd edn. Marcel Dekker: New York, 1982.), was 53.7 mg.h/ml for liposomally encapsulated oxaliplatin compared to 74.4 mg.h/ml for oxaliplatin.

The maximum concentration of total platinum in plasma reached (C_{max}) was 14.0 mg/ml for liposomally encapsulated oxaliplatin compared to 7.6 mg/ml for free oxaliplatin. Total body clearance (Cl) was 0.28 ml/g.h for liposomally encapsulated oxaliplatin compared to 0.20 ml/g.h for free oxaliplatin. This was calculated from $Cl = D_{i.v.} / AUC$, where D_{i.v.} is the i.p. dose of liposomally encapsulated oxaliplatin or free oxaliplatin and AUC the relative area under the curve for this specific dose.

The elimination rate constant (K_{el}) was 0.07 h⁻¹ for liposomally encapsulated oxaliplatin. This was calculated by linear regression analysis of the logarithmic plasma concentration-time curve by the formula $K_{el} = [\ln(C_{p1}) - \ln(C_{p2})] / (t_2 - t_1)$ where t₁ and t₂ are the starting and ending time points of measurements and C_{p1} and C_{p2} the starting and ending concentrations of total platinum in plasma for t₁ and t₂, respectively.

The elimination half-life (t_{1/2}) was 10.2 h for liposomally encapsulated oxaliplatin. This was calculated by the formula: $t_{1/2} = 0.693 (1/K_{el})$. 1/K_{el} is the mean residence time (MRT), the statistical moment analogy to half-life t_{1/2} (Gibaldi et al, 1982).

Total platinum levels in rat plasma were also determined in animals treated with Lipoplatin®, a different liposomal platinum drug currently under Phase III evaluation (Stathopoulos et al, 2005). Lipoplatin®, a liposomal cisplatin, was given at 30 mg/Kg i.p. The maxima levels were ~17 mg total platinum /ml plasma after 30 mg/Kg Lipoplatin and these were reached at 20 min from injection in a similar time frame to liposomally encapsulated oxaliplatin (Figure 6A). Cisplatin as a control was also administered i.p. to rats at its maximum tolerated dose of 5 mg/Kg; the maxima levels were ~7.5 mg total platinum /ml plasma after cisplatin and these were reached at 10 min from injection in a similar time frame to oxaliplatin. All four drugs gave parallel pharmacokinetic behavior after ~ 1.5h post-injection; however, at 5h Lipoplatin® injection resulted in ~ 2.5 mg total platinum /ml plasma, followed by oxaliplatin at 2.0 mg total platinum /ml plasma, cisplatin at ~1.5 mg total platinum /ml plasma and liposomally encapsulated oxaliplatin at ~ 1.0 mg total platinum /ml plasma.

Biodistribution of total platinum in rat tissues after liposomally encapsulated oxaliplatin or free oxaliplatin i.p. infusion

It is useful to study platinum drug distribution in mouse or rat tissue because of the accuracy of results and the relatively ease of assay of platinum with atomic absorption. Platinum levels in kidney: The maximum amount of total platinum in the kidney was 13.7 mg/g tissue after 15 mg/Kg liposomally encapsulated oxaliplatin compared to ~10.5 mg/g tissue after 15 mg/Kg oxaliplatin and was reached in 7-20 min from injection (Figure 7A). However, after about 4h the Pt levels in the kidney reached a minimum of 4.8 mg/g tissue after oxaliplatin and slightly increased to 6.9 mg/g tissue at 167h postinjection. After liposomally encapsulated oxaliplatin treatment there is also a minimum of ~1mg/g tissue total Pt in the kidney reached at ~20h postinjection that slightly increased to 2.5 mg/g tissue at 188h. Thus, kidneys display about 3 times higher levels of Pt after oxaliplatin compared to same dose of liposomally encapsulated oxaliplatin treatment at ~7 days postinjection (Figure 7B).

For comparison, Lipoplatin® at 30 mg/Kg reached maximum levels in kidney of 34 mg/g tissue compared to 10 mg/g tissue after 5 mg/Kg cisplatin.

The pharmacokinetics in kidney exhibit a similar behavior between Lipoplatin® and liposomally encapsulated oxaliplatin. The maxima are 34 and 14 mg/g tissue for 30 mg/Kg Lipoplatin® and 15 mg/Kg liposomally encapsulated oxaliplatin respectively. This advocates for the similarity in kidney biodistribution of the two drugs that share common shell but differ in the drug they confine in their interior and in the tumors that they target. At 120 h the levels of total platinum in kidney are 5 mg/g tissue for 30 mg/Kg Lipoplatin® compared to ~ 2.5 mg/g tissue for 15 mg/Kg liposomally encapsulated oxaliplatin (Figure 3B). At ~ 140h postinjection the total platinum is ~7 mg/g tissue after 15 mg/Kg free oxaliplatin compared to ~ 4 mg/g tissue after 5 mg/Kg cisplatin (Figure 3B).

Conclusion:

Levels of Pt in kidneys were the highest among all rat tissues at 7days followed by liver and spleen.

Platinum levels in liver

Total platinum in liver after 15 mg/Kg liposomally encapsulated oxaliplatin was 3.5 mg/g tissue attained at ~ 7-10 min from i.p. infusion with an abrupt drop to 2.5 at 20 min and thereafter that was maintained for 5h (Figure 8A). On the contrary, infusion of the

intraperitoneal cavity of rats with free oxaliplatin at the same dose resulted in similar total platinum levels in liver (3.0-3.5 mg/g tissue) that were attained at about 30 min from infusion, maintained for 2h and then gradually decreased to 1.5 mg/g tissue at 5h (Figure 4A). Unlike plasma whose platinum levels drop to zero after about 40h there was a liver accumulation of platinum of ~2 mg/g tissue at 170-190h after both liposomally encapsulated oxaliplatin and free oxaliplatin treatment (Figure 8B).

For comparison, total platinum in liver after 30 mg/Kg Lipoplatin® was 7 mg/g tissue maintained for ~5h (Figure 8A) it dropped to 4.5 at ~ 12h ; increased to 6.5 at 24h and gradually decreased to 3.5 at 120h (Fig 4B). Cisplatin also displayed a similar pattern to Lipoplatin® with a maximum level of 2.5 attained at 20 min maintained for 5h (Fig 4A), then dropped gradually to 1 from 24 to 150h (Figure 8B).

Total platinum in spleen: The maximum amount of total platinum in the spleen was 3.2 mg/g tissue following administration of liposomally encapsulated oxaliplatin at 15 mg/Kg compared to ~5.2 mg/g tissue after 15 mg/Kg oxaliplatin and was reached in 15-20 min from injection (figure 9A). Up to ~5h postinjection there is a slight decrease ~ 2 and ~ 4 mg/g tissue following administration of liposomally encapsulated oxaliplatin vs oxaliplatin respectively. Thereafter there is an increase in the spleen levels of total platinum after liposomally encapsulated oxaliplatin up to ~45h to ~4.5 mg/g tissue followed by a decline to ~ 2 mg/g tissue at 190h. On the contrary, there is a continuous accumulation of total platinum in the spleen following free oxaliplatin infusion that reaches 18.5 mg/g tissue at 168h (figure 9B). This is accompanied by tremendous loss in spleen weight at 7 days presumably as a result of apoptotic death of spleenocytes from the toxicity to free oxaliplatin. In fact, for a mouse of an average body weight of 150g before study the final body weight at 7 days was 109 g and the weight of the spleen was 0.188g.

There was congestion (accumulation of blood) in the spleen of animals treated with liposomally encapsulated oxaliplatin.

30

However, after about 1h the Pt levels in the kidney were higher from free oxaliplatin than liposomally encapsulated oxaliplatin treatment; they reached a minimum at 12-24h (5 mg/g tissue after oxaliplatin, 1 mg/g tissue after liposomally encapsulated oxaliplatin) and started increasing again; at 170 h postinjection kidney tissue displayed 7 mg Pt/g tissue after oxaliplatin and 2.5 mg Pt/g tissue after liposomally encapsulated oxaliplatin (Figure 5B).

35

The comparative measurements of total platinum in all rat tissues examined after liposomally encapsulated oxaliplatin or free oxaliplatin are summarized in Figure 10. Plasma levels after 15 mg/Kg oxaliplatin at 20 min from injection attained the highest level of total platinum (14.2 mg/ml) among all tissues; kidney tissue had a comparable high level at ~10 min following i.p. injection of liposomally encapsulated oxaliplatin (13.8 mg/ml) (Figure 10A). The next levels include kidney platinum after oxaliplatin and plasma after oxaliplatin. Spleen appears to be the next higher level (5 mg/g tissue after 15 mg/Kg oxaliplatin) a level that continuously increases and becomes the highest after 24h and even higher at 170h (18.5 mg/g tissue). Therefore, overall, spleen finally accumulates the highest level of platinum after oxaliplatin. In this respect the difference between platinum accumulation in spleen after free oxaliplatin or liposomally encapsulated oxaliplatin is obvious (Figure 10B).

Maximum levels of platinum (in mg Pt/ml plasma or per g tissue) in rat tissues (attained at 7-20 min) following i.p. injection of 4 drugs. (ND, not determined).

Drug & dose	Liposomally Encapsulated Oxaliplatin 15 mg/Kg	Oxaliplatin 15 mg/Kg	Lipoplatin® 30 mg/Kg	Cisplatin 5 mg/Kg
Kidney	13.7	10.5	33.2	10.2
Plasma	14.0	7.6	16.6	7.5
Liver	3.5	3.1	6.9	2.7
Spleen	3.1	5.1	3.5	1.1
Lung	3.7	3.2	7.5	2.0
Heart	1.8	1.1	4.5	0.8
Brain	ND	ND	1.7	0.3

5h

Drug & dose	Liposomally Encapsulated Oxaliplatin 15 mg/Kg estimation	Oxaliplatin 15 mg/Kg estimation	Lipoplatin 30 mg/Kg	Cisplatin 5 mg/Kg
Kidney	2.0	5.0	4.2	6.8
Plasma	0.9	1.7	2.4	1.1
Liver	2.4	1.5	6.8	2.4
Spleen	1.8	3.8	2.7	1.2
Lung	0.8	1.7	0.6	0.7
Heart	0.3	0.8	0.2	0.2
Brain	ND	ND	0.1	0.1

5-7 days

Drug & dose	Liposomally Encapsulated	Oxaliplatin 15 mg/Kg	Lipoplatin 30 mg/Kg	Cisplatin 5 mg/Kg
Oxaliplatin 15 mg/Kg				
Kidney	2.5	6.9	5.2	4.1
Plasma	0	0	0.1	0.1
Liver	2.2	1.8	3.5	1.1
Spleen	2.3	18.5	4.9	1.5
Lung	0.4	2.4	0.2	0.3
Heart	0.6	0.5	0.1	0.1
Brain	ND	ND	0.1	0

Table 4. Comparison of total platinum levels in various rat tissues after Liposomal Oxaliplatin, free Oxaliplatin, Liposomal Cisplatin, and free Cisplatin at 7-20 min, 5h and 5-7 days postinjection

Kidney, Spleen and Liver have significant Pt levels at 5-7 days post-treatment with liposomally encapsulated oxaliplatin.

Spleen Kidney Lung and Liver have significant Pt levels at 5-7 days post-treatment with free Oxaliplatin.

Kidney, Spleen and Liver have significant Pt levels at 5-7 days post-treatment with Lipoplatin®.

Kidney, Spleen and Liver have significant Pt levels at 5-7 days post-treatment with Cisplatin.

The data show that after 15 mg/Kg i.p. liposomally encapsulated oxaliplatin compared with 15 mg/Kg i.p. free Oxaliplatin:

1. the plasma levels in total platinum are 14 mg/ml plasma after liposomally encapsulated oxaliplatin,

the plasma levels in total platinum are 7.6 mg/ml plasma after Oxaliplatin

Maxima are reached in about 7-20 min from i.p. injection

This shows longer circulation of liposomally encapsulated oxaliplatin compared to Oxaliplatin

2. Levels in kidney are higher with liposomally encapsulated oxaliplatin (14 mg/g tissue) compared to free Oxaliplatin (11 mg/g) in the initial 15 min from injection but at 1.5h and thereafter levels in kidney become higher with free Oxaliplatin (6.7 mg/g tissue) compared to liposomally encapsulated oxaliplatin (2.3 mg/g) at 1.5h.

3. Levels in spleen are higher with free Oxaliplatin (3.8 mg/g tissue) compared to liposomally encapsulated oxaliplatin (1.8 mg/g) at 1.5h postinjection.

4. Levels in heart are comparable and low between the two drugs

Platinum levels in plasma: The maximum amount of total platinum in the plasma is 14 mg/ml after 15 mg/Kg i.p. liposomally encapsulated oxaliplatin compared to ~7.5 mg/ml tissue after 15 mg/Kg Oxaliplatin and is reached in 7-20 min from injection (Figure 10A). However, after about 1h, the Pt levels in the plasma become higher from free oxaliplatin than from liposomally encapsulated oxaliplatin treatment, and this is maintained throughout the rest of the curve up to 50h where the levels for liposomally encapsulated oxaliplatin become zero and up to ~100h when the levels for free Oxaliplatin become zero.

Platinum levels in kidney: The maximum amount of total platinum in the kidney is 13.5 mg/g tissue after 15 mg/Kg Lipoxal compared to ~10.5 mg/g tissue after 15 mg/Kg Oxaliplatin and is reached in 15-20 min from injection (Figure 10A). However, after about 4h the Pt levels in the kidney reach a minimum of 4.8 mg/g tissue after free oxaliplatin and slightly increase to 6.9 g/g tissue at 167h postinjection. After liposomally encapsulated oxaliplatin treatment there is also a minimum of ~1mg/g tissue total Pt in the kidney reached at ~20h postinjection that slightly increases to 2.5 mg/g tissue at 188h. Thus, kidneys display about 3 times higher levels of Pt after free oxaliplatin compared to same dose of liposomally encapsulated oxaliplatin treatment at ~7 days postinjection. Levels of Pt in kidneys are the highest among all rat tissues at 7days followed by liver and spleen.

Platinum levels in spleen: The maximum amount of total platinum in the spleen is 14 mg/g tissue after 15 mg/Kg liposomally encapsulated oxaliplatin compared to ~7 mg/g tissue after 15 mg/Kg free Oxaliplatin and is reached in 15-20 min from injection (Figure 10A). However, after about 1h the Pt levels in the kidney are higher from free oxaliplatin than liposomally encapsulated oxaliplatin treatment they show a minimum around 12-24h (5 mg/g tissue after oxaliplatin, 1 mg/g tissue after liposomally encapsulated oxaliplatin) and start increasing again; at 170 h postinjection kidney tissue displays 7 mg Pt/g tissue after

free oxaliplatin and 2.5 mg Pt/g tissue after liposomally encapsulated oxaliplatin (Figure 10A).

Drug Treatment Resulting Weight Differences and Reduction in Tissue Size

5

Animals which were treated with liposomally encapsulated oxaliplatin (15 mg/kg) and free Oxaliplatin (15 mg/kg) and were sacrificed 7.8 and 7 days after i.p. injection of the drug, exhibit some great differences in both total weight loss and weight of individual organs.

Drug	Liposomal Oxaliplatin 15 mg/kg	Oxaliplatin 15 mg/kg
Time elapsed after i.p. administration	7.8 days	7 days
Animal weight	167 gr	106 gr
Organ	Weight of total animal organ (g)	
Lung	1.059	0.934
Heart	0.604	0.523
Kidney	0.645	0.475
Spleen	0.617	0.188

- 10 Table 5. Reduction in body weight as a result of anorexia after oxaliplatin treatment. The animals treated with comparable doses of liposomal oxaliplatin exhibit less overall weight or organ weight reduction. Spleen appears to be the tissue affected the most by free oxaliplatin.
- 15 Animal treated with free Oxaliplatin, exhibit a great weight loss during the 7 days after drug administration, which is estimated to be over 40 gr of total body weight at time of treatment. Furthermore, there is a significant reduction in the size of spleen tissue, which is mirrored to an extremely high value of Pt concentration (18.5 mg Pt/g of tissue).
- 20 Loss of appetite after free Oxaliplatin administration and drug toxicity, resulted weight loss and reduction in the size of spleen; those phenomena observed at animals sacrificed 7 days after drug administration and therefore exhibited high Pt concentration values at tissue charts of free Oxaliplatin at 7 days following I.P. injection.

Same impact could be considered to be regarding other tissue, as long as Pt concentration values at all free Oxaliplatin tissue charts (Liver, Lung, Heart, Spleen, Kidney) at time point: 7 days, are exhibiting an increase.

- 5 Mice injected with 5 mg/Kg oxaliplatin died of toxicity and the dose was lowered to 4 mg/Kg. The dose of Lipoxal was 16 mg/Kg i.v. and the toxicity was lower than 4 mg/Kg oxaliplatin. The anticancer efficacy of 4 mg/Kg oxaliplatin was lower than that of 16 mg/Kg Lipoxal in animals with human tumors.

10 EXAMPLE 2B

A Phase I Clinical study

- The aim of the study was a) to estimate the adverse reactions and detect the dose limiting toxicity (DLT) as well as the maximum tolerated dose (MTD) of liposomally encapsulated oxaliplatin. Patients and methods: In total, 27 patients with advanced disease were
15 included in the study. All patients were pretreated with the standard chemotherapy according to the established guidelines. At entry to the present trial all were on recurrent or progressive disease. All patients had gastrointestinal cancers of stage IV (colorectal, gastric and pancreatic cancers). We set six different dose levels of liposomally encapsulated oxaliplatin and in each level at least 3 patients were included. The dose
20 levels were: 1) 100 mg/m² 2) 150 mg/m² 3) 200 mg/m² 4) 250 mg/m² 5) 300 mg/m² 6) 350 mg/m². Eight additional patients were treated at 300 mg/m² as an MTD. Treatment was given once weekly for three consecutive weeks repeated every 4 weeks. Results: No serious side effects were observed in the first four dose levels (100-250 mg/m²). At levels
25 5 and 6 mild myelotoxicity and nausea were seen. The most common adverse reaction was peripheral neuropathy of grade II and was observed in all 4 patients treated at 350 mg/m². We, therefore, considered DLT the 350 mg/m² level and MTD the 300 mg/m² level. Of the 27 patients, three showed partial response and 18 patients had stable disease for 4 months, median range (2-9). Conclusion: In the present Phase I study we found that the most common toxicity is peripheral neuropathy at the 300 and 350 mg/m²
30 dose levels. Liposomally encapsulated oxaliplatin is well tolerated and reduces significantly all other side effects of free oxaliplatin especially myelotoxicity and G.I. tract toxicities. These preliminary results showed adequate effectiveness in pretreated patients.

- The said study was a clinical trial with liposomally encapsulated oxaliplatin
35 (Lipoxal®) with the following primary objectives: a) to define the dose limiting toxicity (DLT) and maximum tolerated dose (MTD) of escalating doses of a weekly Lipoxal

administration, b) to detect the toxicity profile and pharmacokinetics of lipoxal monotherapy in pretreated advanced G.I. tract cancer patients. Secondary objectives were the efficacy and survival.

5 Patients and methods.

The study was a phase I cohort, dose-escalation trial of liposomally encapsulated oxaliplatin. The study protocol was reviewed and approved by our Institutional Review Board. An informed consent document satisfying all institutional requirements was read by the patients and signed as a condition of their registration.

10

Eligibility criteria

All patients were required to meet the following criteria: confirmed histologic or cytologic diagnosis of cancer, at least one bidimensionally measurable or evaluable disease, WHO performance status 0-2, a life expectancy greater than 3 months, previous treatment by standard or first-line chemotherapy and at the time of entry to have been refractory to any prior cytotoxic treatment. Patients were eligible if they had had two or three previous courses, provided that they had been off treatment for at least 3 weeks.

15

Assessment

20

Eligible patients over 18 years of age were required to have adequate hematologic, renal and hepatic functions as defined by WBC count $3.5 \times 10^9/l$, absolute neutrophil count $1.5 \times 10^9/l$, platelet count $100 \times 10^9/l$, hemoglobin level 9 g/dl, total bilirubin level 1.5 mg/dl, ALT and AST twice the upper normal limit in the absence of liver metastases or five times the upper normal limit in case of documented liver metastasis and creatinine level 1.5 mg/dl. Medical history, physical examination, assessment of vital signs, electrocardiogram, chest, and abdominal computed tomography (or ultrasound) were performed before treatment. During treatment (1 day before each course) blood count, blood urea and sugar, serum creatinine and uric acid tests, and ECG were done. CT scan assessments were done after at least eight weekly drug infusions, or earlier - on disease progression.

30

Treatment

35

Drug characteristics: Provided in 3 mg/ml, 50 ml per glass vial, 150 mg of oxaliplatin per glass vial. Store Liposomally encapsulated oxaliplatin at 4 degrees Celsius, opaque appearance. Characteristic of a Liposomal drug: Liposomally encapsulated oxaliplatin is diluted in 1 lt 5% dextrose and given at 3 hours intravenous infusion once weekly for 8 consecutive weeks. In case of side effects and in particular myelotoxicity or neurotoxicity

delay of treatment administration would take place by one week. No pre- or post hydration was needed. No other drugs such as antiemetic or anti-allergic were planned to be given prophylactically. In case of nausea or vomit, support by antiemetics (Ondasetron) or antiallergic (Dexamethasone) were to be given.

5 In animal studies that preceded 400 mg/m² to 600 mg/m² approximately was defined as the MTD. In humans we decided to start at a dose of 100 mg/m² for level one. The dosage increase was decided to be 50 mg/m² per level. In table 1 the dose escalation of liposomally encapsulated oxaliplatin per group of patients is presented.

Drug-related toxicities were evaluated during each cycle of therapy and graded according WHO criteria. A DLT was defined as any Grade 3 or 4 toxicity, with neutrophil count <500 mm³ associated with fever persisting longer than 72 hours, in 50% of the patients. Other toxicity of Grade III and in particular neurotoxicity was also considered DLT, if it was observed in at least 50% of the patients. One dose level less than that of DLT was defined as MTD. Cohorts of three patients at minimum were scheduled for entry at each dose level. Escalation of the dose to the next higher level proceeded after all three patients had received the first cycle of therapy with the preceding dose and each one was observed for at least 3 weeks without evidence of a DLT. Additional two patients were enrolled at a given dose level if the first patient of that level experienced a DLT, on the first period of 3 weeks, treatment. Treatment was discontinued with the occurrence of a DLT and the patient continued on one level below.

Pharmacokinetics

For the pharmacokinetic study patients were bled at the following hours. 0 (before drug infusion and after infusion start 2, 4, 8, 24, 48, 72, 120 (5 days) and 168 (7 days) hours. 3 ml blood was drawn into EDTA or heparin- containing tubes, then was centrifuged and refrigerated at 2°C and eventually were sent to the laboratory to be analyzed for total platinum levels. A sample of 5 patients was used. Platinum levels (total and serum ultrafiltrates) were measured with atomic absorption (Perkin Elmer AA 700 Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer at Regulon A.E.). It was at certain dose levels.... (200 mg and 300 mg/m²): the area under the plasma concentration-time curve (AUC), the C_{max} (maximum concentration of total platinum in serum). The total body clearance (Cl) was calculated from $Cl = Div/AUC$, where Div is the intravenous dose of Lipoplatin® and AUC the relative Area under curve for a specific dose. The Kel (elimination rate constant) was calculated by linear regression analysis of the logarithmic plasma concentration-time curve from the formula $Kel = [Ln(Cp1) - Ln(Cp2)] / (t2 - t1)$ where t1 and t2 are the starting and ending time points of measurements and Cp1 and Cp2 the starting and ending concentrations of total platinum in serum for t1 and t2 respectively.

The $t_{1/2}$ (elimination half-time) was calculated from the formula $t_{1/2} = 0.693 (1/K_{el})$. $1/K_{el}$ is the MRT (Mean Residence Time), the statistical moment analogy to half-life $t_{1/2}$ (Gibaldi et al. 1982). In effect, the MRT represents the time for 63.2% of the administered dose to be eliminated.

Results

Patients

The patient characteristics are shown in table 5. 27 patients were in total enrolled. Age 32-78, median age 62, male 18, female 9. P.S. 0-2. All the patients had been previously treated by chemotherapy. Previous treatments per tumor:

Toxicity

Liposomally encapsulated oxaliplatin G.I. tract toxicity was negligible. Without antiemetics (Ondasetron), nausea or mild vomit was seen. But with ondasetron no nausea vomit was observed. No diarrhea also. Mild, of grade I myelotoxicity (neutropenia) was only seen in 2 patients (%) with the highest doses given (350 mg/m²). No hepatotoxicity, no renal toxicity, no cardiotoxicity, no alopecia was seen. Mild asthenia in 3 patients was seen.

The main side effect was neurotoxicity, which was seen after at least 3 infusions of the agents and was of grade I at the 3rd and 4th level and of grade 2 at the 5th level and grade 2 in 100% of the patients at level 6th.

On the basis of these results neurotoxicity of grade III was considered as the dose limited toxicity observed in 100% of patients treated with 350 mg/m² of Liposomally encapsulated oxaliplatin. The one dose under 300 mg/m² was defined as the maximum tolerated dosis (MTD). In table 5 the liposomally encapsulated oxaliplatin dose escalation and the number of patients treated at each of the six levels is presented.

Pharmacokinetics: The results are represented in table 7 and in Figures 15 and 16. It was found that half life of oxaliplatin in plasma concentration was 24 hours and the urine excretion is integrated in 7 days.

Compliance with treatment

A total number of 104 infusions (cycles) were administered with a median of 4 cycles per patient (ranging from 2-15). The median interval between cycles was 7 days. Dose intensity was 100% of the planned. No patient happened to have a treatment delay as no hematologic toxicity of grade III or IV was detected. Only patients with dosage 350

mg/m² after the most 4 or 5 infusions (cycles) had a two weeks interval before they were classified to the lower dose of 300 mg/m². Some patients stopped treatment due to disease progression after 4-6 cycles. This was applied in 17 patients (62.9%). Twelve patients were still alive at the end of the study (44.4%). The causes of death were disease progression.

Responses to treatment

Responses were analyzed on an intention-to-treat basis. There were no complete responses. 3 patients out of 27 (11.1%) showed partial response. These patients were 2 with gastric cancer, one with pleural effusion and the other with bone metastases; the third was a patient with liver metastases from colon carcinoma. The detection of partial response was based on CT-scan for the 1st patient, with bone scan on the second patient and for the third patient with CT-scan and bilirubin serum level. Two figures are presented: fig. 1 bone scan before and after treatment for the 2nd patient and bilirubin serum level curve in the 3rd patient. Exceptionally, we treated the third patient while serum bilirubin level was 51 mg/dl, which after 2 courses the level dropped to 8 mg/dl and lasted for 5 weeks.

The duration of response was 4, 7, 2 months for each patient respectively. 18 patients showed stable disease (66.66%) with a median duration of 4 months (range 2-9 months). 5 of the patients could be classified, according to a non valid anymore, classification, to minor responses. 6 patients showed disease progression. In all the 3 responders there was also a reduction by 50% or more of the marker CA-19-9. Also, the performance status level was improved from 2 to 1 in all the 3 responders.

Conclusion

Liposomally encapsulated oxaliplatin has been tested in the present trial (example) as a monotherapy (single treatment) in patients with advanced cancer of the gastrointestinal system. All patients were pretreated by a standard treatment and all the included colorectal patients had also been treated by free oxaliplatin. This treatment with liposomally encapsulated oxaliplatin had only been tested before in preclinical studies. No other clinical trial was previously performed. The present trial was based on the data of the preclinical studies and on the experience and data of the non-liposomal (free) oxaliplatin. The last was mainly helping in focusing our present trial in estimating the similarities or differences of the liposomally encapsulated oxaliplatin versus the bare (free) oxaliplatin. G.I. tract and hematologic side effects were shown to be greatly reduced. The only side effect that remained without any difference – any reduction, was the neurotoxicity. That was seen often, increased more or less analogously with the increase

of the agent dosage and acted as the only or main criterion for defining the dose limiting toxicity. The MTD defined dosis was 300 mg/m² administered weekly. There was also an additive neurotoxicity as also it happens with non-liposomal oxaliplatin (ref.). In respect of effectiveness the 11% of response rate observed in pretreated patients refractory to previous established tumors could have some meaning for future trials in a combined chemotherapy modality. It is also important to point out that the cancer types selected for this trial are not of the most sensitive ones to chemotherapy.

This study has established an MTD and further investigation is needed in particular with other agents in combination.

As a result, this example shows that liposomal oxaliplatin is a well tolerated agent. The dosis 300 mg/m² was defined as MTD. The GI-tract and bone marrow toxicities are very much reduced compared to the bare form of oxaliplatin. The only adverse reaction that remains is the neurotoxicity which is the one that defines the DLT.

Dose level	Number of patients	Lipoxal® (mg/m ² per week)
I	3	100
II	3	150
III	5	200
IV	4	250
V	4+4	300
VI	4	350

Lipoxal		
<u>Lipoxal dose escalation</u>		
Dose level	Number of patients	Lipoxal (mg/m ² per week)
I	3	100
II	3	150
III	5	200
IV	4	250
V	4+4	300
VI	4	350

Table 6. Liposomally encapsulated oxaliplatin (Lipoxal®) dose escalation

		N	(%)
Patients total		27	(100)
Age, years			
Median	62		
Range	32-78		
Gender			
Male		18	(66.66)
Female		9	(33.33)
PS			
0		2	(7.40)
1		14	(51.85)
2		11	(40.74)
Stage			
IV		27	(100)
Primary tumor			
Colorectal		12	(44.44)
Pancreas		8	(29.62)
Stomach		4	(14.81)
Biliary		2	(7.41)
Liver		1	(3.70)
Histology			
Adenocarcinoma		27	(100)

► Stage of disease	
IV	27 (100)
► Primary tumor	
Colorectal	12 (44.44)
Pancreas	8 (29.62)
Stomach	4 (14.81)
Biliary	2 (7.41)
Liver	1 (3.70)
► Histology	
Adenocarcinoma	27 (100)
► Previous chemotherapy	

Table 7. Baseline patients' characteristics

Dose (mg/m ²)	C _{max} (µg Pt/ml)	AUC (µg Pt*h/ml)	Cl (L/h* m ²)	K _{el} (1/h)	t _{1/2} (h)	V _{ss} (L/m ²)
250	9.175	424.4	0.289	0.028	24.3	9.7
350	12.087	782.3	0.219	0.020	35.5	10.9

- 5 Table 8. Plasma pharmacokinetic parameter estimates for Lipoxal in patients (see text for definitions of parameters)

Toxicity	Dose level	Number of patients		
		grade		
		I	II	III
Nausea vomit (without)	II	2	-	-
Neurotoxicity	III	2	-	-
Neurotoxicity	IV	3	-	-
Neurotoxicity	V	2	3	-
Neurotoxicity	VI	1	2	1
Renal	All levels	-	-	-
Cardiotoxicity	All levels	-	-	-
Hepatotoxicity	All levels	-	-	-
Alopecia	All levels	-	-	-
Asthenia	All levels	-	-	-

Lipoxal

Response to treatment

- ▶ No CR was observed.
- ▶ 3 out 27 patients showed PR (11.1%)
- ▶ Two of 3 were patients with advanced gastric cancer (.....).
- ▶ One was patient with colorectal cancer – liver metastases – (jaundice).
- ▶ Response duration 4, 7, 2 months.

18 patients stable disease (66.66%)
median duration 4 months (range 2-9)

5 patients progression disease

5 References

1. De Gramont A, Vignond J, Tournigand C, et al: Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-h continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. Eur J Cancer 33: 214-219, 1997.
2. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, et al: Phase III multicentre randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first line treatment of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 18: 136-147, 2000.

3. De Gramont A, Figer A, Seymour M, et al: Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18: 2938-2947, 2000.
4. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, et al: Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18: 136-147, 2000.
5. Souglakos J, Mavroudis D, Kakolyris S, et al: Triplet combination with irinotecan plus oxaliplatin plus continuous-infusion fluorouracil and leucovorin as first-line treatment in metastatic colorectal cancer: a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 20: 2651-2657, 2002.
6. Scheithauer W, Kornek GV, Raderer M, et al: Randomized multicenter phase II trial of two different schedules of capecitabine plus oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21: 1307-1312, 2003.
7. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, et al: A randomized Controlled Trial of Fluorouracil plus Leucovorin, Irinotecan, and Oxaliplatin combinations in Patients with Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 22: 23-30, 2004.
8. Sorbye H, Glimelius B, Berglund A, et al: Multicenter Phase II study of Nordic Fluorouracil and Folinic Acid Bolus Schedule Combined with Oxaliplatin as First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 22: 31-38, 2004.
9. Cassidy J, Misset JL: Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Semin Oncol* 29 (Suppl 15), 11-20, 2002.
10. Cassidy J, Misset JL: Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Semin Oncol* 29 (Suppl 15), 11-20, 2002.
11. Jerremalm E, Eksborg S, Ehrsson H: Hydrolysis of oxaliplatin-evaluation of the acid dissociation constant for the oxalato monodentate complex. *J Pharm Sci* 92: 436-8, 2003.
12. Spingler B, Whittington Da, Lippard SJ: 2.4 crystal structure of an oxaliplatin 1,2-d (GpG) intrastrand cross-link in a DNA dodecamer duplex. *Inorg Chem* 40: 5596-602, 2001.
13. Arnould S, Hennebelle I, Canal P, Bugat R, Guichard S: Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur J Cancer* 39: 112-9, 2003.
14. De Vita F, Orditura M, Matano E, Bianco R, Carlomagno C, Infusino S, Damiano V, Simeone E, Diadema MR, Lieto E, Castellano P, Pepe S, De Placido S, Galizia G, Di Martino N, Ciardiello F, Catalano G, Bianco AR. A phase II study of biweekly oxaliplatin plus infusional 5-fluorouracil and folinic acid (FOLFOX-4) as first-line treatment of advanced gastric cancer patients. *Br J Cancer* May 9, 92 (9): 1644-1649, 2005.

15. Lersch C, Schmelz R, Eckel F, Erdmann J, Mayr M, Schulte-Frohlinde E, Quasthoff S, Grosskreutz J, Adelsberger H: Prevention of oxaliplatin-induced peripheral sensory neuropathy by carbamazepine in patients with advanced colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer 2: 54-8, 2002.

5 **CRF Lipoxal**

200 mg/m² weekly

Name (or code) of Participant: --Psa.Ath.

Type of cancer: stomach, Stage: IV

10 **Before Lipoxal Treatment**

BONE MARROW FUNCTION

HEMOGLOBIN (gr/dl) 13.0

LEUKOCYTES (1,000/mm³) 3.7

PLATELETS (1,000/mm³) 207

15 **RENAL FUNCTION**

BLOOD UREA (mg%) 22

CREATININE (mg%) 0.4

URIC ACID (mg%) 4.3

20 **7 Days after 4th Lipoxal infusion**

DATE blood was drawn for biochemical examination 2/11/2004

ONE MARROW FUNCTION

25 HEMOGLOBIN (gr/dl) 12.3

LEUKOCYTES (1,000/mm³) 7.1

PLATELETS (1,000/mm³) 315

RENAL FUNCTION

30 BLOOD UREA (mg%)... 15

CREATININE (mg%)..... 0.5

URIC ACID (mg%) 4.1

7 Days after 9th Lipoxal infusion

35 **ONE MARROW FUNCTION**

HEMOGLOBIN (gr/dl) 9.8

LEUKOCYTES (1,000/mm³) 2.6

PLATELETS (1,000/mm³) 277

40 **RENAL FUNCTION**

BLOOD UREA (mg%)... 17

CREATININE (mg%)..... 0.40

URIC ACID (mg%) 3.5

45 **7 Days after 12th Lipoxal infusion**

BONE MARROW FUNCTIONHEMOGLOBIN (*gr/dl*) 8.6LEUKOCYTES (1,000/mm³) ...3.05 PLATELETS (1,000/mm³) ...236**RENAL FUNCTION**BLOOD UREA (*mg%*).....18CREATININE (*mg%*).....0.4110 URIC ACID (*mg%*).....3.7**7 Days after 16th Lipoxal infusion****B****BONE MARROW FUNCTION**HEMOGLOBIN (*gr/dl*) 11.115 LEUKOCYTES (1,000/mm³) ...6.1PLATELETS (1,000/mm³) 263**RENAL FUNCTION**BLOOD UREA (*mg%*).....2920 CREATININE (*mg%*).....0.51URIC ACID (*mg%*) 4.825 **EXAMPLE III****LIPOSOMAL CISPLATIN COMBINED WITH GEMCITABINE IN PRETREATED ADVANCED PANCREATIC CANCER PATIENTS: A PHASE I-II STUDY**

Purpose: The presently described trial is a phase I-II study based on a new liposomally encapsulated cisplatin (produced under the brand Lipoplatin® by regulon Inc. of Mountain View, CA). Previous preclinical and clinical data (Phase I pharmacokinetics) led to the investigation of a combined treatment modality involving Lipoplatin® and gemcitabine.

35 Patients and Methods: The gemcitabine dose was kept standard at 1000 mg/m² and the lipoplatin dose was escalated from 25 mg/m² to 125 mg/m². The treatment was administered to advanced pretreated pancreatic cancer patients who were refractory to previous chemotherapy which included gemcitabine.

Results: Lipoplatin® at 125 mg/m² was defined as dose limiting (DLT) toxicity and 100 mg/m² as the maximum tolerated dose (MTD) in combination with 1000 mg/m² of
40 gemcitabine. Preliminary objective response rate data showed a partial response in 2/24 patients (8.3%), disease stability in 14 patients (58.3%) for a median duration of 3 months (range 2-7 months) and clinical benefit in 8 patients (33.3%).

Conclusion: Liposomally encapsulated cisplatin is a non-toxic alternative agent to bare cisplatin. In combination with gemcitabine, it has a MTD of 100 mg/m² and shows promising efficacy in refractory pancreatic cancer.

Cisplatin, (cis-PtCl₂(NH₃)₂) is used world-wide for the treatment of testicular and ovarian cancer as well as for bladder, head, neck, lung and gastrointestinal tumors and many others. 1-7 Although very effective against these tumors, cisplatin has been associated with severe side effects including nephrotoxicity, 8 ototoxicity, neurotoxicity, nausea and vomiting. 7-9 Carboplatin, a cisplatin analogue, is markedly less toxic to the kidneys and nervous system than cisplatin and causes less nausea and vomiting, while generally (and certainly for ovarian cancer and non-small-cell lung cancer) retaining equivalent antitumor activity. However, hematological adverse effects are more frequent with carboplatin than with cisplatin (10,11).

Gemcitabine (under the brand Gemzar®, Eli Lilly, Indianapolis, IN), a nucleoside analogue, is administered in combination with cisplatin as first-line treatment of patients with inoperable, locally advanced (stage IIIA or IIIB) or metastatic (stage IV) non-small-cell lung cancer and as front-line treatment for patients with locally advanced (non-resectable stage III) or metastatic (stage IIIB, IV) adenocarcinoma of the pancreas. 12-14 The main adverse reaction is myelotoxicity. The advantage of using combinations of gemcitabine with platinum has been attributed to the inhibition of the DNA synthetic pathways involved in the repair of platinum-DNA adducts. Gemcitabine and cisplatin act synergistically, increasing platinum-DNA adduct formation and inducing concentration and combination-dependent changes in ribonucleotide and deoxyribonucleotide pools in ovarian cancer cell lines (15).

Previous studies on Lipoplatin® (Regulon Inc., Mountain View, CA) showed: a low toxicity profile, an ability to concentrate in tumors and to escape immune cells and macrophages, a slow clearance rate from the kidneys, long circulation properties in body fluids, a half-life of 36 h in the blood, and promising therapeutic efficacy. 16 In the present Phase I-II study we attempted to explore the therapeutic efficacy and toxicity profile of the lipoplatin-gemcitabine combination, given every 14 days in advanced stage pretreated pancreatic cancer patients. Our primary objectives were to determine toxicity and the maximum tolerated dose (MTD) and our secondary aims, to determine the response rate and clinical benefit.

47

PATIENTS AND METHODS

Patients >18 years of age with histologically or cytologically confirmed adenocarcinoma of the pancreas and bidimensionally measurable disease, who had undergone chemotherapy pretreatment and had recurrent or non responsive disease, were enrolled in the study. Other eligibility criteria included a World Health Organization (WHO) performance status (PS) of 0-2, life expectancy of at least 3 months, adequate bone marrow reserves (granulocyte count $\geq 1,500/\text{dl}$, platelet count $\geq 120,000/\text{dl}$) normal renal (serum creatine concentration $< 1.2 \text{ mg/dl}$) and liver function tests (total serum bilirubin concentration, $< 3 \text{ mg/dl}$, provided that serum transaminases and serum proteins were normal), normal cardiac function with no history of clinically unstable angina pectoris or myocardial infarction, or congestive heart failure within the 6 months prior, and no central nervous system involvement. Prior surgery was allowed provided that it had taken place at least 3 weeks before. Patients with active infection, malnutrition or a second primary tumor (except for a non-melanoma skin epithelioma or in situ cervix carcinoma) were excluded from the study. All patients gave their written informed consent to participate in the study.

TREATMENT PLAN

The plan was to combine Lipoplatin® with gemcitabine. Lipoplatin®, supplied by Regulon Inc., was administered as an 8 h i.v. infusion on days 1 and 15; 8 hours was chosen in order to be able to control possible adverse effects on the basis of our experience in the phase I trial. Gemcitabine was given as a 60 min i.v. infusion in 500 ml normal saline on days 1 and 15 at a dose of 1000 mg/m^2 and cycles were repeated every 4 weeks (28 days). The infusions on days 1 and 15 were considered to be 1 cycle. Provided that patients had recovered sufficiently from the drug-related side effects, standard ondansetron antiemetic treatment was to be administered to all patients. Prophylactic administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) was not allowed. In cases of grade 3 neutropenia, these patients would receive subsequent infusions of pegfilgrastim 6 mg, on the 6th or 7th day and treatment would be postponed for one week. Treatment was administered for at least three cycles or until disease progression. The study was a phase I/II cohort, dose escalation trial of Lipoplatin® and gemcitabine. Its aims were to determine the dose limiting toxicity (DLT) of the combination and to define the maximum tolerated dose (MTD) as a recommended dose for phase II and to collect preliminary data on the efficacy of the drug in pretreated patients with pancreatic cancer. Myelotoxicity with Lipoplatin® as a single agent was considered very mild in a previous phase I study. We started with a low dose of Lipoplatin®, combined with gemcitabine which is a myelotoxic agent, mainly to determine

the extent of bone marrow adverse reaction. The starting dose of Lipoplatin® was 25 mg/m² and increased by 25 mg/m² per dose level (Table 1). The protocol was approved by the Ethical and Scientific Committee of the hospital.

- 5 Dose adjustment criteria were based on hematological parameters. In cases of grade 3 or 4 febrile neutropenia, subsequent cycles were repeated with pegfilgrastim prophylactic administration, as described above. In cases of febrile neutropenia or grade 3 or 4 neutropenia, despite the administration of rhG-CSF, gemcitabine and Lipoplatin doses were reduced by 25% in the following treatment infusion. In cases of grade 3 or 4
10 thrombocytopenia lasting for > 5 days, the doses of both drugs were also reduced by 25%. Toxicities were graded according to WHO guidelines.

PATIENT EVALUATION

- Pretreatment evaluation included complete medical history and physical examination, full
15 blood cell count including differential leukocyte and platelet counts, a standard biochemical profile (and creatinine clearance when necessary), serum carcinoembryonic antigen (CEA), and CA 19-9 determinations, electrocardiogram, chest X-rays, ultrasound of the upper abdomen, and computed tomography (CT) scans of the chest, upper and lower abdomen. Additional imaging studies were performed upon clinical indication. Full
20 blood counts with differential were performed weekly; in case of grade 3 or 4 neutropenia or grade 4 thrombocytopenia, full blood counts with differential were evaluated daily until the absolute granulocyte count was > 1,000/dl and the platelet count > 75,000/dl. A detailed medical and physical examination was completed before each course of treatment in order to document symptoms of the disease and treatment toxicities.
25 Biochemical tests, ECG, serum CEA and CA 19-9 determinations, and chest X-rays were performed every 6 weeks and a neurologic evaluation was performed by clinical examination. Lesions were measured after each cycle if they were assessable by physical examination or by chest X-rays; lesions assessable by ultrasound or CT scans were evaluated after three chemotherapy cycles.

30

DEFINITION OF RESPONSE

- Complete response (CR) was defined as the disappearance of all measurable or evaluable disease, signs and symptoms and biochemical changes related to the tumor for at least 4 weeks, during which time no new lesions may appear. Partial response (PR)
35 was defined as > 50% reduction in the sum of the products of the perpendicular diameters of all measurable lesions compared with pretreatment measurements, lasting for at least 4 weeks, during which time no new lesions may appear and no existing lesions may

enlarge. For hepatic lesions, a reduction of > 30% in the sum of the measured distances from the costal margin at the midclavicular line and at the xiphoid process to the edge of the liver, was required. Stable disease (SD) was defined as <50% reduction and a < 25% increase in the sum of the products of the two perpendicular diameters of all measured lesions and the appearance of no new lesions for 8 weeks. Progressive disease (PD) was defined as an increase in the product of the two perpendicular diameters of any measurable lesion by > 25% over the size present at entry into the study, or, for patients who responded, the size at the time of maximum regression and the appearance of new areas of malignant disease. Bilirubin increase without recovery after endoscopic retrograde cholecho-pancreatography (ERCP) or stent set was considered as disease progression. A two-step deterioration in performance status, a > 10% loss of pretreatment weight or increasing symptoms did not by themselves constitute progression of the disease; however, the appearance of these complaints was followed by a new evaluation of the extent of the disease. All responses had to be maintained for at least 4 weeks and be confirmed by an independent panel of radiologists.

RESULTS

Patient demographics

From January 2003 until December 2004, 24 patients (11 male, 13 female; median age 66 years, range 47-80 years) were enrolled in the study. The patients' characteristics are shown in Table 2. WHO performance status was 0 in 4.2% of the patients, 1 in 45.8% and 2 in 50%. The great majority of the patients were stage IV (79.2%). All patients had undergone prior chemotherapy: eleven patients with gemcitabine as a single agent treatment and 13 with gemcitabine combined with irinotecan.

Dose intensity

The patients received 36 courses (108 infusions every two weeks) and the median number of courses was 2 (range 1-5). Of the 24 patients, 10 patients completed 3 courses. There was no dose reduction for either drug and the patients received 99.5% of the planned dose intensity (range 93-100%) of each drug up to the fourth dosage level.

30

Toxicity

No neurotoxicity or renal toxicity was observed. Temporary abdominal pain which lasted for 2-4 minutes, and which righted itself, was observed in 10/24 patients at the beginning of the Lipoplatin® infusion. Grade 3 myelotoxicity was observed in 2 out of 4 patients at the fifth dosage level. No febrile neutropenia was seen. Toxicity is shown in Tables 3 and 4. The level five dosage (125 mg/m² of lipoplatin and 1000 mg/m² of gemcitabine) was

considered as DLT and dosage level 4 as the MTD. Four additional patients were treated at the fourth dosage level.

Response to treatment

5 The determination of measurable response on computed tomography was performed by two independent radiologists and two experienced oncologists. No complete responses were detected. PR was achieved in 2 patients (8.3%) with durations of 6 and 5 months. Stable disease was seen in 14 patients (58.3%) with a median duration of 3 months (range 2-7 months). Clinical benefit mainly due to pain reduction was seen in 8 patients (33.3%). At the end of the study 7 patients (29.2%) were still alive. Median survival from the beginning of second-line treatment was 4 months (range 2-8+ months).

Conclusion

This new liposomally encapsulated cisplatin (Lipoplatin®) aims mainly at the avoidance of renal toxicity, which is often seen in cisplatin administration, while at the same time producing similar efficacy. The pharmacokinetics of Lipoplatin® are different from cisplatin, as has been shown in animal studies as well as in a clinical trial in patients. 15 The lack of toxicity is a major advantage, which was shown when Lipoplatin® was administered as a single agent. In the present phase I-II trial, toxicity and efficacy were studied by administering Lipoplatin® in combination with gemcitabine, an agent whose toxicity is well defined, particularly when combined with other agents. 5 The cisplatin-gemcitabine combination has been similarly used as treatment in non-small-cell lung cancer, urothelial and pancreatic cancer. 5,7,12 It seems that the data from the present trial indicate the advantage of very low toxicity. The every-two-week administration of the combination is very well tolerated up to the dose of 100 mg/m² of Lipoplatin® when 25 gemcitabine is maintained at a standard dose of 1000 mg/m². At the dose of 125 mg/m² of Lipoplatin®, myelotoxicity reached grades 3 and 4 and therefore this dosage was considered as DLT. The 100 mg/m² of Lipoplatin® and 1 gr/m² of gemcitabine were considered as the MTD. The combination achieved an objective response in 8.33% of the patients, disease stability in 58.3% and pain relief in 33.3%. Taking into account that all of 30 the patients were refractory or in disease progression while on a prior treatment including gemcitabine, the response rate produced here should be attributed to the addition of Lipoplatin®.

Liposomally encapsulated cisplatin combined with gemcitabine administered every two 35 weeks in advanced pretreated pancreatic cancer patients, has a MTD of 100 mg/m² and 1000 mg/m², respectively. It is a well tolerated treatment with promising signs of efficacy.

REFERENCES

1. Rosenberg B: Platinum complexes for the treatment of cancer: why the search goes on, In Lippert B (ed): Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Zurich, Verlag Helvetica Chimica Acta, 1999, pp 3
- 5 2. Sorenson C, Eastman A: Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. Cancer Res. 48: 4484-4488, 1988
3. Einhorn LH, Williams SD, Loehrer PJ, et al: Evaluation of optimal duration of chemotherapy in favorable prognosis disseminated germ cell tumors: a Southeastern Cancer Study group protocol. J Clin Oncol 7(3): 387-91, 1989
- 10 4. Aabo K, Adams M, Adnitt P, et al: Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analysis of individual patient data from 37 randomized trials. Br J Cancer 78:1479-87, 1998
- 15 5. Kaufman D, Raghavan D, Carducci M, et al: Phase II trial of gemcitabine plus cisplatin in patients with metastatic urothelial cancer. J Clin Oncol 18(9): 1921-7, 2000
6. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, et al: Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. Lancet 355: 949-955, 2000
- 20 7. Non-Small-Cell Lung Cancer Collaborative Group: Chemotherapy in non-small-cell lung cancer, a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomized clinical trials. Br Med J 311:899-909, 1995
8. Hayes D, Cvitkovic E, Golfey R, et al: High dose cis-platinum diaminedichloride: amelioration of renal toxicity by mannitol diuresis. Cancer 39(4):1372-8, 1977
- 25 9. Gandara DR, Nahhas NA, Adelson MD, et al: Randomized placebo-controlled multicenter evaluation of diethyldithiocarbamate for chemoprotection against cisplatin-induced toxicities. J Clin Oncol 13:490-496, 1995
10. Sculier JP, Lafitte JJ, Lecomte J, et al: European Lung Cancer Working Party: A three-arm phase III randomized trial comparing combinations of platinum derivatives ifosfamide and/or gemcitabine in stage IV non-small-cell lung cancer. Ann Oncol 13:874-882, 2002
- 30 11. Tognoni A, Pensa F, Vaira F, et al: A dose finding study of carboplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer. J Chemother 14:296-300, 2002
12. Burris HA 3rd, Moore MJ, Anderson J, et al: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. J Clin Oncol 15:2403-2413, 1997
- 35

13. Heinemann V, Wilke H, Mergenthaler HG, et al: Gemcitabine and cisplatin in the treatment of advanced and metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol* 11:1399-1403, 2000.
14. Stathopoulos GP, Rigatos SK, Dimopoulos MA et al: Treatment of pancreatic cancer with a combination of irinotecan (CPT-11) and gemcitabine: A multicenter phase II study of the Greek Cooperative Group for Pancreatic Cancer. *Ann Oncol* 14:388-394, 2003
15. Van Moorsel CJ, Smid K, Voorn DA, et al: Effect of gemcitabine and cis-platinum combinations on ribonucleotide and deoxyribonucleotide pools in ovarian cancer cell lines. *Int J Oncol* 22:201-207, 2003
16. Stathopoulos GP, Boulikas T, Vougiouka M, et al: Pharmacokinetics and adverse reactions of a new liposomal cisplatin (Lipoplatin): Phase I study. *Oncology Reports* 13: 589-595, 2005.
17. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A: (WHO) Reporting results of cancer treatment. *Cancer*, 47(1): 207-214, 1981

Dose level	No. of patients	Lipoplatin (mg/m ² per week)	Gemcitabine (mg/m ² per week)
First	4	25	1000
Second	4	50	1000
Third	4	75	1000
Fourth	4+4	100	1000
Fifth	4	125	1000

Table 1. Lipoplatin® and Gemcitabine Dose Escalation Dose Level No. of Patients
Lipoplatin® Gemcitabine (mg/m² per wk) (mg/m² per wk) First 4 25 1000, Second 4 50
1000, Third 4 75 1000, Fourth 4+4 100 1000, Fifth 4 125 1000.

	No.	%
No. of patients enrolled	24	100
Age (years)		
Median	66	
Range	47-80	
Gender		
Male	11	45.8
Female	13	54.2
Performance status (WHO)		
0	1	4.2
1	11	45.8
2	12	50.0

		50	
Disease stage			20.8
III		5	
IV		19	79.2
Histology			
Well-differentiated		3	12.5
Moderately differentiated		12	50.0
Low differentiation		9	37.5
Previous treatment			
Gemcitabine 1 mg/m ²	Days 1, 8, 15/ every 4 weeks	11	45.8
Gemcitabine 900 mg/m ² + Irinotecan 300 mg/m ²	Days 1, 8/ every 3 weeks	13	54.2

Table 2. Patients' Characteristics at Baseline No % No. of patients enrolled: 24 100 Age (yr) Median 66 Range 47-80 Gender Male 11 45.8 Female 13 54.2 Performance Status (WHO) 0 14.2 1 11 45.8 2 12 50.0 Disease Stage III 5 20.8 IV 19 79.2 Histology Well-differentiated 3 12.5 Moderately differentiated 12 50.0 Low differentiation 9 37.5 Previous treatment Gemcitabine 1 gr/m² days 1, 8, 15/ every 4 weeks 11 45.8 Gemcitabine 900 mg/m² + days 1, 8/ every 3 weeks + 13 54.2 Irinotecan 300 mg/m² day 8/ every 3 weeks

10

Dose level	Lipo platin mg/m ²	Gemcitabine mg/m ²	Toxicity no. of pts	Maximum Toxicity (grade)	Toxicity type
First	25	1000	-	-	-
Second	50	1000	-	-	-
Third	75	1000	-	-	-
Fourth	100	1000	2/4*	2-3	Neutropenia
Fifth	125	1000	2/4	3-4	Neutropenia
*Original 4 patients					

Table 3. Hematological Toxicity by Dose Level Lipoplatin® Gemcitabine Toxicity Maximum Toxicity mg/m²mg/m² No. of Pts Toxicity (grade) Type First 25 1000---Second 50 1000---Third 75 1000---Fourth 100 1000 2/4* 2-3 Neutropenia Fifth 125 1000 2/4 3-4 Neutropenia* original 4 patients

15

	Grade 1 n (%)	Grade 2 n (%)	Grade 2 n (%)	Grade 4 n (%)
Nausea	5 (20.8)	-	-	-
Vomiting	2 (8.3)	-	-	-
Alopecia	14 (58.3)	-	-	-
Fatigue	8 (33.3)	-	-	-
Diarrhea	2 (8.3)	-	-	-
Cardiotoxicity	-	-	-	-
Neurotoxicity	3 (12.5)	-	-	-
Nephrotoxicity	-	-	-	-
Thrombotic episodes	4 (16.7)	-	-	-

Table 4. Non-Hematologic Toxicity Dosage Grade 1 Grade 2 Grade 3 Grade 4 Leveln (%)
 n (%) n (%) n (%)) Nausea 5 (20.8)—Vomiting 2 (8.3)—Alopecia 14 (58.3)—Fatigue 8
 (33.3)—Diarrhea 2 (8.3)—Cardiotoxicity—Neurotoxicity 3 (12.5)—Nephrotoxicity—
 5 Thrombotic episodes 4 (16.7)—

CLAIMS:

1. A method for forming a micelle comprising oxaliplatin, the method comprising combining an effective amount of oxaliplatin and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid with a solvent.
2. A method according to claim 1 wherein the solvent is ethanol and is present at 20 to 40%.
3. A method according to claim 1 or 2 wherein the negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG), dimyristoyl phosphatidyl glycerol (DMPG), diaproyl phosphatidyl glycerol (DCPG), distearoyl phosphatidyl glycerol (DSPG) or dioleoyl phosphatidyl glycerol (DOPG).
4. A method according to claim 3 wherein the negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is DPPG.
5. A method according to a preceding claim wherein the molar ratio of oxaliplatin to negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is 1:1 to 2:1.
6. A method for encapsulating oxaliplatin into a liposome comprising combining an oxaliplatin micelle as defined in any of claims 1 to 5 with a preformed liposome or lipids.
7. A method according to claim 6 wherein the preformed liposome or lipids comprise negatively and/or positively charged lipids.
8. A method according to claim 7 wherein lipids are phospholipids or derivatives thereof.
9. A method according to claim 8 wherein the lipid is DDAB, dimethyldioctadecyl ammonium bromide; DMRIE: N-[1-(2,3-dimyristyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-(2-hydroxyethyl) ammonium bromide; DMTAP: 1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonium propane; DOGS: Dioctadecylamidoglycylspermine; DOTAP: N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride; DOTMA: N-[1-(2,3-dioleoyloxy)

propyl]-n,n,n-trimethylammonium chloride; DPTAP: 1,2- dipalmitoyl-3-trimethylammonium propane or DSTAP: 1,2-disteroyl-3-trimethylammonium propane.

10. A method according to claim 7 wherein the liposome comprises one or more of cholesterol, phosphatidyl choline, phosphatidylethanolamine, hydrogenated soy phosphatidylcholine or ceramidine.

11. A method according to claim 10 wherein the preformed liposome further comprise an ammonium salt.

12. A method for encapsulating oxaliplatin into a liposome comprising the following steps:

- e) forming a micelle comprising oxaliplatin by combining an effective amount of oxaliplatin and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid with a solvent and
- f) combining said oxaliplatin micelle with a preformed liposome or lipids.

13. A method according to claim 12 wherein the solvent is ethanol and is present at 20 to 40%.

14. A method according to claim 12 or 13 wherein the negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is DPPG, DMPG, DCPG, DSPG or DOPG.

15. A method according to claim 14 wherein the negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is DPPG.

16. A method according to any of claims 12 to 15 wherein the molar ratio of oxaliplatin to negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is 1:1 to 1:2.

17. A method according any of claims 6 to 16 further comprising coating the surface of the liposome membrane with a polymer.

18. A method according to claim 17 wherein a ligand is conjugated to the polymer.

19. A method according to claim 18 wherein the ligand is capable of directing the liposome to a specific cell type with surface receptors recognized by the ligand.

20. A method according to claim 18 or claim 19 wherein the ligand is a peptide.
21. A method according to claim 19 wherein the ligand is selected from epidermal growth factor or an epitope thereof, endostatin, antithrombin, anastellin, angiostatin, PEX or pigment epithelial-derived factor
22. A method according a preceding claim further comprising including another antitumour drug in the micelle or liposome.
23. A method according to claim 22 wherein the drug selected from cisplatin, paclitaxel, SN-38, docetaxel, irrinotecan, 5-fluorodeoxyuridine or doxorubicin.
24. A micelle obtained by the method of claims 1 to 5.
25. A micelle comprising an effective amount of oxaliplatin and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid.
26. A micelle according to claim 25 wherein the phosphatidyl glycerol lipid is DPPG.
27. A micelle according to any of claims 25 to 26 further comprising another anticancer drug.
29. A micelle according to claim 27 wherein the drug selected from cisplatin, paclitaxel, SN-38, docetaxel, irrinotecan, 5-fluorodeoxyuridine or doxorubicin.
29. A liposome comprising oxaliplatin obtained by the method of any of claims 6 to 23.
30. A liposome comprising an effective amount of oxaliplatin wherein the inner and outer layer of the liposome comprise different lipids.
31. A liposome according to claim 30 comprising a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid.
32. A micelle according to claim 31 wherein the phosphatidyl glycerol lipid is DPPG.

58

33. A liposome according to claim 32 further comprising one or more of cholesterol, phosphatidyl choline, phosphatidylethanolamine, hydrogenated soy phosphatidylcholine, ceramide.

34. A liposome according to any of claims 30 to 33 wherein the surface of the liposome is coated with a coating which allows the liposome to evade immune surveillance.

35. A liposome according to claim 34 wherein the coating is a polymer.

36. A liposome according to claim 35 wherein the polymer is PEG.

37. A liposome according to claim 35 or claim 36 wherein a ligand is conjugated to the polymer.

38. A liposome according to claim 37 wherein the ligand is capable of directing the liposome to a specific cell type with surface receptors recognized by the ligand.

39. A liposome according to claim 37 or claim 38 wherein the ligand is a peptide.

40. A liposome according to claim 37 wherein the ligand is selected from epidermal growth factor or an epitope thereof, endostatin, antithrombin, anastellin, angiostatin, PEX or pigment epithelial-derived factor.

41. A liposome according to any of claims 28 to 40 wherein the liposome has a particle size of 80-120nm.

42. A liposome according to claims 28 to 38 further comprising an effective amount of another anticancer drug characterised in that oxaliplatin and the other drug are encapsulated in the same liposome.

43. A liposome according to claim 39 wherein the anticancer drug selected from cisplatin, docetaxel, paclitaxel, gemcitabine, navelbine, doxorubicin, irrinotecan, SN-38, gemcitabine or 5-fluorodeoxyuridine.

44. A liposome according to claims 28 to 38 further comprising an effective amount of an anticancer gene characterised in that oxaliplatin and the other drug are encapsulated in the same liposome.

45. A liposome according to claim 44 wherein the anticancer gene is p53, IL-2, IL-12, angiostatin, and oncostatin.

44. A liposome according to any of claims 27 to 45 for use as a cancer medicament.

46. The use of a liposome according to any of claims 27 to 45 in the manufacture of a medicament for the treatment of cancer.

47. A method of treating cancer comprising administering a liposome as defined in any of claims 27 to 45.

48. The use or method according to claims 46 or 47 wherein the liposome is administered weekly or biweekly by intravenous infusion 3 hour and oxaliplatin is present at a dosage of 100 to 350mg/m².

49. The use or method according to claims 48 wherein the dosage is 100, 150, 200, 250 or 300mg/m².

50. The use or method according to claim 49 wherein the dosage is 300mg/m².

51. The use or method according to claims 48 to 50 wherein infusion is for 3 hours infusion once a week.

52. The use or method according to claims 48 to 51 wherein administration is in 2 to 4 cycles, each cycle lasting about 8 weeks and followed one week rest between cycles.

53. The use or method according to claims 48 to 51 wherein the cancer is selected from colorectal cancer, gastric, pancreatic, bladder, breast cancer, colorectal, gastric, oesophageal, pancreatic, urothelial, non-small cell lung, breast, prostate, head & neck, melanoma, testicular or ovarian cancer.

60

57

54. The use or method according to claim 53 wherein the cancer is colorectal, gastric or pancreatic cancer.

55. A liposome comprising an effective amount of oxaliplatin and another anticancer drug or an anticancer gene drug and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid.

56. A combination therapy comprising administering a liposome encapsulating effective amount of oxaliplatin and encapsulating another anticancer drug or an anticancer gene drug.

57. A liposome according to claim 55 or 56 wherein the drug selected from cisplatin, paclitaxel, SN-38, docetaxel, irinotecan, 5-fluorodeoxyuridine or doxorubicin.

58. A combination therapy comprising administering an effective amount of gemcitabine and a liposome encapsulating an effective amount of cisplatin.

60. A combination therapy according to claim 58 wherein gemcitabine does not form part of the cisplatin liposome.

61. A combination therapy according to claim 58 or 60 wherein gemcitabine is administered at the same time as the cisplatin liposome.

62. A combination therapy according to claim 58 or 60 wherein gemcitabine is administered at a different time than the cisplatin liposome.

63. A combination therapy according to any of claims 58 to 62 wherein the cancer is pancreatic cancer, colorectal cancer, gastric cancer, breast cancer, non-small cell lung cancer, ovarian cancer, head and neck cancer, prostate cancer, testicular, intestinal cancer, bladder, oesophageal or urothelial cancer.

64. A combination therapy according to any of claims 58 to 63 wherein gemcitabine is administered at a dosage of 800 to 1000mg/m².

65. A combination therapy according claim 64 wherein gemcitabine is administered by intravenous infusion at a dosage 1000mg/m².

66. A combination therapy according claim 64 or 65 wherein gemcitabine is administered as a 60 min iv infusion every two weeks.

67. A combination therapy according to any of claims 58 to 66 wherein the cisplatin liposome is administered by intravenous infusion at a dosage of 100 to 125 mg/m².

68. A combination therapy according to claim 67 wherein the cisplatin liposome is administered as an 8 hour IV infusion every two weeks.

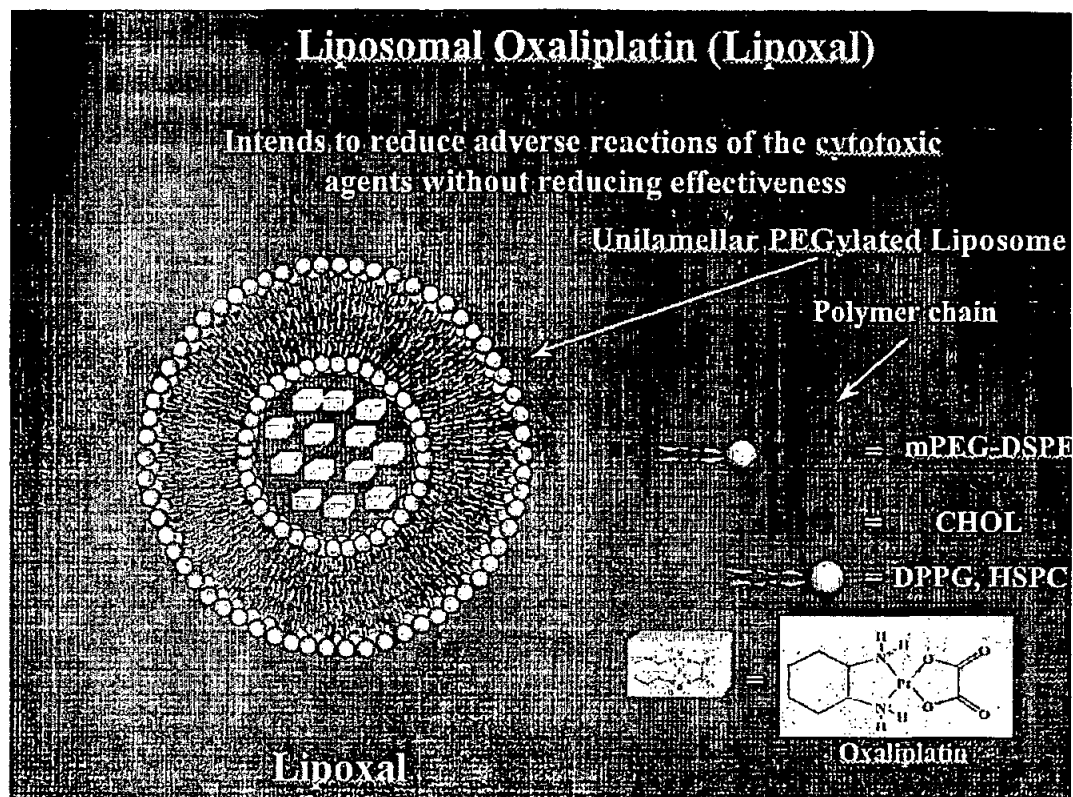
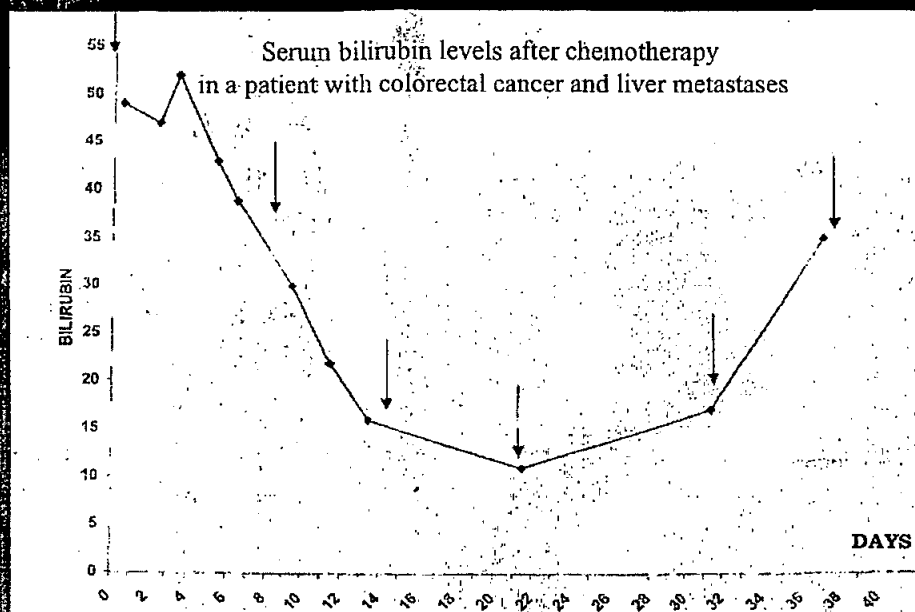


Figure 1

Lipoxal



Bilirubin curve (of responder)

Figure 2

64

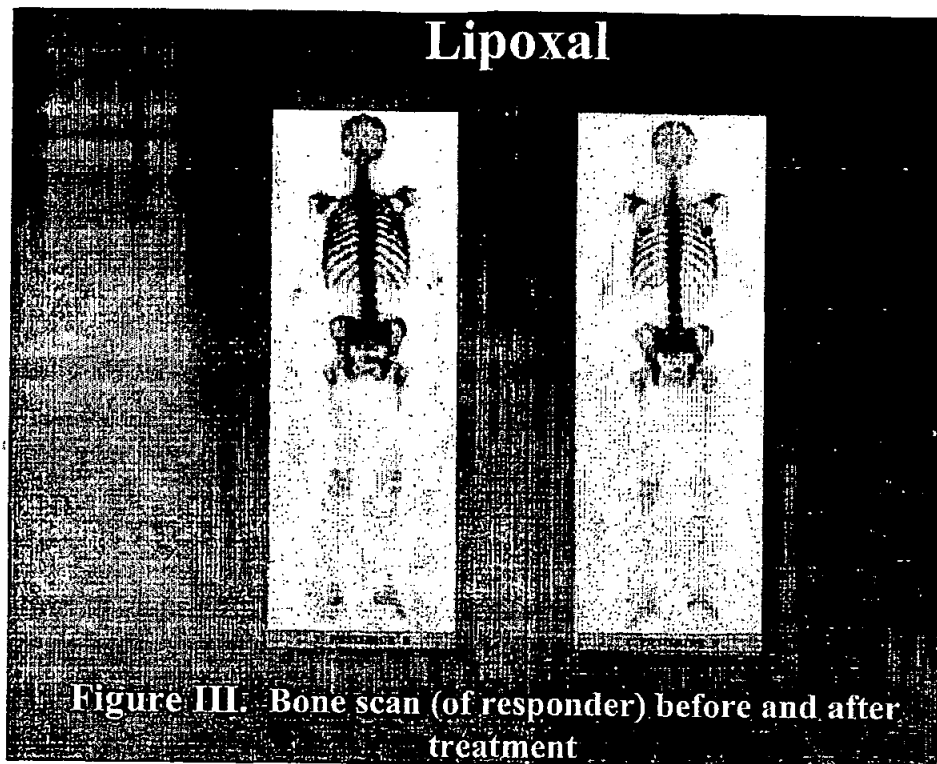


Figure 3

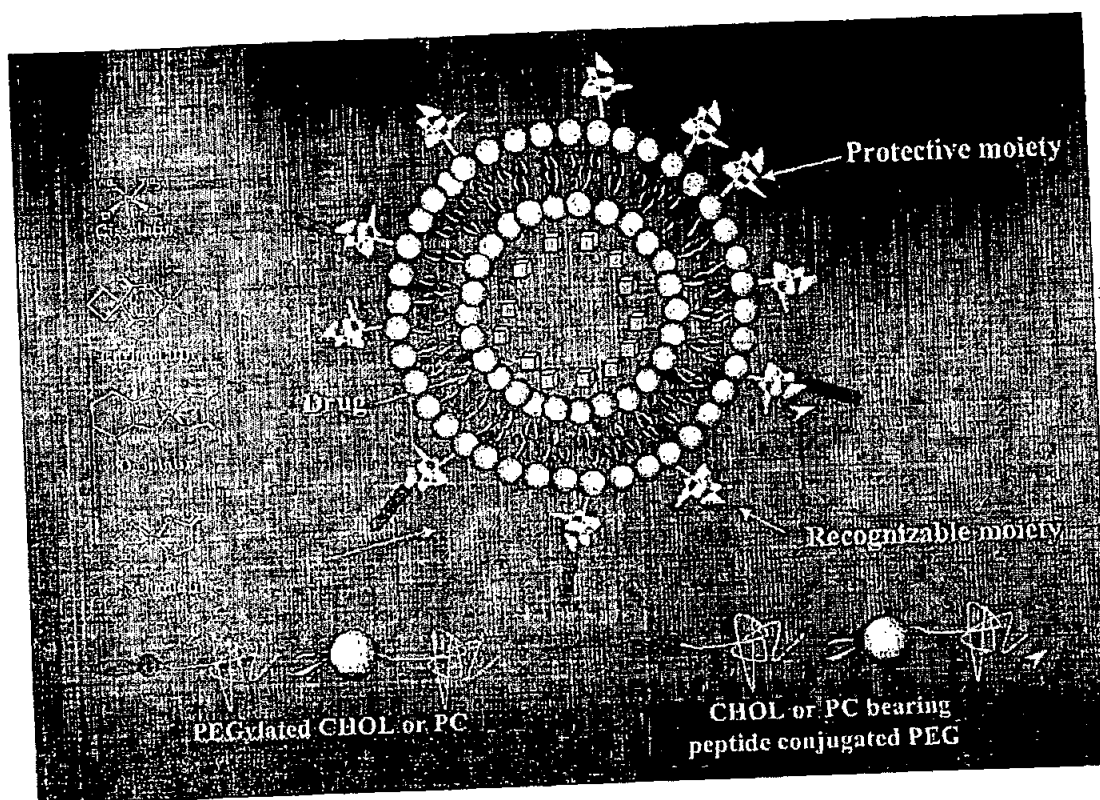


Figure 4

5/18

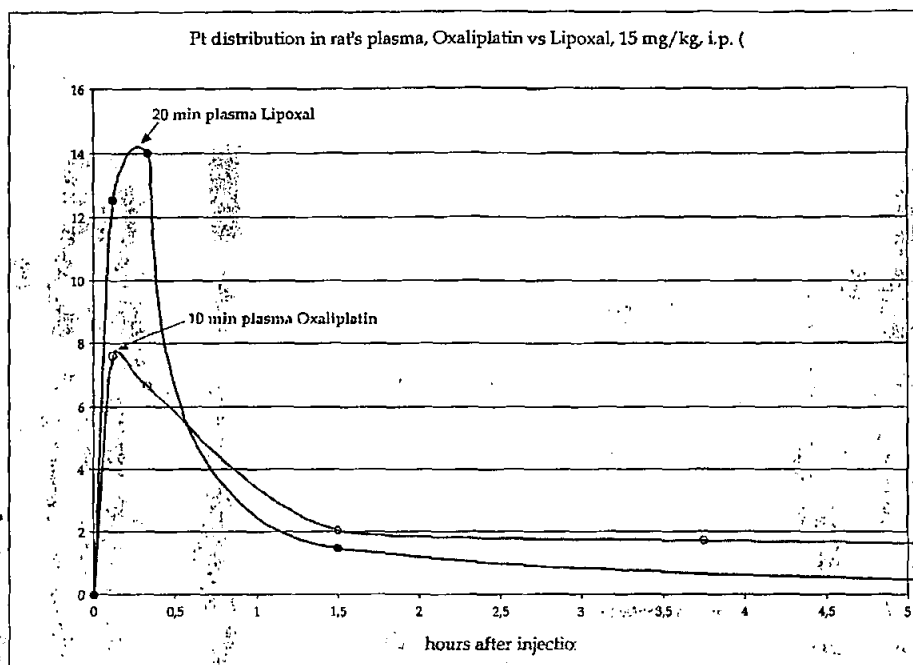


Figure 5A

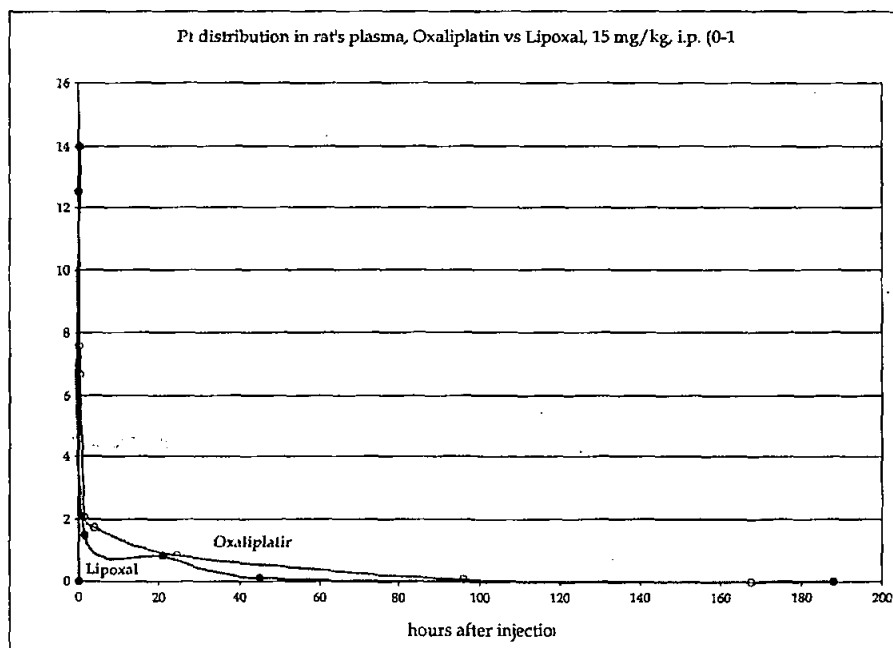


Figure 5B

6/18

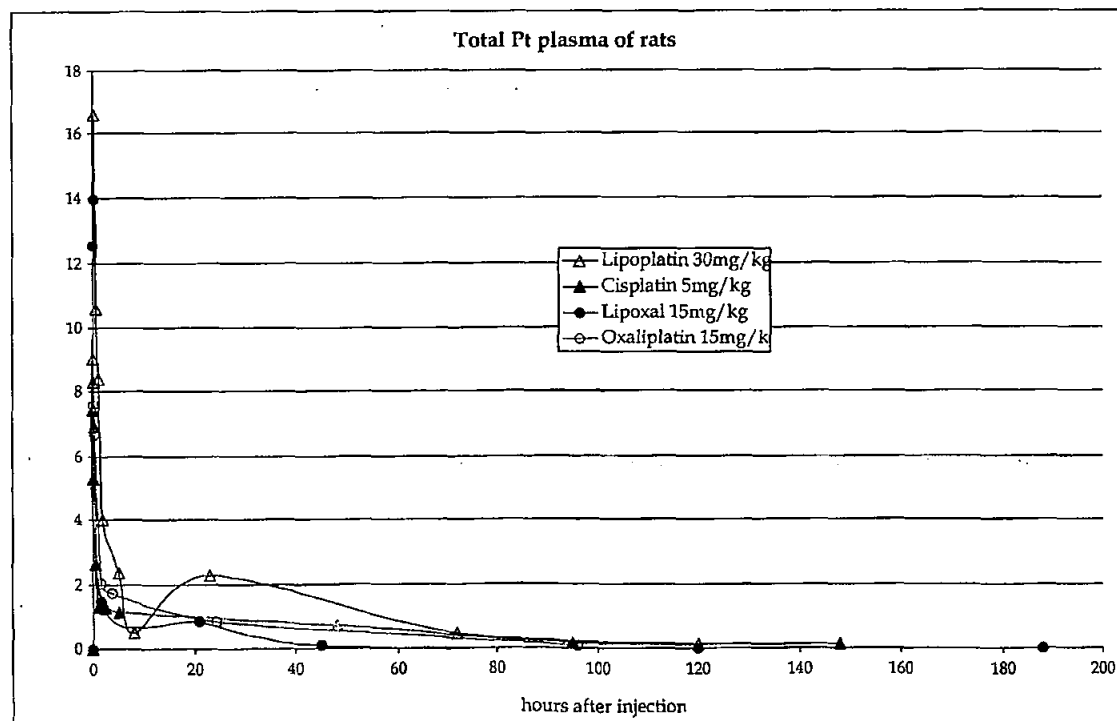
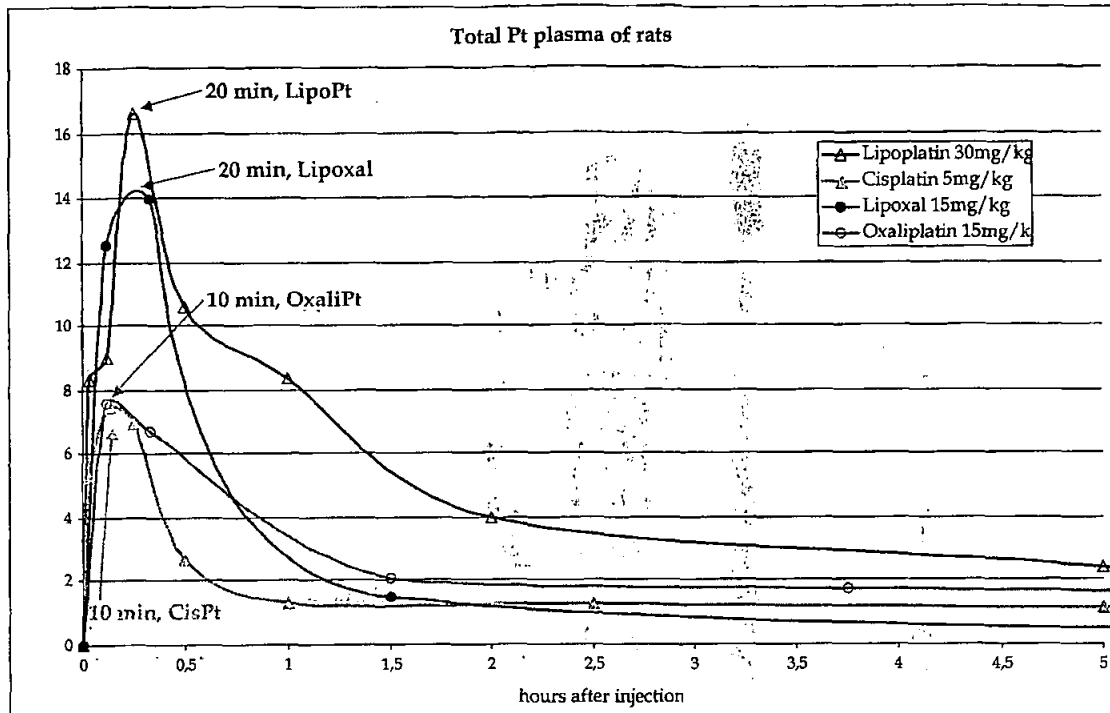


Figure 6

7/18

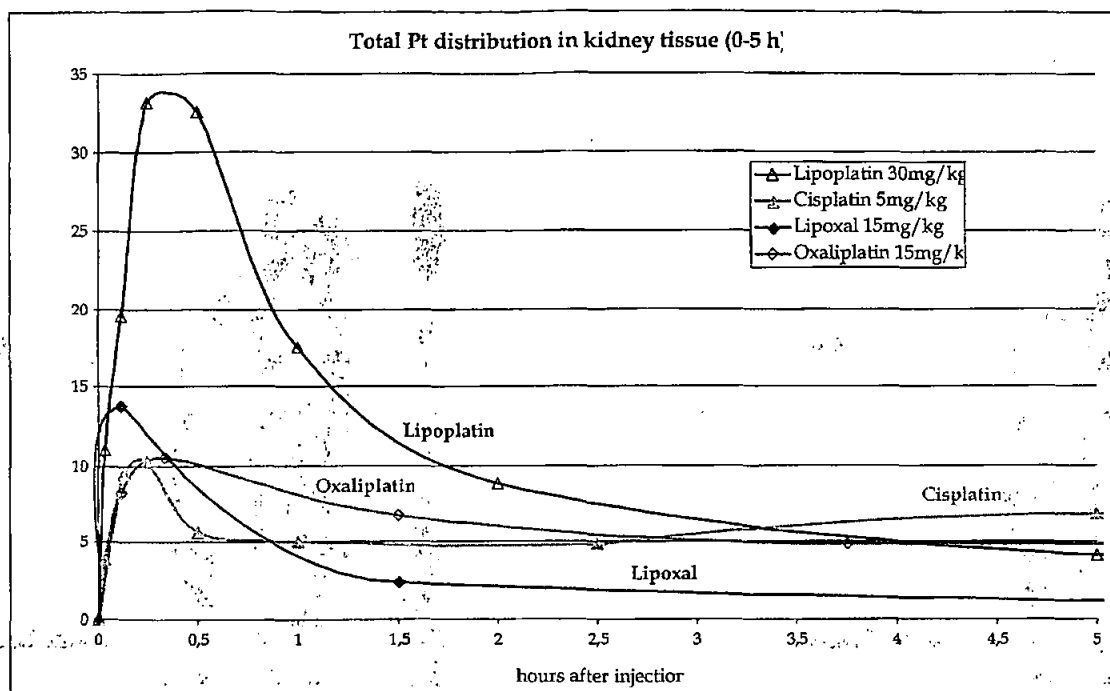


Figure 7 A

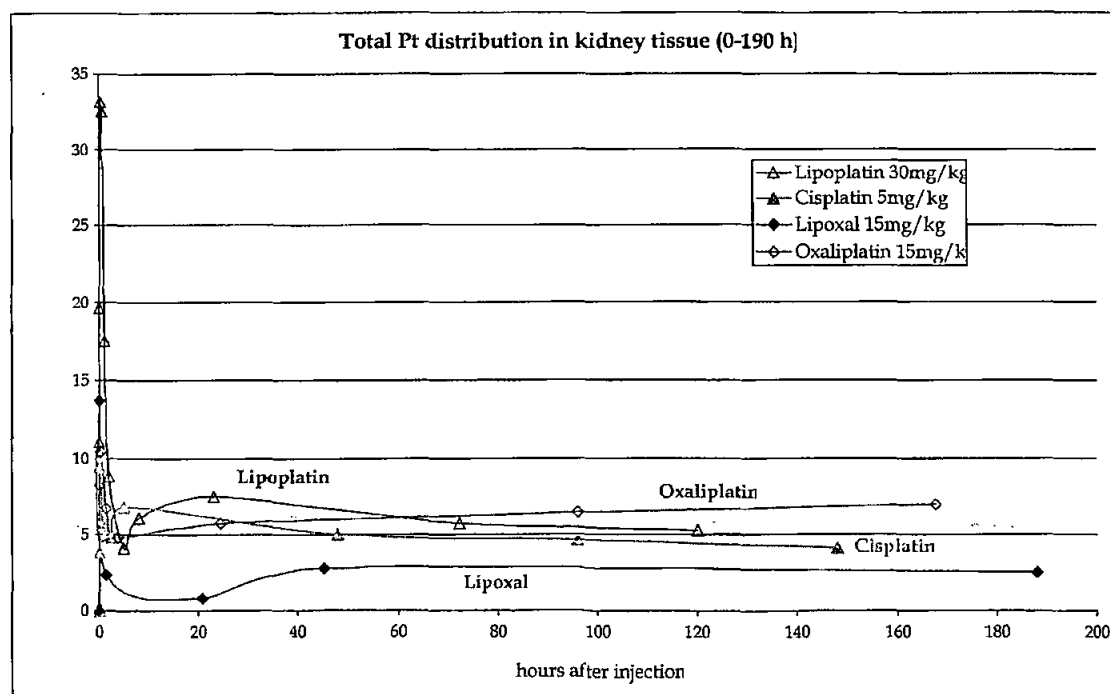


Figure 7B

8/18

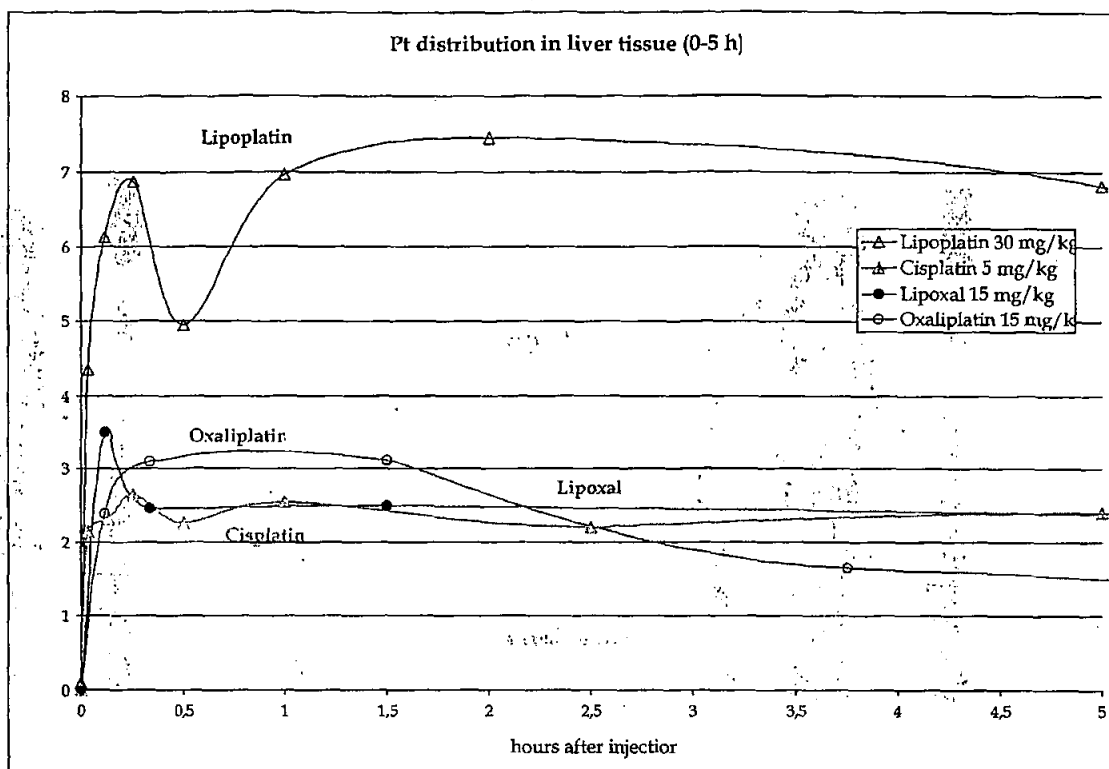


Figure 8A

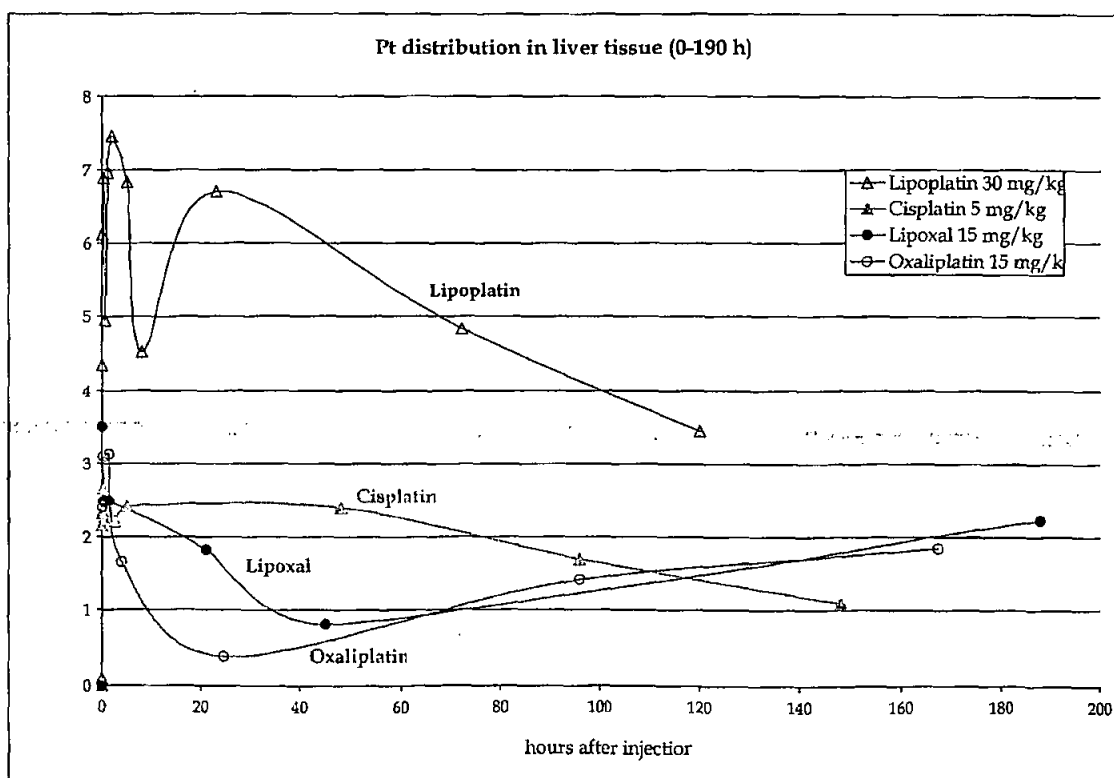


Figure 8B

Total platinum in liver

9/18

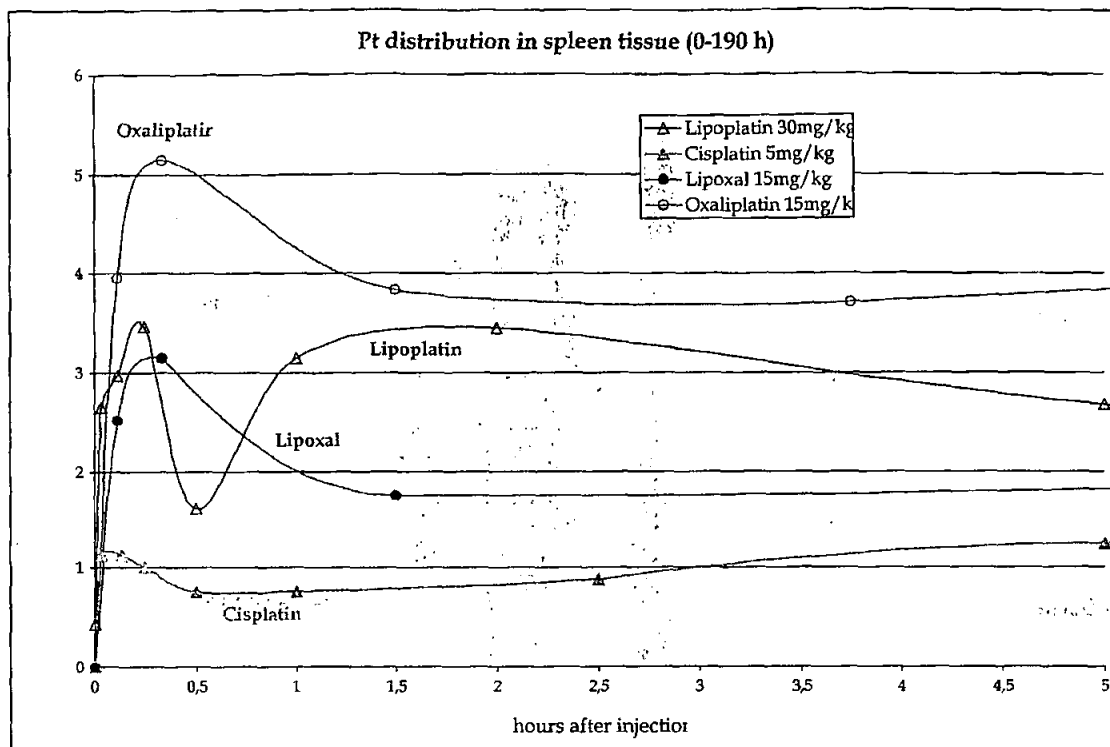


Figure 9A

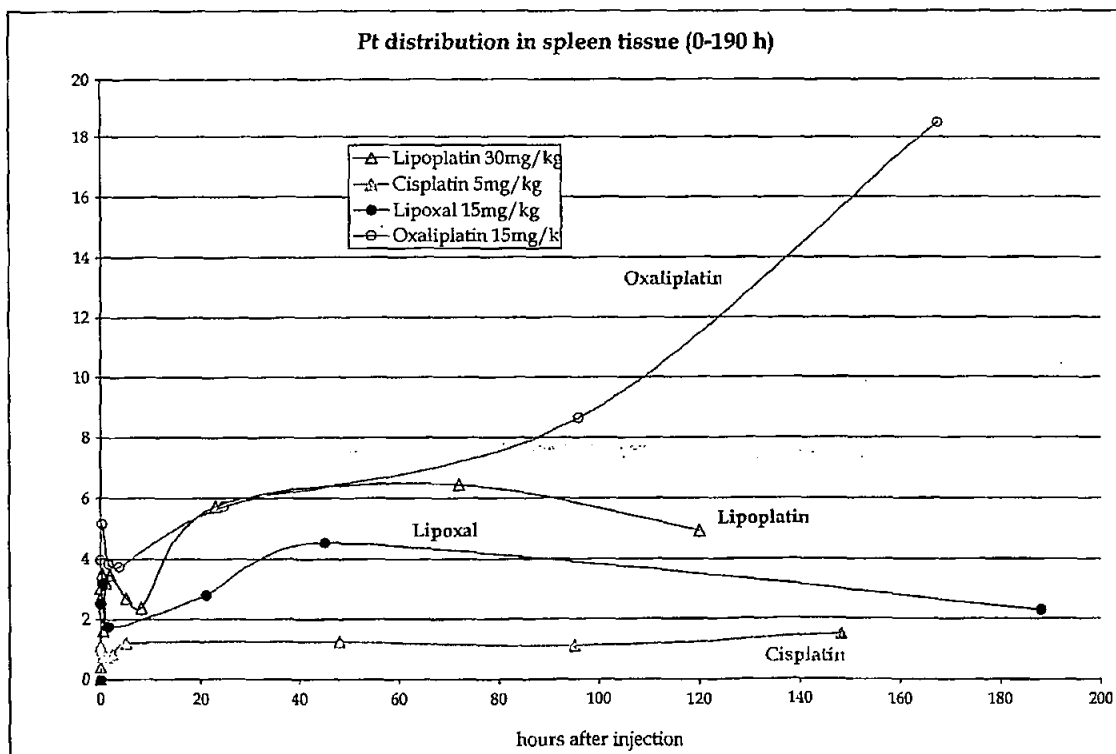


Figure 9B

10/18

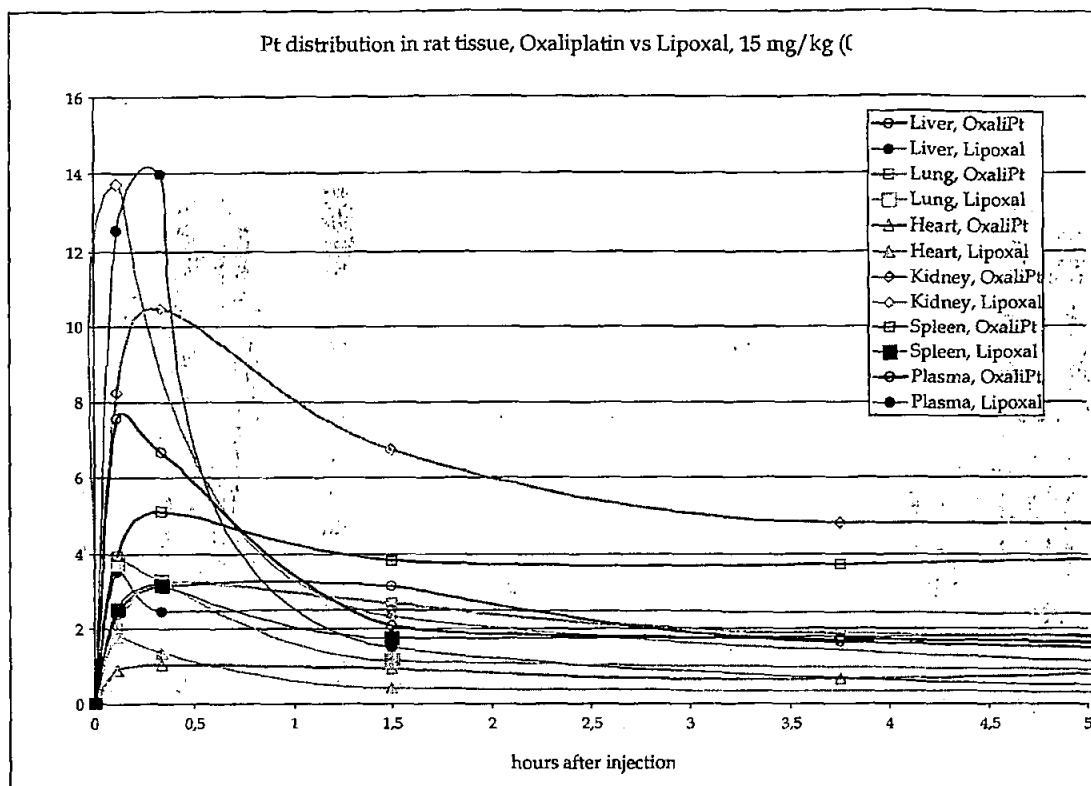


Figure 10A

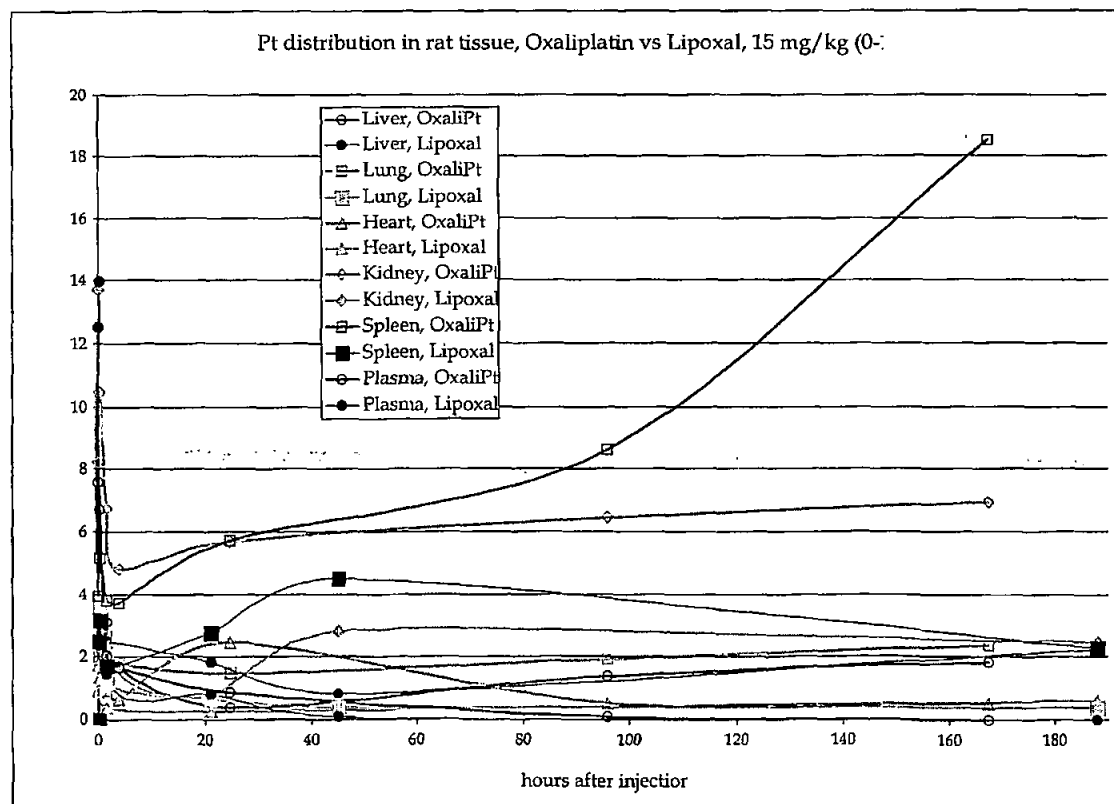


Figure 10B

11/18

CHARTS OF RATS TREATED REPEATEDLY WITH liposomally encapsulated oxaliplatin

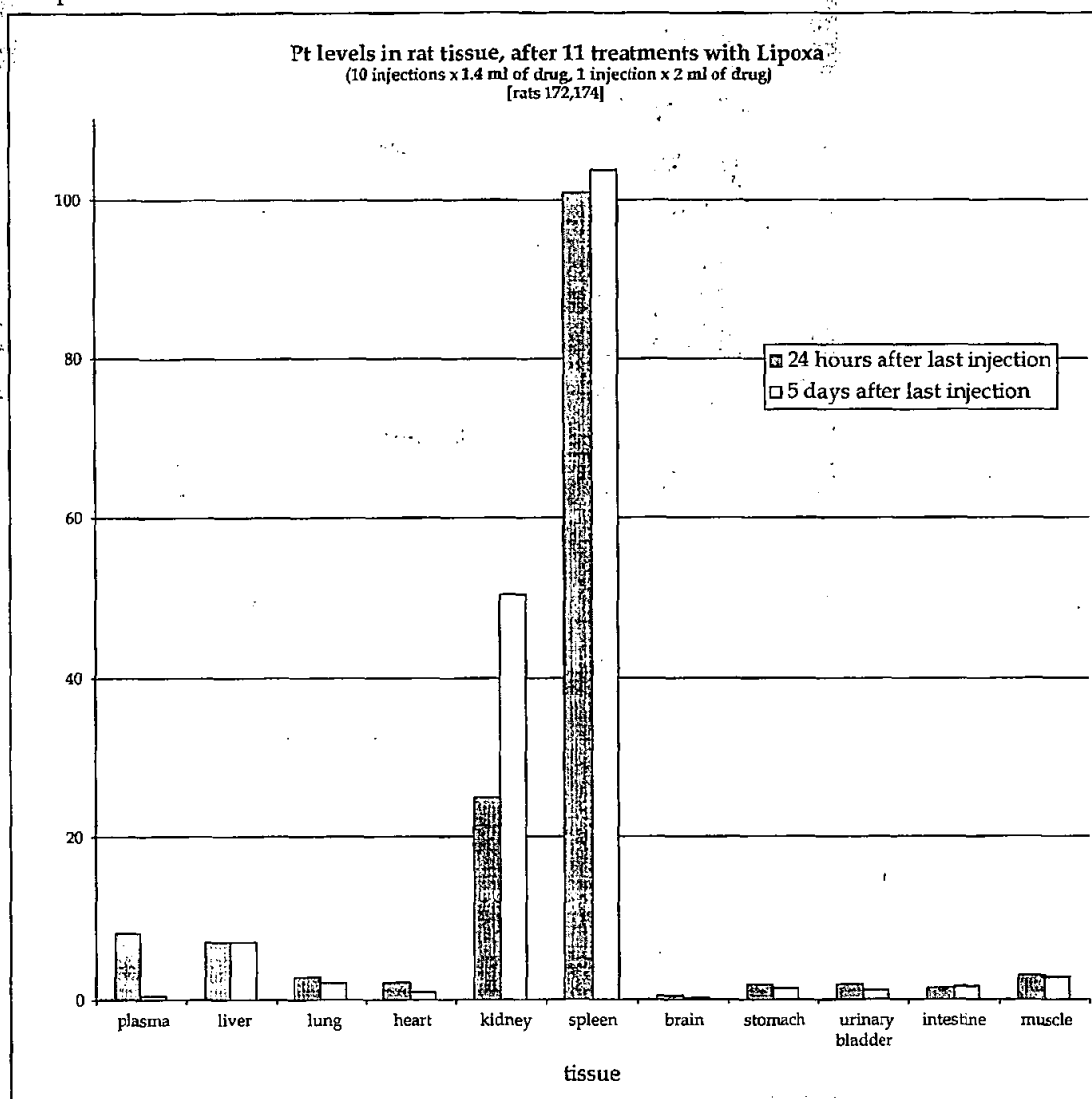


Figure 11A

12/18

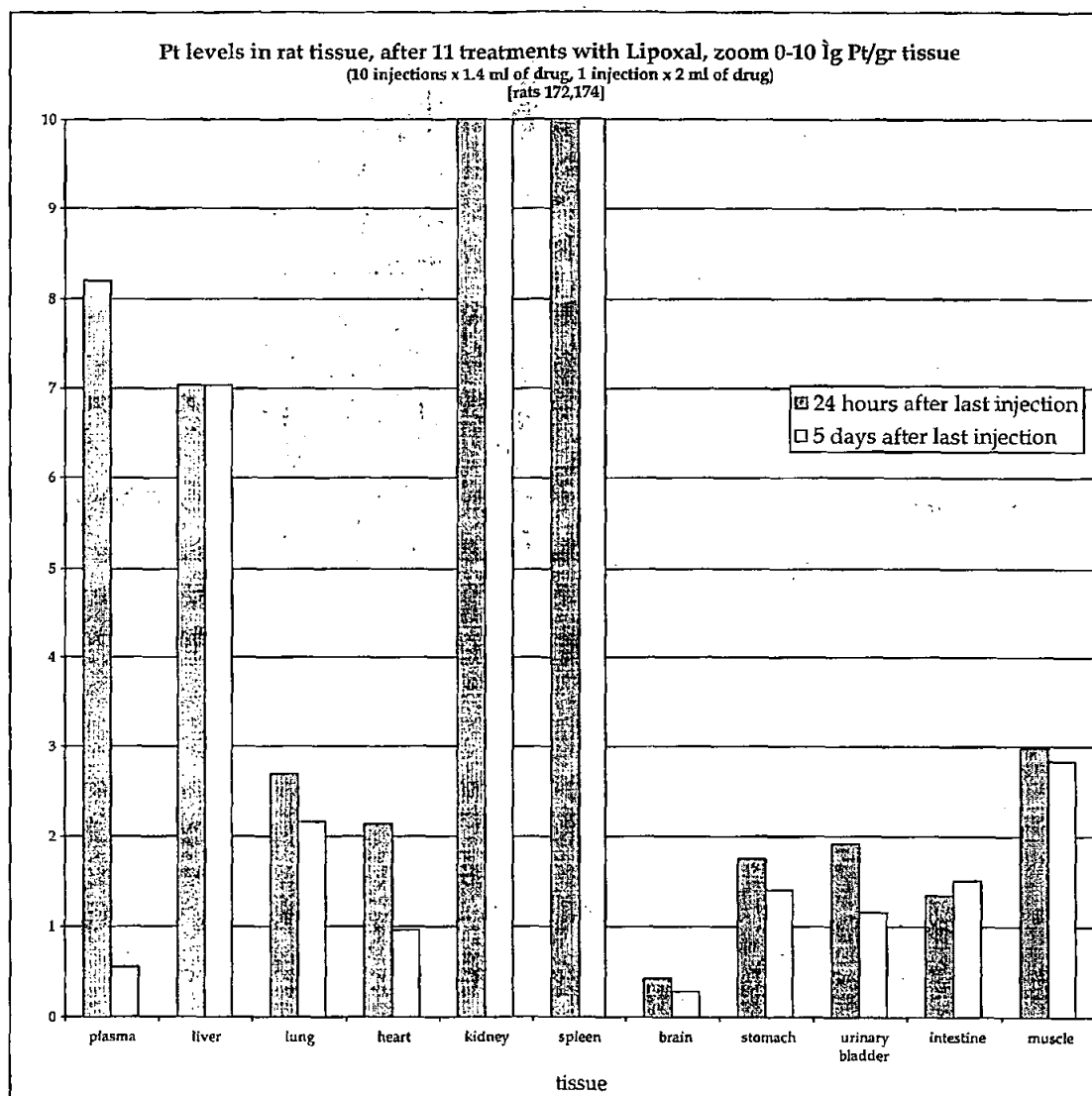


Figure 11B

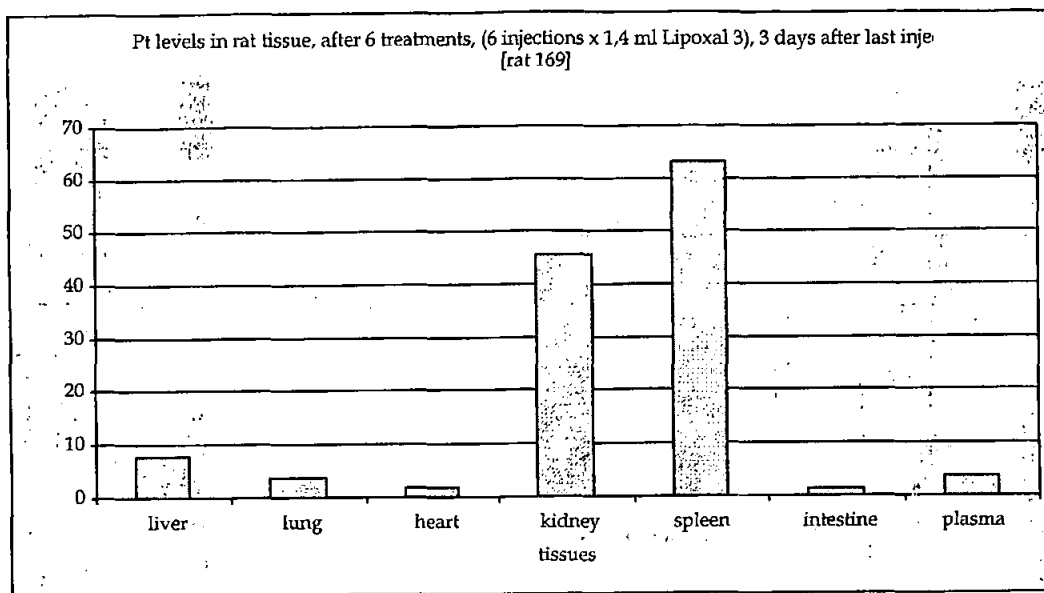


Figure 12

14/18

Lipoxal treatment of *nude* mice with human MX-1 breast tumor xenografts

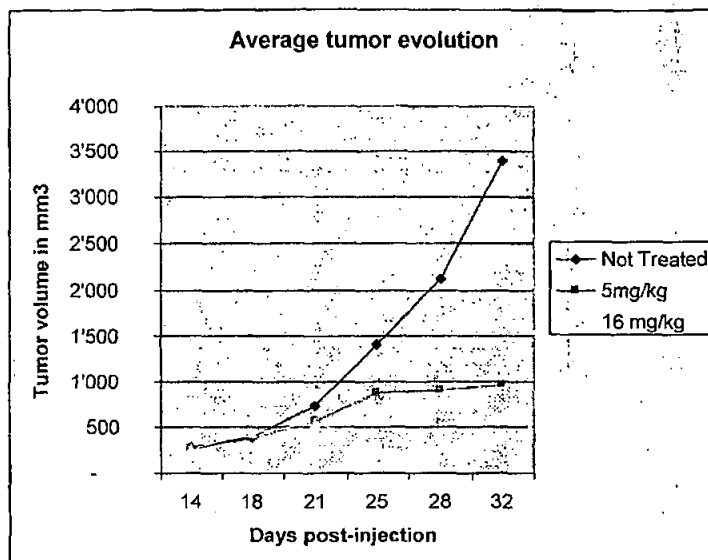


Figure 13

15/18

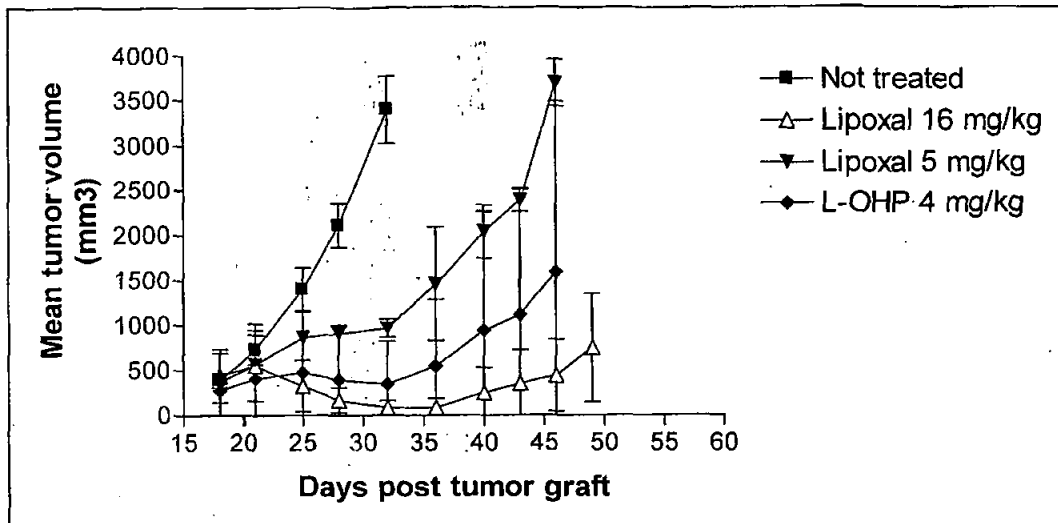
Lipoxal: *Nude mice/human MX-1 xenografts*

Figure 14

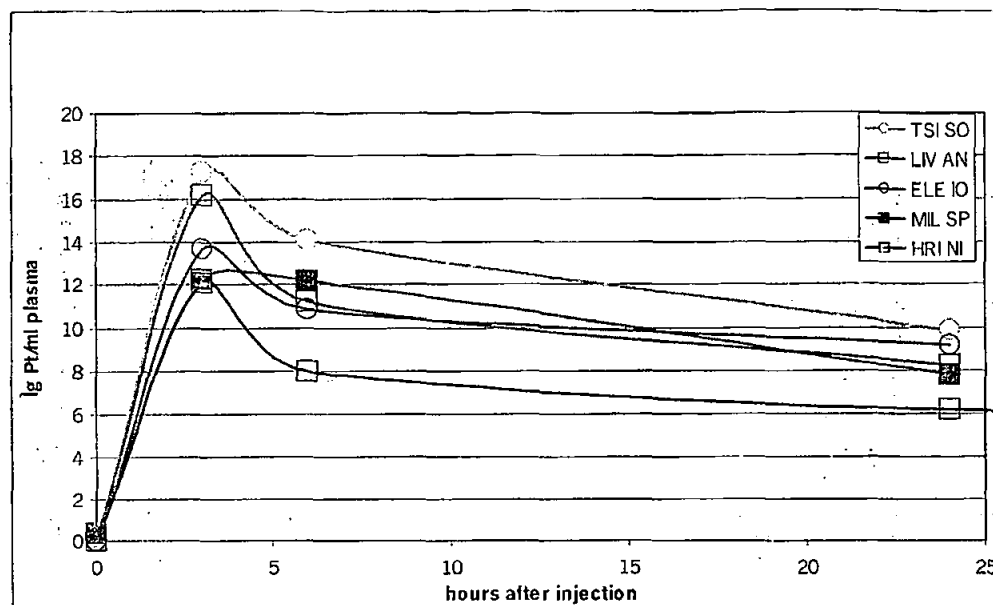


Figure 15

Pt levels during liposomally encapsulated oxaliplatin () chemotherapy (0-25 Hours)
liposomally encapsulated oxaliplatin dose: 350 mg/m²

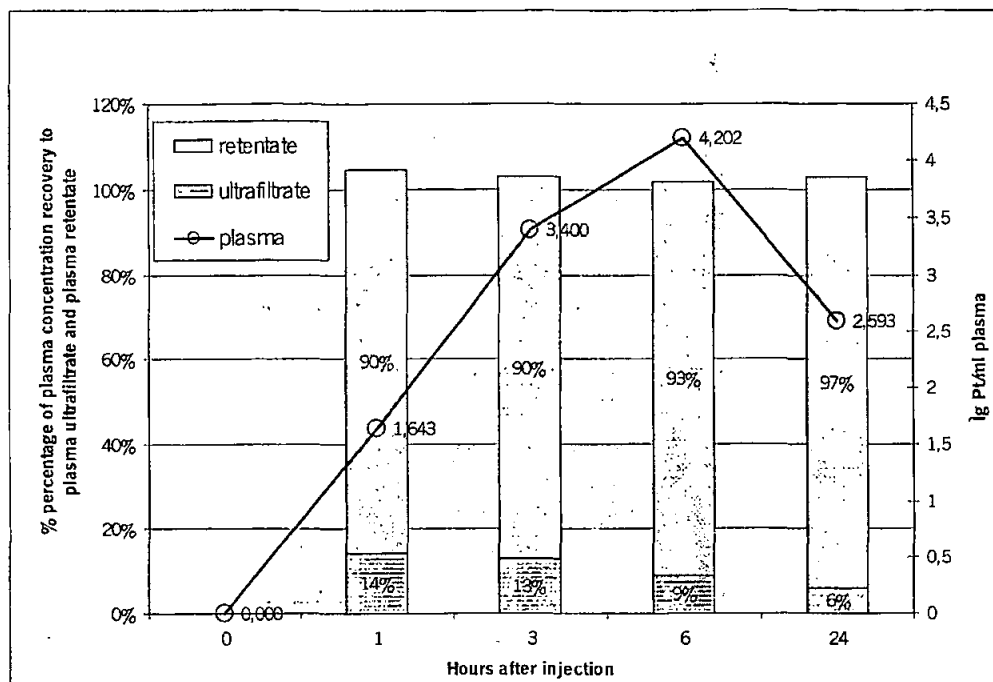


Figure 16. Distribution of Pt levels in plasma, during liposomally encapsulated oxaliplatin chemotherapy treatment.

liposomally encapsulated oxaliplatin dose: 420 mg (250 mg/m²)

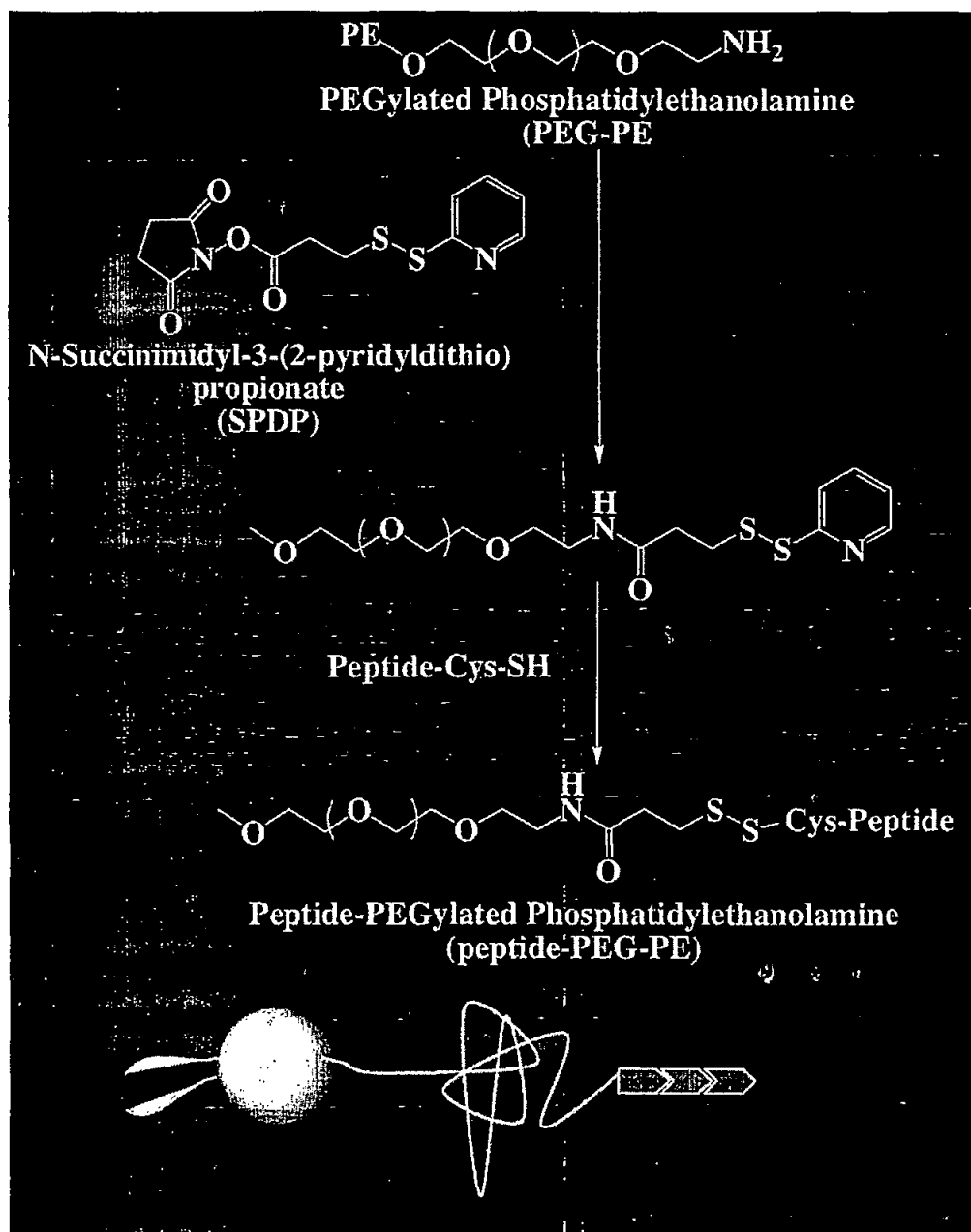


Figure 17. Chemical procedure for coupling peptides to PEG-DSPE

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo(nosotros), abajo firmado (s)/ I (we), the undersigned:

Parthenios BOULIKAS

Domiciliado (s) en / Domiciled at:

Gr. Afxentiou 7, 174 55 Alimos, Attiki, Greece

Por el presente conferimos poder a

GOMEZ PINZON & ASOCIADOS y / o Mauricio Jaramillo Campuzano y/o Paula Samper Salazar y / o Patricia Arrázola Bustillo y/o José Luis Suárez Parra

Domiciliados en Bogotá, Colombia para, obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo(amos) a los dichos apoderados para que me (os) representen ante cualesquiera entidades o personas ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, denominaciones de origen, nombres de dominio, registros sanitarios, variedades vegetales Y registros de todo tipo ante el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario); su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria, y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Hereby grant to

GOMEZ PINZON & ASOCIADOS and / or Mauricio Jaramillo Campuzano and/or Paula Samper Salazar and / or Patricia Arrazola Bustillo and/or José Luis Suarez Parra

domiciled at Bogotá, Colombia, Power of Attorney to obtain protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, denominations of origin, domain names, public health registrations, vegetal varieties and all kind of registrations before the ICA (Instituto Colombiano Agropecuario); its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition protection to the consumer, oppositions, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, ratify acts done by representatives without a power of attorney

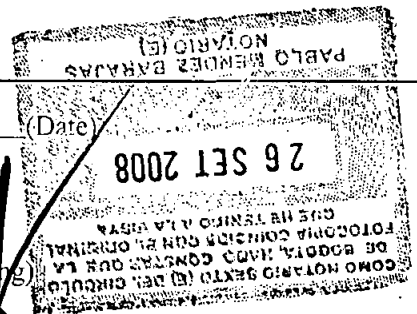
Dado y firmado hoy / Given and signed this 19/2008

(Date)

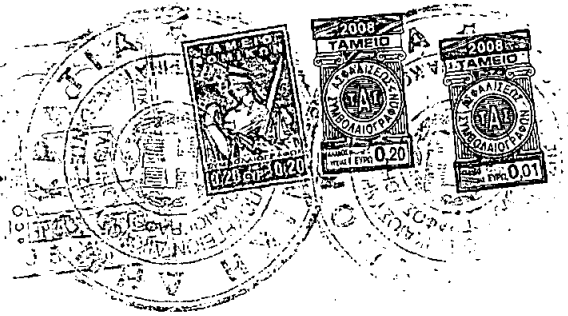
En/in Arhens (Location signed)

Por/by Parthenios Boulikas (Print name of person signing)

Firma /Signature [Signature] (Signature)



DEWONONKE UE TNV 2861/1-9-2008 npan yov



COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

26 SET 2008

PAULO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

Apostille - Επιστημείωση

N 25

(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961/

Σύμβαση της Χάγης της 5 Οκτωβρίου 1961).

1. Χώρα Ελλάδα
Pays

Το παρόν δημόσιο έγγραφο
Le présent acte public

2. έχει υπογραφεί από
a été signé par την Σοφία - Νεφέλη Κωνσταντή

3. που ενήργησε με την ιδιότητα
agissant en qualité de της Σφραγίστριας Αθηνών

4. φέρει τη σφραγίδα/επίσημα
est revêtu du sceau/timbre de της Πρωτοδικάριας Σφραγίστριας
Η βεβαίωση χορηγείται/attesté

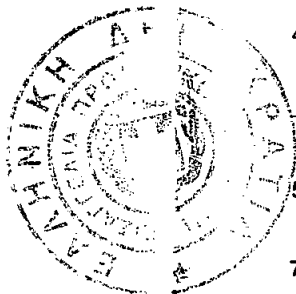
5. τόπος Αθήνα, 6. ημερομηνία 02-08-2008
à

7. από την Εισαγγελέα Πρωτοδικών Αθηνών
par Ελένη Καρακαρανίου

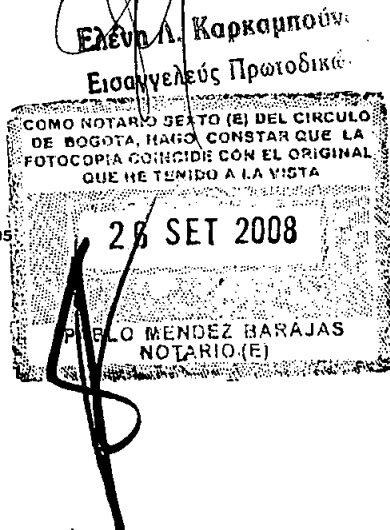
8. με αριθμό 1741/2008
sous No.

9. Σφραγίδα/επίσημα
Sceau/mimbre

10. Υπογραφή
Signature



ΑΠΟ ΤΟ ΕΘΝΙΚΟ ΤΥΠΟΓΡΑΦΕΙΟ ΑΡΙΘ. ΕΡΓ. 807/2005



TRATAMIENTOS PARA CÁNCER

CAMPO DE LA INVENCION

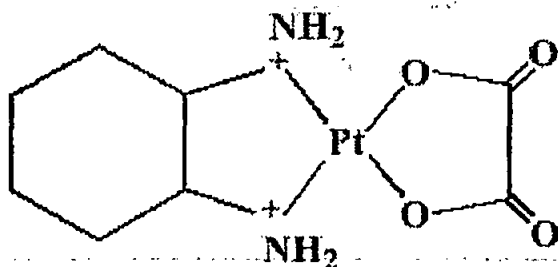
La presente invención se refiere a liposomas que
5 comprenden oxaliplatina encapsulada y a métodos para la
elaboración de oxaliplatina encapsulada. El liposoma de
oxaliplatina puede utilizarse para eliminar células
cancerosas en una variedad de malignidades humanas y
animales. La invención también se refiere a liposomas que
10 comprenden oxaliplatina y otro fármaco anticáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inmunoterapia, vacunas, inhibidores de
angiogénesis, inhibidores de telomerasa, inductores de
apoptosis, terapias de transducción de señal, terapia
15 genética y un número de terapias dirigidas al cáncer son
prometedores arsenales en la lucha contra el cáncer pero no
han demostrado sus virtudes en un entorno clínico. La
investigación del cáncer experimenta extensas inversiones;
aún, la relativa supervivencia de cinco años de los cuatro
20 cánceres principales (mama, pulmón, colorrectal y de
próstata) no ha cambiado mucho en los últimos 25 años. La
heterogeneidad tumoral dentro del mismo individuo es
parcialmente responsable de la falla de las terapias
dirigidas (Miklos, 2005). Por consiguiente, la quimioterapia
25 y las terapias hormonales clásicas (para cánceres de mama y

de próstata) junto con radiación e intervención quirúrgica permanecen siendo los soportes principales para tratamientos para la vasta mayoría de los pacientes de cáncer.

Sin embargo, la mejora en el suministro y dirección del fármaco al tumor de los fármacos de quimioterapia pre-existentes con la nanotecnología proporciona un tratamiento alternativo. La oxaliplatina es un agente anti-neoplásico con la fórmula molecular $C_8H_{14}N_2O_4Pt$ y el nombre químico de cis-[(1R, 2R)-1,2-diaminociclohexanodiamina-N,N]-[oxalato(2-)-O,O]platino. Su estructura química se muestra a continuación.



La estructura de oxaliplatina

El uso de oxaliplatina en terapia de cáncer ha hecho avanzar el manejo de cáncer, en particular de cáncer colorrectal. El éxito de la oxaliplatina se encuentra en su capacidad para inducir daño al ADN, dando como resultado voluminosos aductos así como reticulaciones intra- e inter-filamento (Takahara et al., 1995), pero también en su capacidad para inducir apoptosis (Boulikas y Vougiouka, 2003). El átomo de platino de oxaliplatina forma reticulaciones 1,2-intrafilamento entre dos residuos

adyacentes de guanosina, doblando la doble hélice por aproximadamente 30 grados hacia la ranura principal. La oxaliplatina tiene un ligando de vehículo de diaminociclohexano no hidrolizable (DACH) que se mantiene en 5 los metabolitos citotóxicos finales del fármaco. Su reacción con ADN y otras macromoléculas procede mediante hidrólisis de uno o ambos grupos carboxiléster de oxalato que dejan un monoadducto de platino DACH o una reticulación bifuncional de platino-DACH. El químico intrínseco y las características 10 estéricas de los aductos de platino-DACH parecen contribuir a la falta de resistencia cruzada con la cisplatina (revisado en Di Francesco et al., 2002). La hidrólisis alcalina de oxaliplatina da el complejo monodentado de oxalato (pKa 7.23) y el complejo de oxaliplatina dihidratado en dos etapas 15 consecutivas. El compuesto intermedio monodentado se supone que reacciona rápidamente con compuestos endógenos (Jerremalm et al., 2003). Se han reportado las estructuras cristalinas de la oxaliplatina enlazadas a un dodecámero dúplex de ADN con la secuencia 5'-d(CCTCTGGTCTCC); el átomo de platino 20 forma una reticulación 1,2-intrafilamento entre dos residuos adyacentes de guanosina que curvan la doble hélice en aproximadamente 30 grados hacia la ranura principal. La cristalografía proporcionó evidencia estructural para la importancia de la quiralidad en la mediación de la 25 interacción entre oxaliplatina y ADN dúplex (Spingler et al.,

2001).

Sin embargo, a pesar de sus ventajas, el uso de oxaliplatina se asocia con un patrón único de efectos secundarios que incluyen neurotoxicidad, toxicidad hematológica y toxicidad del tracto gastrointestinal. Existe un riesgo significativo de neutropenia de grado 3/4 en pacientes. La náusea y el vómito son normalmente de medio a moderados. La nefrotoxicidad es moderada permitiendo la administración de oxaliplatina sin hidratación. Algunas veces, pueden observarse severos efectos secundarios tales como necrosis tubular.

Además, se ha observado resistencia celular a oxaliplatina libre, evitando la eficacia potencial de la oxaliplatina libre. La resistencia se desarrolla por expansión clonal de una célula tumoral que tiene una ventaja y puede crecer en presencia de oxaliplatina. Se han propuesto varios mecanismos para explicar el desarrollo de la resistencia a oxaliplatina en tumores de pacientes:

1. Las células resistentes han desarrollado un mecanismo para limitar el transporte de oxaliplatina a través de su membrana celular y limitan así los niveles intracelulares del fármaco. Este es el mecanismo más importante para la adquisición de resistencia a la oxaliplatina por células tumorales. La encapsulación liposomal de oxaliplatina aquí descrita evita este mecanismo

de resistencia a oxaliplatina debido a DPPG lípido fusogénico en la formulación de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal y debido al tamaño de las nanopartículas del fármaco (promedio 100 nm) que se fagocitan ávidamente por el tumor, en comparación a células normales.

2. Las células resistentes tienen mayores niveles de glutatión; metalotioneínas u otros compuestos que neutralizan la oxaliplatina.

3. Las células resistentes han desarrollado una reparación más rápida en lesiones de ADN después de daño por oxaliplatina.

4. Se han propuesto otros mecanismos de resistencia que se conectan a la señalización de trayectorias mitocondriales o apoptóticas nucleares, responsables de la decisión de la célula dañada de experimentar apoptosis o de reparar el daño; la decisión es reparar el daño, lo cual dará como resultado la acumulación de mutaciones a nivel de ADN que pueden cambiar aún más el fenotipo del clón de tumor (puntos de fractura cromosómica que dan como resultado translocaciones y otras aberraciones cromosómicas).

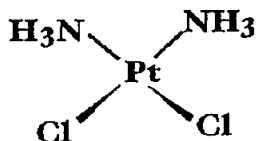
Por consiguiente, el desarrollo de alternativas menos tóxicas y más eficientes para la administración de la oxaliplatina de fármaco libre es un reto importante. El desarrollo de tales alternativas podría resolver varios de los problemas de la terapia de cáncer.

Los liposomas son vesículas microscópicas compuestas de una bicapa fosfolípida, que son capaces de encapsular fármacos activos. Los fármacos liposomales son prometedores nanovehículos para el suministro de fármacos.

La cisplatina encapsulada de manera liposomal (vendida bajo la MR Lipoplatin® por Regulon Inc., Mountain View, CA, US 6,511,676) ha demostrado reducir la nefrotoxicidad y neurotoxicidad de cisplatina, mientras se dirige a tumores después del suministro sistémico en pacientes.

La oxaliplatina es un fármaco que tiene un espectro de actividad, mecanismos de acción y resistencia diferentes de los de la cisplatina. Las lesiones por aducto de oxaliplatina se reparan por el sistema de reparación por excisión de nucleótido. La oxaliplatina se elimina por enzimas relacionadas con (GSH) glutatión. La expresión ERCC1 Y XPA fue predictiva de la sensibilidad a la oxaliplatina en seis líneas celulares de colon *in vitro* (Arnould et al., 2003). Se ha reportado que la oxaliplatina tiene una mejor eficacia que la cisplatina para cánceres colorrectales.

La cisplatina y oxaliplatina tienen sustanciales diferencias estructurales que conducen a diferentes efectos secundarios durante la quimioterapia.



La estructura de cisplatina.

Por ejemplo, los efectos secundarios de la cisplatina son nefrotoxicidad, neuropatía periférica, ototoxicidad y severa toxicidad gastrointestinal (para referencia ver McKeage MJ: Perfiles de efectos adversos comparativos de fármacos de platino. Drug Saf 13: 228-44, 1995, Hanigan MH y Devarajan P: Nefrotoxicidad de cisplatina: mecanismos moleculares. Cancer Ther 1, 47-61, 2003).

Existe una necesidad de reducir las dificultades en la administración de oxaliplatina a fin de reducir la elevada toxicidad de oxaliplatina libre cuando se utiliza en terapia y de dirigirse a tumores y proporcionar tratamiento eficiente a pacientes con tumores resistentes a quimioterapia.

Además, a medida que los diferentes fármacos parecen tener mejor eficacia en la lucha contra diferentes células cancerosas y con respecto a la posición y la etapa y anatomía de la malignidad, existe la necesidad de ser capaz de administrar en una manera eficaz, de manera simultánea, más de un fármaco o genes en terapia de combinación.

La presente invención se propone resolver o al menos mitigar estos problemas mediante encapsulación de oxaliplatina y, en otro aspecto, oxaliplatina y otro fármaco anticáncer en un liposoma. Esto incrementa la eficacia del fármaco.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona liposomas que comprenden oxaliplatina encapsulada y que tienen una composición diferente de lípidos en su membrana externa e interna y métodos para la elaboración de tales liposomas. Los liposomas comprenden una molécula lípida con un grupo principal (aniónico) cargado de manera negativa. La invención también proporciona liposomas que tienen oxaliplatina encapsulada y otro fármaco y métodos para la elaboración de tales liposomas. Se proporciona además el uso de tales liposomas en el tratamiento de cáncer.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para formar un micelo que comprende oxaliplatina, comprendiendo el método combinar una cantidad efectiva de oxaliplatina y un lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa con un solvente.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para encapsular oxaliplatina en un liposoma que comprende combinar un micelo de oxaliplatina de acuerdo con la invención, con un liposoma preformado o lípidos.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para encapsular oxaliplatina en un liposoma, que comprenden las siguientes etapas:

- a) formar un micelo que comprende oxaliplatina al combinar una cantidad efectiva de oxaliplatina y un lípido de

fosfatidil glicerol, cargado de manera negativa, con solvente; y

b) combinar dicho micelo de oxaliplatina con un liposoma preformado o lípidos.

5 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un micelo que comprende una cantidad efectiva de oxaliplatina y un lípido de fosfatidil glicerol, cargado de manera negativa.

10 En un quinto aspecto, la invención se refiere a un liposoma que comprende una cantidad efectiva de oxaliplatina en donde la capa interna y externa del liposoma comprende diferentes lípidos. Otros aspectos de la invención se refieren al uso del liposoma en el tratamiento de cáncer y a un método para el tratamiento de cáncer mediante administración del liposoma.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un liposoma que comprende una cantidad efectiva de oxaliplatina y otro fármaco anticáncer.

20 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un liposoma que comprende una cantidad efectiva de oxaliplatina y un gen anticáncer.

La invención también proporciona programas de administración para las formulaciones farmacéuticas, i.e., los liposomas de la invención.

25 En un aspecto adicional relacionado, la invención se refiere a una terapia de combinación que comprende

administrar una cantidad efectiva de gemcitabina y un liposoma que encapsula una cantidad efectiva de cisplatina. También se proporciona el uso de un liposoma que tiene cisplatina encapsulada en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente humano afectado por cáncer y un método para el tratamiento de cáncer, mediante terapia de combinación que involucra la administración de dicho liposoma y gemcitabina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se describirá ahora de manera adicional. En lo sucesivo se definen con mayor detalle diferentes aspectos de la invención. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos, a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

La invención se refiere a un método para la encapsulación de oxaliplatina en liposomas que tienen una composición lípida diferente en su interior de su bicapa de membrana externa.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para la formación de un micelo que comprende oxaliplatina, comprendiendo el método la combinación de una

cantidad efectiva de oxaliplatina y una cargada de manera negativa con una solución de solvente. El lípido se caracteriza por que comprende un grupo principal cargado de manera negativa (aniónico). Preferentemente, el lípido es lípido de fosfatidil glicerol.

Preferentemente, el solvente es etanol. Sin embargo, también pueden utilizarse otros solventes conocidos por las personas expertas, tales como solvente de carbohidratos. El metanol puede ser otro solvente adecuado.

El término oxaliplatina, según se utiliza en la presente, se refiere a oxaliplatina y cualquier análogo o derivado de oxaliplatina. La oxaliplatina encapsulada de manera liposomal de la invención también es referida en la presente por su nombre comercial LIPOXAL®.

El término lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa, de acuerdo con la invención, se refiere a un lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa o un derivado del mismo. Estos lípidos se caracterizan porque comprenden un grupo principal cargado de manera negativa (aniónico). De este modo, el término se utiliza para describir cualquier lípido que tiene la capacidad de formar micelos y que tiene un grupo principal neto, cargado de manera negativa. El lípido de fosfatidil glicerol, cargado de manera negativa, de acuerdo con los diferentes aspectos de la invención, puede seleccionarse a partir de dipalmitoil

94

fosfatidil glicerol (DPPG), dimiristol fosfatidil glicerol (DMPG), diaproil fosfatidil glicerol (DCPG), diestearoil fosfatidil glicerol (DSPG) o dioleil fosfatidil glicerol (DOPG). En una modalidad preferida, el lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa es DPPG.

La solución de etanol de acuerdo con la invención se encuentra preferentemente a 20 hasta 40%, preferentemente a aproximadamente 30% de etanol. La proporción molar de oxaliplatina a lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa se encuentra en un rango de 1:1 hasta 1:2. Preferentemente, la proporción es de 1:1.

Por lo tanto, de acuerdo con una modalidad del primer aspecto de la invención, la oxaliplatina se mezcla con DPPG, a una proporción molar de 1:1 hasta 1:2 en 20-40% etanol, en presencia de un regulador tal como sulfato de amonio (10-200 mM) o regulador Tris (10-100 mM) o regulador de fosfato de sodio (10-200 mM) a un pH de 6.5-8.0 a fin de lograr aproximadamente 5 mg/ml de concentración final de oxaliplatina. La mezcla se calienta a 30-60 grados Celsius y se incuba durante 20 min hasta 3 h. Bajo estas condiciones, los grupos imino cargados de manera positiva en la molécula de oxaliplatina se conducen en interacción con los grupos cargados de manera negativa en la molécula de DPPG, formando micelos inversos en soluciones etanólicas.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un

método para encapsular oxaliplatina en un liposoma que comprende la combinación de un micelo de oxaliplatina de acuerdo con la invención con un liposoma o lípidos preformados.

5 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para encapsular oxaliplatina en un liposoma, que comprende las siguientes etapas:

c) formar un micelo que comprende oxaliplatina al combinar una cantidad efectiva de oxaliplatina y un lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa con un solvente y

d) combinar dicho micelo de oxaliplatina con un liposoma o lípidos preformados.

En una modalidad de los métodos, el micelo se mezcla con un liposoma preformado.

El liposoma o lípidos preformados, usados en los métodos de la invención y, por lo tanto, el liposoma de la invención, pueden comprender lípidos cargados de manera negativa y/o positiva, tal como fosfolípidos. Muchos fosfolípidos pueden utilizarse en la presente invención. Por ejemplo, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, diestearoilfosfatidil-etanolamina, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, lisofosfatidilcolinas, fosfatidilgliceroles, esfingomielinas o ácido fosfatídico, todos encuentran uso en la presente invención. También puede

96
utilizarse ceramida u otros derivados lípidos. Para el
propósito de modificar la estabilidad o permeabilidad de la
membrana lípida, puede agregarse un componente lipofílico
adicional tal como, por ejemplo, colesterol u otro esteroide,
5 estearilamina, ácido fosfatídico, dicetil fosfato, tocoferol
o extractos de lanolina.

Los lípidos pueden seleccionarse a partir de, pero
sin limitarse, DDAB, bromuro de dimetildioctadecil amonio;
DMRIE: bromuro de N-[1-(2,3-dimiristiloxi)propil]-N,N-
10 dimetil-N-(2-hidroxietyl)amonio; DMTAP: 1,2-dimiritoil-3-
trimetilamonio propano; DOGS:
Dioctadecilamidoglicilespermina; DOTAP: cloruro de N-(1-(2,3-
dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio; DOTMA: cloruro de
N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-n,n,n-trimetilamonio; DTAP: 1,2-
15 dipalmitoil-3-trimetilamonio propano; DSTAP: 1,2-diesteroil-
3-trimetilamonio propano.

En una modalidad de la invención, los liposomas de
oxaliplatina comprenden DPPG, colesterol y HSPC
(fosfatidilcolina de soya hidrogenada). Dicha encapsulación
20 intenta reducir las reacciones adversas de los agentes
citotóxicos sin reducir eficacia.

La preparación liposomal de la invención también
puede comprender una sal de amonio, tal como cloruro de
amonio; sulfato de amonio o cualquier otra sal de amonio.

25 Los lípidos de fosfatidil glicerol cargados de

94

manera negativa de acuerdo con la invención, los cuales se usan para formar el micelo y que son parte de la membrana de liposoma, proporcionan la ventaja de que mejoran la permeabilidad de la membrana celular para suministro de fármaco en el citosol. El liposoma puede fusionarse así con la membrana de la célula y liberar su contenido en el interior de la célula. Estas propiedades se llaman fusogénicas. De este modo, debido a estas propiedades fusogénicas y al mecanismo de fagocitosis, las formulaciones liposomales de oxaliplatina de acuerdo con la invención son capaces de pasar a través de la membrana celular de la célula tumoral y de este modo tiene aplicación en el tratamiento de tumores resistentes a oxaliplatina o resistentes a fármacos.

De acuerdo con otra modalidad, el acomplejamiento en el mismo liposoma de oxaliplatina con lípidos de fosfatidil glicerol cargados de manera negativa da como resultado una eficiencia de encapsulación muy elevada (50-100%), reduciendo la pérdida de fármaco durante la elaboración del producto.

El método de encapsulación de acuerdo con la invención se basa en la formación de micelos inversos entre oxaliplatina con una molécula lípida carga de manera negativa, según se describe en la presente. Los micelos inversos se mantienen mediante interacción electroestática entre grupos amino de oxaliplatina cargados de manera

positiva y un grupo fosfato cargado de manera negativa del
lípidido de fosfatidil glicerol, por ejemplo DPPG, y dirigen
sus cadenas hidrofóbicas del lípidido de fosfatidil glicerol
hacia la solución etanólica, absorbiendo así las moléculas de
5 oxaliplatina. Los micelos inversos de lípidido de
oxaliplatina-fosfatidil glicerol se convierten en liposomas
mediante su mezcla con liposomas o lípidos pre-elaborados,
esto puede seguirse por diálisis y extrusión a través de
membranas, a fin de retirar el etanol, o dilución con agua,
10 extrusión a través de filtros, con o sin concentración con
filtración a presión elevada. Esto da como resultado la
captura y encapsulación de oxaliplatina a un rendimiento muy
elevado. La composición lípida de los liposomas durante el
método de preparación determina en un grado elevado la
15 composición lípida de la superficie externa de la
nanopartícula.

En una modalidad de los diferentes aspectos de la
invención, puede agregarse una cubierta que permite que el
liposoma de la invención evada supervivencia inmune.
20 Preferentemente, la cubierta es un polímero. La cubierta
puede agregarse ya sea en la etapa de liposoma o después de
la inserción en el nanovehículo formado. De este modo, los
liposomas de la invención pueden comprender tal cubierta.
Los polímeros que pueden utilizarse de acuerdo con la
25 invención incluyen glicol de polietileno (PEG), glicol de

polimetileno, glicol de polihidroxipropileno, glicol de polipropileno, glicol de polimetilpropileno, óxido de polihidroxipropileno, polioxialquilenos, polieteraminas. Los polímeros adicionales incluyen polivinilpirrolidona, polivinilmetiléter, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polihidroxipropilmetacrilato, polihidroxiethylacrilato, hidroximetilcelulosa, hidroxiethylcelulosa, polietilenglicol y poliaspartamida, ácido hialurónico. Un polímero preferido es PEG. Por ejemplo, la diestearoilfosfatidiletanolamina puede derivarse con PEG hasta conducir a diestearoilfosfatidiletanolamina derivada (PEG-DSPE). Los polímeros pueden emplearse como homopolímeros o como copolímeros en bloque o aleatorios.

Los nanovehículos de oxaliplatina liposomal, expuestos en la presente invención, pueden evadir la supervivencia inmune debido a la cubierta de polímero, pueden circular durante periodos prolongados en fluidos corporales, pueden redistribuirse a partir de depósitos de tejido en tumores y pueden concentrarse preferentemente en tumores sólidos y metástasis después de inyección intravenosa en animales y humanos mediante extravasación a través de la vasculatura comprometida que tiene imperfecciones en su endotelio durante el proceso de neoangiogénesis.

Una ventaja del método de encapsulación descrito en la presente invención es que el fármaco en el vehículo de liposoma alcanzará tumores primarios y metástasis mediante extravasación preferencial a través de la vasculatura de tumor con fugas y de este modo tienen una actividad anticáncer mejorada. El lípido fusogénico DPPG mejora la fusión de las nanopartículas con la membrana celular del tumor mientras que al mismo tiempo también se mejora una mayor captura de la oxaliplatina liposomal mediante la avidéz de las células tumorales respecto de fagocitosis.

Además, un ligando puede conjugarse con la cubierta de polímero de los liposomas de la invención.

Por ejemplo, el ligando puede ser un péptido, por ejemplo, un anticuerpo. Los péptidos pueden insertarse de manera post-inserción, por ejemplo, como conjugados Péptido-PEG-DSPE. Los péptidos de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitarse, aquellos que se derivan de la endostatina, anti-trombina, anastelin, angiostatin, PEX, factor derivado de epitelio de pigmento, estructuras primarias de tromboespondin (TSP)-1 y -2 y aquellos que son capaces de ejercer una actividad anticáncer doble: la de restringir la angiogénesis del tumor a través de, por ejemplo, un péptido de 27 amino ácidos correspondiente al dominio de terminal NH₂ de endostatina anexa a PEG-DSPE (Figura 17) y la ejercer también la actividad anti-tumor de

las moléculas de oxiplatina encapsuladas en el mismo liposoma portador de péptido de anti-angiogénesis.

Un péptido preferido es endostatina. La endostatina, el fragmento proteolítico de terminal C de 20 kDa del dominio sin colágeno 1 (NC1) del colágeno de proteína de membrana de basamento XVIII, inhibe la proliferación celular y migración y es un inhibidor endógeno de angiogénesis de tumor y crecimiento de tumor. Un problema importante en la reconciliación de los muchos efectos in vitro reportados de la endostatina es la falta de un receptor de alta afinidad. La exposición crónica a endostatina bloquea la proliferación de células endoteliales y migración e induce apoptosis de célula endotelial, inhibiendo así la angiogénesis; la endostatina estimuló la fosforilación aguda de sintasa de óxido nítrico endotelial (Enos). EN Ser116, Ser617, Ser635 y Ser1179 y defosforilación en Thr497 en células endoteliales aórticas bovinas, cultivadas, eventos asociados con activación de eNOS. No obstante, el óxido nítrico (NO) es promotor de angiogénesis. La exposición a corto plazo de la células endotelial a endostatina, por consiguiente, a diferencia de la exposición a largo plazo que es anti-angiogénica, puede ser pro-angiogénica (Li et al., 2005). Un péptido de 27 amino ácidos correspondiente al dominio de terminal NH2 de endostatina produjo su actividad anti-angiogénica completa y tuvo fuerte actividad anti-tumor;

tres histidinas que son responsables del enlace de cinco fueron esenciales para las propiedades anticáncer del péptido (Tjin Tham Sjin et al., 2005, Tjin Tham Sjin RM, Satchi-Fainaro R, Birsner AE, Ramanujam VM, Folkman J, Javaherian K. 5 Un péptido sintético de 27 amino ácidos correspondiente al dominio de endostatina de enlace a cinco de terminal NH₂, es responsable de su actividad anti-tumor (Cancer Res. Mayo 1, 2005; 65(9):3656-63. Li C, Harris MB, Venema VJ, Venema RC. La endostatina induce liberación de prostaciclina y óxido nítrico endotelial agudo. Biochem Biophys Res Commun, Abril 10 15, 2005;329(3):873-8).

Los ligandos de péptido se derivan fácilmente por aquellos expertos en la materia mediante selección de bibliotecas de péptidos para ligandos capaces de interactuar 15 específicamente con epítopos péptidos derivados de antígenos específicos de tumor, sobre-expresados en la superficie de la célula de tumor. La sujeción de estos péptidos al extremo de PEG con la química mostrada en la Figura 17 da liposomas que encapsulan oxaliplatina capaces de dirigirse a tumores 20 específicos. La tabla 1 ilustra esquemáticamente los antígenos de tumor a partir de los cuales pueden derivarse, sintetizarse y utilizarse los péptidos expuestos a la superficie celular externa para derivar los ligandos péptidos de bibliotecas de péptidos aleatorias con elevada afinidad al 25 antígeno de tumor. Tales ligandos péptidos se unen después

de manera covalente a la molécula de lípido-polímero, por ejemplo, una molécula de PEG-DSPE, que se inserta en la partícula de liposoma.

Pueden seleccionarse otros ligandos a partir del grupo que consiste en transferrina, ácido fólico, ácido hialurónico, una cadena de azúcar tal como galactosa o manosa, un anticuerpo monoclonal, fosfato de piridoxal, vitamina B12, sialilo Lewis X, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblasto básico, factor de crecimiento endotelial vascular, molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1), molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), molécula de adhesión endotelial a plaquetas (PECAM-1), un péptido de Arg-Gly-Asp (RGD) o un péptido Asp-Gly-Arg (NGR) y un fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal.

En una modalidad, las partículas de oxaliplatina liposomales se modifican en su superficie con conjugados de PEG-DSPE-folato, insertados después de la formación de la partícula de liposoma para dirigir las partículas a tumores que sobre-expresan receptores de folato.

	Molécula	Indicación de enfermedad	Referencia
	EGFR	NSCLC cáncer de mama, vejiga, cáncer de ovario	Yarden Y. y Sliwkowski M.X. (2001), Lynch et al. (2004)
5	HER/NEU	Cáncer de mama, ovario, cáncer de pulmón, ovario, colo-rectal, próstata	Koeppen H.K., et al., (2001), Slamon D.J., et al., (1989)
	VEGFR	Angiogénesis, NSCLC	Cardones A.R. y Banez L.L. (2006), Rosen L.S. (2005)
10	FR (Receptor de Folato)	Cáncer de ovario, mama, cerebro, pulmón, colo-rectal	Sudimack J. y Lee R.J. (2000), Garin-Chesa P. et al., (1993), Ross J.F., et al., (1994)
	MUC	Cáncer de mama, pulmón, colo-rectal, próstata, riñón, pancreático	Liu et al., (2004), Finn O.J. et al., (1995)
15	Hsp90 (acompañante molecular)	Cáncer de mama, pulmón (involucrado en la compañía de muchos antígenos de cáncer)	Whitesell L. y Linquist S.L. (2005), Yu X. et al., (2002)
	CD20	Linfoma de No-Hodgkin, enfermedades auto-inmunes	Perosa F. et al., (2005), Wojciechowski W. et al., (2005)
	CEA	Cáncer colo-rectal	Liu K., et al. (2004)
20	TAA (Antígenos asociados a tumor: MAGE)	Cáncer de mama, NSCLC, ovario, cáncer gástrico	Bandic D, et al., (2006), Ito S., et al., (2005)
	EpCAM	Cáncer de mama, ovario, colon	Osta W.A., et al., (2004)

Tabla 1: Ligandos

Lo péptidos dirigidos contra antígenos de tumor también pueden agregarse al final de un polímero, por ejemplo, un polímero-PEG para multifuncionamiento que dé a las nanopartículas la propiedad de dirigirse a tumores
5 específicos que sobre-expresan antígenos superficiales específicos.

En una modalidad, las partículas de oxaliplatina liposomales también se modifican con ácido fólico que dirige las lipo-nano-partículas de oxaliplatina a células malignas
10 de ovario (y otras) que sobre-expresan receptores de folato.

En otra modalidad, las partículas de oxaliplatina liposomales también se modifican con ligandos Her2/neu que dirigen las nano-partículas de oxaliplatina a células cancerosas de mama que sobre-expresan Her2/neu.

15 Las formulaciones liposomales de oxaliplatina de acuerdo con la invención evitan el problema de resistencia de la oxaliplatina libre, originado por la captura reducida del fármaco en tumores resistentes. De este modo, las formulaciones tienen aplicaciones en el tratamiento de
20 tumores resistentes a oxaliplatina. Las formulaciones liposomales de oxaliplatina de acuerdo con la invención también exhiben un perfil de menor toxicidad que la oxaliplatina de fármaco libre (oxaliplatina libre) en ensayos clínicos humanos contra una variedad de malignidades sólidas.
25 Además, debido a que el espectro de efectos secundarios de

estas formulaciones liposomales de oxaliplatina es diferente de aquellos de oxaliplatina libre y el mecanismo de entrada en células tumorales también es diferente, las formulaciones liposomales de la oxaliplatina de acuerdo con la invención 5 pueden tener aplicaciones clínicas ventajosas en cáncer de pulmón de célula no pequeña, en cáncer de mama, en cáncer de ovario, en cáncer de cabeza y cuello, en cáncer de próstata metastásico y en varios otros tumores sólidos, además de cánceres colorrectal y gástrico.

10 En una modalidad, la oxaliplatina encapsulada de manera liposomal de la invención, es capaz de disminuir los niveles de bilirrubina (Figura 2) o la metástasis ósea (Figura 3) en pacientes tratados.

En otra modalidad, las preparaciones liposomales 15 descritas en la presente pueden utilizarse después de la infusión intravenosa para disminuir los efectos secundarios de oxaliplatina, especialmente toxicidad gastrointestinal y de los otros fármacos co-encapsulados.

Las preparaciones liposomales de acuerdo con la 20 invención pueden dirigirse preferentemente a tumores humanos y sus metástasis.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un liposoma que comprende oxaliplatina como se describe en la presente, para uso como un medicamento.

25 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de

un liposoma que tiene oxaliplatina encapsulada, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

La invención también se refiere a un método para el tratamiento de cáncer que comprende la administración de un
5 liposoma que tiene oxaliplatina encapsulada, de acuerdo con la invención, a un paciente.

Pueden tratarse diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer gástrico, pancreático, cáncer de mama, cáncer de pulmón de célula no pequeña, en
10 cáncer de ovario, cáncer de cuello y cabeza, cáncer de próstata, testicular, cáncer intestinal, cáncer esofágico o urotelial. Preferentemente, el tratamiento es para cáncer colorrectal, gástrico o pancreático.

El liposoma se administra semanalmente mediante
15 infusión intravenosa a una dosis de 100 hasta 350 mg/m². Preferentemente, la administración es a una dosis de 300 mg/m², pero otras dosis posibles son 100 mg/m², 150 mg/m², 200 mg/m² o 250 mg/m². En una modalidad, la administración se encuentra en 2 a 5 ciclos. Cada ciclo es de 8 a 12 semanas y
20 es seguido por una o dos semanas de reposo. Preferentemente, la infusión semanal intravenosa es durante 3 horas.

En otra modalidad, la administración es cada dos semanas.

Estos programas de administración arriba descritos
25 también pueden utilizarse cuando la oxaliplatina se

administra como una terapia de combinación, según se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la elaboración de micelos y/o liposomas que comprenden dos fármacos anticáncer, oxaliplatina y otro fármaco. El método es según se describe en la presente, con relación a la elaboración de liposomas de oxaliplatina, pero incluye la etapa de incluir otro fármaco anticáncer en el micelo o liposoma.

10. De este modo, en un aspecto adicional, la invención se refiere a liposomas que comprenden oxaliplatina encapsulada y otro fármaco anticáncer. Los fármacos se encapsulan así dentro del mismo liposoma. Esto tiene la ventaja de que pueden suministrarse en conjunto al objetivo.
15. También es posible y se encuentra dentro del alcance de la invención el incluir más de un fármaco anticáncer en el liposoma.

En una modalidad, al menos dos fármacos anticáncer con diferentes mecanismos de acción se incluyen en el mismo liposoma, de acuerdo con la invención. Por consiguiente, la célula tumoral puede ser dirigida con dos mecanismos independientes, conduciendo a un mejor éxito clínico.

El otro fármaco anticáncer puede seleccionarse a partir de compuestos tales como compuestos de platino (tales como cisplatina, carboplatina), fármacos anti-metabolitos

09

(tales como 5-fluorouracilo, citarabina, gemcitabina, pentostatina y metotrexato), fármaco de antraciclina que se dirige a ADN (tal como doxorubicina y epirubicina), fármacos que se dirigen a ADN o fármacos que se dirigen a topoisomerasas u otros fármacos de quimioterapia.

En una modalidad preferida, el otro fármaco se selecciona a partir de cisplatina, docetaxel, paclitaxel, gemcitabina, navelbina, doxorubicina, irrinotecan, SN-38, gemcitabina o 5-fluorodeoxiuridina.

Al incluir los dos fármacos en el mismo liposoma, es posible usar una dosis inferior de cada fármaco en comparación cuando cada fármaco se administra solo. Los dos fármacos pueden actuar en una manera sinérgica, incurriendo así en mayor daño a la célula tumoral con menores efectos secundarios.

En otra modalidad preferida, la cisplatina y oxaliplatina se co-encapsulan en la misma nanopartícula de liposoma. De este modo, la misma célula tumoral puede anexarse de manera simultánea por ambos, cisplatina y oxaliplatina. Los efectos secundarios de oxaliplatina también son diferentes de los efectos secundarios de la oxaliplatina liposomal (neuropatía). Por lo tanto, la misma célula tumoral puede ser tratada con al menos dos mecanismos independientes, aunque de otro modo (si no se administrara encapsulada en el mismo liposoma), los dos fármacos

(oxaliplatina y cisplatina) se enfocarían cada uno más a una célula diferente. Aparte, la administración de una combinación de diferentes fármacos encapsulados en el mismo liposoma, hace posible usar menores dosis para lograr 5 eficacia, evitando o reduciendo así la toxicidad de los fármacos. Más particularmente, al disminuir la dosis de oxaliplatina, los inventores han encontrado que el efecto secundario de la neurotoxicidad puede limitarse mientras que al disminuir la dosis de cisplatina puede limitarse el efecto 10 secundario de la mielotoxicidad. Como resultado, hay una mejora del perfil de la neurotoxicidad y mielotoxicidad de la oxaliplatina liposomal y cisplatina liposomal respectivamente administradas, mientras que al mismo tiempo es posible incurrir en un daño igual o mayor a los tumores después de la 15 administración sistémica. De este modo, la combinación de cisplatina y oxaliplatina en el mismo liposoma permite la administración de cada uno de dichos fármacos a menores dosis, bajo condiciones donde los efectos secundarios de los fármacos liposomales se reducen incluso más.

20 En otra modalidad, la oxaliplatina encapsulada de manera liposomal de la invención se combina con la doxorubicina de fármaco (DOX) que se encapsula en la misma partícula de oxaliplatina liposomal como oxaliplatina, según se describe en los métodos de la invención. 25 Sorprendentemente, los inventores han encontrado que esto

puede disminuir la dosis de oxaliplatina y en consecuencia la neurotoxicidad de la oxaliplatina liposomal administrada, mientras se reduce también la dosis de DOX. Esto reduce la cardiotoxicidad y otros efectos secundarios de DOX mientras se infligen un daño igual o mayor a los tumores.

En otra modalidad, el liposoma comprende oxaliplatina y 5-fluorouracilo. La oxaliplatina en combinación con 5-fluorouracilo se ha aprobado recientemente para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico. Sin embargo, existen serios problemas en la administración de dichos fármacos, principalmente debido a los importantes efectos secundarios de cualquier fármaco, los cuales se reducen con su encapsulación liposomal, según se describe en la invención. Además, al combinar los fármacos según se describe en la presente, se incrementa la eficacia del tratamiento.

La invención también se refiere a la encapsulación de oxaliplatina y un gen anticáncer en el mismo liposoma. De este modo, los liposomas de acuerdo con la invención pueden comprender oxaliplatina y un gen anticáncer. Los genes anticáncer usados incluyen, pero sin limitarse, p53, IL-2, IL-12, angiostatina y oncostatina.

En otro aspecto, la invención se refiere a una terapia de combinación en donde la oxaliplatina se administra junto con otro fármaco o gen, según se especifica en la

presente, en donde ambos fármacos se encapsulan en el mismo liposoma. De este modo, los liposomas que comprenden oxaliplatina y otro fármaco anticáncer o gen pueden utilizarse en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer o en un método para el tratamiento de cáncer. Además, la invención se refiere a un primer uso médico de los liposomas en combinación.

Una persona experta apreciará que los programas de administración y la dosis de los componentes pueden variar de acuerdo con el otro fármaco presente. Como para la oxaliplatina, puede utilizarse una dosis y rango de dosis según se describe en la presente. Además, el esquema de administración del liposoma de combinación puede ser según se describe en la presente para oxaliplatina.

En una modalidad, la oxaliplatina encapsulada de manera liposomal de la invención se administra a pacientes de cáncer 150-300 mg/m² por semana (Días 1, 8, 15) durante 12 semanas como monoterapia o en combinación con 1 g/m² de gemcitabina los días 1, 8 en un ciclo de 21 días o en combinación con docetaxel, paclitaxel, irrinotecan.

En un aspecto relacionado, la invención se dirige a cisplatina encapsulada de manera liposomal en donde la cisplatina se encapsula en combinación con otros fármacos anticáncer como se define en la presente. La cisplatina puede combinarse así en la misma partícula de liposoma con

113

cualquiera de los fármacos anticáncer de paclitaxel, docetaxel, irrinotecan, SN-38, gemcitabina, 5-fluorodeoxiuridina. La ventaja es que la misma célula tumoral es atacada simultáneamente por cisplatina y otro fármaco, logrando así una eliminación más eficaz debido a los dos mecanismos moleculares independientes, involucrados. Por ejemplo, la cisplatina producirá señalización mitocondrial y nuclear para apoptosis así como reticulaciones de ADN que detienen la reproducción mientras que docetaxel actuará en la polimerización de tubulina.

Ventajosamente, la cisplatina encapsulada de manera liposomal se encapsula en el mismo liposoma en combinación con gemcitabina, usando los métodos según se describe en la presente.

En otro aspecto, la oxaliplatina que comprende el liposoma de la invención puede administrarse en conjunto con otro fármaco anticáncer, pero el otro fármaco no forma parte del mismo liposoma. El otro fármaco es según se describe en la presente y se selecciona preferentemente a partir de cisplatina, docetaxel, paclitaxel, gemcitabina, navelbina, doxorubicina, irrinotecan, SN-38, gemcitabina o 5-fluorodeoxiuridina.

Además, en un aspecto separado, la invención se refiere a la administración de Lipoplatin® en combinación con gemcitabina. De este modo, una terapia de combinación de

Lipoplatin® y gemcitabina es un objeto de la invención. También se proporciona el uso de Lipoplatin® en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente humano afectado por cáncer, mediante terapia de
5 combinación que involucra la administración de Lipoplatin® y otro fármaco que no se encapsula en el mismo liposoma.

El otro fármaco puede administrarse al mismo tiempo que Lipoplatin® o en un momento diferente.

Preferentemente, el otro fármaco es gemcitabina y
10 la administración conduce a mejora clínica. Preferentemente, el cáncer tratado es cáncer pancreático, pero también pueden tratarse otros cánceres tales como cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de mamá, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer
15 de próstata, testicular, cáncer intestinal, vejiga, cáncer de esófago o urotelial. La dosis usada para gemcitabina es de 800 a 1000 mg/m², preferentemente 1000 mg/m². La dosis de lipoplatin es de 100 hasta 125 mg/m², preferentemente 100 mg/m².

20 La administración de Lipoplatin® y gemcitabina es intravenosa. Lipoplatin® se administra preferentemente como una infusión de 8 horas IV cada dos semanas (día 1 y día 15). La gemcitabina se administra preferentemente como una infusión de 60 min iv cada dos semanas. La administración de
25 los compuestos puede ser en ciclos de 4 semanas.

La invención se ilustra además con relación a las siguientes figuras y ejemplos. Los ejemplos muestran que la administración de liposomas de oxaliplatina conduce a mejoras clínicas, es decir, tiene un efecto clínico en el tratamiento de cáncer. El Ejemplo II muestra que la administración de Lipoplatin® y gemcitabina proporciona beneficios clínicos, conduciendo así a mejora clínica.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de la oxaliplatina liposomal mostrada como rectángulos amarillos. Las moléculas de lípidos se ilustran con encabezados hidrofílicos esféricos. Las cadenas aleatorias rojas en la superficie de la partícula representan las moléculas de PEG que dan a la partícula su capacidad de escapar a la destrucción de macrófagos en el hígado, opsonización (interacción con proteínas de suero y otras macromoléculas) en la sangre y la capacidad de extravasar en tumores sólidos y metástasis después del suministro sistémico (también su pequeño tamaño de 100 nm).

Figura 2: Reducción en los niveles de bilirrubina en un paciente (TK) con cáncer colorrectal y metástasis de hígado. El paciente se dirigía a coma hepático a partir de los muy elevados niveles de bilirrubina en la sangre (50 mg/100 ml). La inyección de oxaliplatina Liposomal a dosis

de 200 mg/m² el día 1, día 8, día 15 y día 22 dio como resultado la reducción progresiva de la bilirrubina total desde 50 hasta 12 mg/m². Más probablemente, esto resultó de la reducción en la metástasis de hígado que obstruyó el tracto biliar. Los tratamientos posteriores en los días 31 y 37 no detuvieron el progreso de la enfermedad según se deduce a partir de los niveles de bilirrubina.

Figura 3: Reducción en metástasis ósea después de monoterapia con oxaliplatina liposomal. Un paciente (EK) que sufre de cáncer gástrico y metástasis ósea se trató con 150 mg/m² cada 7 días durante 10 semanas. Hubo una mejora significativa en la calidad de vida, mucho menos dolor, menor uso de analgésicos y los pacientes fueron capaces de llevar a cabo su trabajo sobre una base diaria.

Figura 4: Con-encapsulación de cisplatina y oxaliplatina en la misma partícula de liposoma y modificación post-inserción ulterior de las partículas con conjugados de péptido-PEG-LÍPIDO a fin de dirigirse a estos tipos celulares específicos con receptores superficiales, reconocidos por los péptidos o ligandos. El esquema también ilustra cadenas de péptido (color rojo) agregadas al final de moléculas PEG para el multifuncionamiento de las partículas de liposoma y su dirección preferencial a tumores específicos. En este caso, los antígenos de tumor específicos se reconocen por el elemento péptido en la superficie del liposoma. Por ejemplo,

(17)

los epítopes péptidos de factor de crecimiento epidérmico capaces de enlazarse a la parte del EGFR expuesto a la superficie externa dirigen dichos liposomas a tumores que sobre-expresan EGFR.

Figura 5A: muestra niveles máximos de ~14 mg de platino total /ml plasma después de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en comparación a ~8 mg platino total /ml plasma después de oxaliplatina y estos se alcanzaron a 20 min para oxaliplatina encapsulada de manera liposomal y a 10 min para oxaliplatina.

Figura 5B: muestra que los niveles totales de platino en plasma de rata alcanzaron cero a ~100 h después de la inyección para oxaliplatina libre.

Figura 6A: muestra los niveles totales de platino en plasma de rata en animales tratados también con Lipoplatin®.

Figura 7A: muestra los niveles totales de Platino en tejido de riñón en animales tratados durante 5 hrs y

Figura 7B: muestra lo mismo tratado durante 190 hrs.

Figura 8A: muestra los niveles totales de Platino en tejido de hígado en animales tratados durante 5 hrs y

Figura 8B: muestra los mismos tratados durante 190 hrs.

Figuras 9A y 9B: muestran los niveles totales de

Platino en tejido de bazo en animales tratados durante 190 hrs.

Figura 10A: muestra la distribución total de Platino en tejido de rata en animales tratados tanto con oxaliplatina libre como con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal durante 5 hrs y la Figura 10B, Figuras 11A y 11B son diagramas de ratas tratadas de manera repetida (11 veces) con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal.

La Figura 12 es un diagrama de ratas tratadas de manera repetida (6 veces) con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal.

Figura 13: Lipoxal puede inducir desaparición completa de cánceres de mama humanos en ratones, después de 6 inyecciones intravenosas con intervalos de 4 días a dosis de 15-16 mg/kg. La oxaliplatina a su MTD (Dosis máxima tolerada) puede solo causar encogimiento, no la desaparición de tumores de mama humanos en ratones.

Figura 14: La dosis de 16 mg/kg de oxaliplatina liposomal (Lipoxal) es la más eficaz en la erradicación de cáncer de mama en xenoinjertos de ratón. La oxaliplatina a su máxima dosis tolerada de 4 mg/Kg tiene una eficacia anticáncer inferior en este modelo de ratón seguido por una dosis de 5 mg/kg Lipoxal.

Figuras 15 y 16 muestran los resultados de los ensayos clínicos de oxaliplatina encapsulada de manera

liposomal.

Figura 17: Procedimiento químico para acoplar péptidos a PEG-DSPE.

Ejemplos

5 EJEMPLO I

Elaboración de liposomas

La oxaliplatina se mezcla con DPPG (dipalmitoil fosfatidil glicerol) u otras moléculas de lípidos cargadas de manera negativa a una proporción molar de 1:1 en 30% etanol, 0.1 M Tris HCl, pH 7.5 a 5 mg/ml oxaliplatina final en presencia de soluciones de etanol a una concentración de 20-40% y bajo condiciones de temperatura de 30-60 grados Celsius en presencia de sulfato de amonio (10-200 mM), o regulador Tris (10-100 mM) o regulador de Fosfato de sodio (10-200 mM) a un pH de 6.5-8.0 se incuba durante 20 min-3h. Bajo estas condiciones, los grupos imino cargados de manera positiva en la molécula de oxaliplatina se conducen en interacción con los grupos cargados de manera negativa en la molécula de DPPG que forma micelos inversos en soluciones etanólicas (ver también la patente de Lipoplatin de EU 6,511,676). Los micelos inversos resultantes de oxaliplatina-DPPG se convierten entonces en liposomas que encapsulan la nanocapa de oxaliplatina-DPPG mediante mezcla rápida con liposomas pre-formados, compuestos de colesterol, fosfatidil colina, mPEG-DSPE (polietileno glicol - diestearoil fosfatidil

(70)

etanolamina), seguida por diálisis contra solución salina y extrusión a través de membranas para disminuir el tamaño de las partículas hasta 80-120 nm de diámetro. La composición lípida de liposomas agregados es la que determina la composición de la superficie externa de la formulación final de oxaliplatina (Figura 1).

EJEMPLO II

A. Experiencia Clínica Preliminar con Oxaliplatina Encapsulada de Manera Liposomal

10 I.A. Estudios animales

Los estudios animales llevados a cabo desde Mayo de 2003 hasta Diciembre de 2004 en EUA, Francia, Suiza y Hellas (Instituto Pasteur, Atenas) en xenoinjertos de ratón por laboratorios independientes han demostrado una mejor eficacia

15 terapéutica de la oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en comparación a la mera oxaliplatina, así como un perfil de menor toxicidad y se demostró tolerarse mejor en ratones y ratas en comparación a la oxaliplatina de fármaco libre. Además, la oxaliplatina encapsulada de manera
20 liposomal podría inducir la completa desaparición o encogimiento de una variedad de cánceres humanos en ratones después de 6-8 inyecciones intravenosas en un tratamiento más eficaz y menos tóxico que la oxaliplatina.

La oxaliplatina encapsulada de manera liposomal ha
25 demostrado inducir la completa desaparición de cánceres de

mama humanos en ratones, después de 6 inyecciones intravenosas con intervalos de 4 días a dosis de 16 mg/kg. Por otro lado, la oxaliplatina de fármaco libre a su MTD (Dosis máxima tolerada) puede causar solo encogimiento, no
5 desaparición de tumores.

Los ratones inyectados con 5 mg/kg de oxaliplatina libre murieron de toxicidad y la dosis se disminuyó hasta 4 mg/kg. La dosis de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal fue de 16 mg/kg i.v. y la toxicidad se disminuyó
10 hasta 4 mg/kg de oxaliplatina libre. La eficacia anticáncer de 4 mg/kg de oxaliplatina libre fue menor de 16 mg/kg de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en animales con tumores humanos.

En dicho estudio, se reportaron estudios animales de una oxaliplatina encapsulada de manera liposomal. La
15 inyección intra-peritoneal (i.p.) de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal o la oxaliplatina libre como un control para ratas se utilizó para estudiar biodistribución de tejido de 10 minutos hasta 7 días después de la inyección. Los
20 niveles máximos de platino total (Pt) en plasma a una dosis de 15 mg/kg fueron de 14.0 mg/ml plasma después de la inyección de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en comparación a 7.5 mg/ml plasma después de tratamiento con oxaliplatina libre; estos niveles se lograron a 10-15 min de
25 la inyección. Se observó un comportamiento fármaco-cinético

similar en plasma para tejido de riñón; el plasma y el riñón
tuvieron los niveles más elevados de platino entre todos los
tejidos examinados durante los primeros 20 min a partir de la
inyección. El tejido de bazo exhibió niveles de platino más
5 de 2 veces mayores después de tratamiento con oxaliplatina
libre en comparación a oxaliplatina encapsulada de manera
liposomal al mismo nivel de dosis durante un periodo
prolongado de 40-190 h después de la inyección. Después de
11 administraciones repetitivas de oxaliplatina encapsulada
10 de manera liposomal en ratas, el bazo logró niveles
sorprendentemente elevados de Pt total entre todos los
tejidos examinados (80 mg/g tejido). El hígado exhibió
farmacocinética similar de acumulación de Pt como una función
de tiempo después de la oxaliplatina libre versus el
15 tratamiento de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal.
En comparación, Lipoplatin® exhibió un comportamiento
farmacocinético similar a la oxaliplatina encapsulada de
manera liposomal en riñón de rata a partir de 10 minutos
hasta 7 días, pero la farmacocinética del hígado fue similar
20 entre los dos grupos hasta 4 h y hubo una mayor acumulación
de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en
comparación a Lipoplatin® durante periodos de 7 días. Los
conteos completos de células sanguíneas y bioquímicos en
ratas han establecido que la oxaliplatina encapsulada de
25 manera liposomal exhibió una menor mielotoxicidad en

comparación a oxaliplatina libre. Los niveles de transaminasa SGOT, fosfatasa alcalina, bilirrubina, creatinina, urea sanguínea y ácido úrico en sangre fueron normales, consistentes con nula toxicidad hepática o nefrotoxicidad proveniente de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en ratas. Los datos muestran una retención más prolongada de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en tejidos de rata consistentes con su formulación PEGilada liposomal y un menor perfil de toxicidad.

Inyecciones de ratas con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal para estudios farmacocinéticos

Para estudios farmacocinéticos, se usaron 20 ratas hembra Wistar de 2-3 meses de edad de un peso corporal promedio de 150 g. Las ratas se inyectaron en la cavidad intraperitoneal con una suspensión de 3 mg/ml de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal, dando una dosis final de 15 mg/kg. Se usaron dos animales por punto de tiempo. Las ratas se sacrificaron a ~7 min, 20 min, 1.5 h, 3.75 h, 24 h, 40 h, 90 h y 170-180 h después de la inyección. La sangre se recolectó en tubos Eppendorf heparinizados y se centrifugó. Los niveles de platino totales en plasma se determinaron usando horno de Absorción Atómica (AA700 Perkin Elmer).

Inyecciones repetidas de ratas con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal para estudios de histología

Estábamos interesados en determinar el daño a

diversos tejidos después de la inyección repetida de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal a su máxima dosis tolerada en ratas.

5 Análisis bioquímico y hematológico en ratas para toxicidad proveniente de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal

Las ratas se inyectaron en la cavidad intraperitoneal con una suspensión de 3 mg/ml de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal, dando una dosis final de 15
10 ó 30 mg/kg. La sangre de ratas usada para los estudios farmacocinéticos en plasma también se analizó (7 días después de la inyección) para médula ósea, funciones renal, hepática y gastrointestinal, por un laboratorio de microbiología independiente. Los parámetros examinados fueron hemoglobina,
15 hematocritos, leucocitos, granulocitos, plaquetas, transaminasa SGOT, transaminasa SGPT, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, urea, ácido úrico y creatinina.

Resultados

20 Toxicología de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en ratas

Las ratas se inyectaron hasta una dosis final de 15 ó 30 mg/kg de Oxaliplatina libre u oxaliplatina encapsulada de manera liposomal. El grupo de 30 mg/kg de oxaliplatina perdió severamente el apetito y exhibió severa pérdida de
25 peso; hubo 33% de pérdida de peso en el grupo de 30 mg/kg de

oxaliplatina a 7 días después del tratamiento; el peso promedio de los animales cayó desde 150 g hasta un promedio de 100 g después de 7 días. Por el contrario, los animales inyectados con la misma dosis de 30 mg/kg de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal, mostraron solo una reducción del 10% en peso (desde un promedio de 150 g hasta el final de 135 g el día 7).

A 7 días después de la inyección, la sangre fue extraída hacia tubos con o sin heparina de los animales tratados con 15 mg/kg y fue dada a un laboratorio clínico independiente para análisis bioquímico y hematológico completo. Se usaron dos animales por grupo. La Tabla 1 muestra el promedio de dos mediciones. El grupo de 15 mg/kg de oxaliplatina muestra una caída en leucocitos hasta 800,000 /mm³ (Toxicidad grado 4 de acuerdo con WHO) en comparación a 3,400,000 /mm³ (Toxicidad Grado 1) para el grupo tratado con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal. Por consiguiente, la oxaliplatina encapsulada de manera liposomal no originó reducción extensa en conteos de leucocitos en comparación a oxaliplatina libre. Los niveles de plaquetas también se redujeron en una mayor extensión por la oxaliplatina en comparación a oxaliplatina encapsulada de manera liposomal. Los niveles de hemoglobina fueron cercanos a lo normal para ambos tratamientos. Por consiguiente, la mielotoxicidad de cualquier fármaco parece dirigirse más a

los leucocitos y plaquetas en vez de a programas de eritropoyesis. La transaminasa SGOT se elevó por cualquier fármaco consistente con toxicidad hepática Grado 2; sin embargo, los niveles de transaminasa SGPT y fosfatasa 5 alcalina no se afectaron; los niveles de bilirrubina, urea sanguínea y creatinina no se afectaron (aunque cayeron los niveles de ácido úrico en sangre) consistente con la ausencia de nefrotoxicidad originada ya sea por oxaliplatina libre u 10 oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en ratas después de administración i.p.

5		Oxaliplatina Ratas i.p. 15 mg/kg 7 días después de la inyección	Oxaliplatina encapsulada de manera liposomal Ratas i.p. 15 mg/kg 7 días después de la inyección	Ratas de control
	Hemoglobina (gr/dl)	15.8	19	16.9
	Hematocrito HCT (%)	42	51.5	45
10	Leucocitos (1,000/mm ³)	800 (Grado 4)	3,400 (Grado 1)	7,500
	Granulocitos (neutrófilos) % de leucocitos	44%	38%	31%
	Plaquetas (1,000/mm ³)	57 (Grado 2)	106 (Grado 0)	624
	Transaminasa SGOT (U/L)	172 (Grado 2)	196 (Grado 2)	84
15	Transaminasa SGPT (U/L)	24	37	42
	Fosfatasa alcalina (U/L)	126	197	105
	Bilirrubina (mg%)	0.71	0.64	0.71
	Úrea en sangre (mg%)	34	24	38
20	Ácido úrico en sangre (mg%)	0.08	0.28	1.7
	Creatinina (mg%)	0.61	0.46	0.33

Tabla 2. Cambios en médula ósea, funciones hepáticas y de riñón en ratas después de inyección i.p. de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal u oxaliplatina libre.

Farmacocinética en ratas

Las ratas se inyectaron en la cavidad intraperitoneal directamente a partir de una solución depósito de 3 mg/ml de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal ó 3 mg/ml de oxaliplatina libre en 5% Dextrosa hasta una dosis final de 15 mg/kg i.p. de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal u oxaliplatina. En diversos puntos de tiempo después de la inyección se extrajo sangre, se aisló plasma y se midieron los niveles totales de platino para estudios farmacocinéticos. La Figura 5A muestra niveles máximos de ~14 mg de platino total /ml plasma después de la oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en comparación a ~8 mg de platino total /ml plasma después de oxaliplatina libre y estos se alcanzaron a 20 min para oxaliplatina encapsulada de manera liposomal y a 10 min para oxaliplatina libre. A aproximadamente 45 min, ambos grupos exhibieron niveles similares de platino total (~5 mg de platino total /ml plasma) mientras que a 4-5 h después de la inyección se obtuvieron niveles debajo de 1 mg de platino total/ml plasma para oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en comparación a ~2 mg de platino total /ml plasma para oxaliplatina libre. A 40 h, los niveles de platino total en plasma de rata cayeron hasta cero para oxaliplatina encapsulada de manera liposomal y hasta ~1 mg de platino total /ml en plasma para oxaliplatina libre; los niveles de

platino totales en plasma de rata alcanzaron cero a ~100 h después de la inyección para oxaliplatina libre (Figura 5B).

5	Plasma						
	Lipoxal® (15 mg/kg)	AUC (h µg/ml)	C _{max} (µg/ml)	Cl (ml/gh)	Kel (1/h)	t _{1/2} (h)	V _{ss} (ml/g)
		53.7	14.0	0.28	0.07	10.2	4.11
10	Riñón						
	Lipoxal® (15 mg/kg)	AUC (h µg/ml)	C _{max} (µg/g)	Cl (1/h)	Kel (1/h)	t _{1/2} (h)	V _{ss}
		460.1	13.7	0.03	0.033	21.00	1.00
15	Plasma						
	Dosis (mg/kg)	AUC (h* µg/ml)	C _{max} (µg/ml)	Cl (ml/g•h)	Kel (1/h)	t _{1/2} (h)	V _{ss} (ml/g)
	15	74.4	76	0.20	N/A	N/A	N/A
15	Riñón						
	Dosis (mg/kg)	AUC (h* µg/g)	C _{max} (µg/g)	Cl (1/h)	Kel (1/h)	t _{1/2} (h)	V _{ss}
	15	#####	10.5	0.01	0.002	346.50	7.18

Tabla 3

En la Tabla 2 se muestran los parámetros farmacocinéticos promedio para platino total, calculados para la dosis de 15 mg/kg de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (Lipoxal®) u oxaliplatina libre.

El AUC, determinado usando el método trapezoidal lineal con extrapolación a infinidad (Gibaldi et al., 1982, Gibaldi M, Perrier D: Análisis sin compartimentos en base a teoría de momento estadístico. En Pharmacokinetics, Gibaldi

M., Perrier D (eds), pp 409-417, 2ª ed. Marcel Dekker: Nueva York, 1982), fue de 53.7 mg.h/ml para oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en comparación a 74.4 mg.h/ml para oxaliplatina.

5 La concentración máxima de platino total en plasma alcanzada (C_{max}) fue de 14.0 mg/ml para oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en comparación a 7.6 mg/ml para oxaliplatina libre. La eliminación corporal total (Cl) fue de 0.28 ml/g.h para oxaliplatina encapsulada de manera
10 liposomal en comparación a 0.20 ml/g.h para oxaliplatina libre. Esto se calculó a partir de $Cl = Di.v./AUC$, donde Di.v. es la dosis i.p. de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal u oxaliplatina libre y AUC el área relativa bajo la curva para esta dosis específica.

15 La constante del índice de eliminación (K_{el}) fue de 0.07 h⁻¹ para oxaliplatina encapsulada de manera liposomal. Esto se calculó por análisis de regresión lineal de la curva de tiempo-concentración en plasma logarítmica por la fórmula $K_{el} = [\ln(Cp1) - \ln(Cp2)] / (t2 - t1)$, donde t1 y t2 son los puntos
20 de tiempo de inicio y de final de las medidas y Cp1 y Cp2 las concentraciones, inicial y final, de platino total en plasma para t1 y t2, respectivamente.

La vida promedio de eliminación ($t_{1/2}$) fue de 10.2 h para la oxaliplatina encapsulada de manera liposomal. Esto
25 se calculó por la fórmula: $t_{1/2} = 0.693(1/k_{el})$. $1/k_{el}$ es el

tiempo de residencia promedio (MRT), la analogía de momento estadístico con la vida promedio $t_{1/2}$ (Gibaldi et al., 1982).

Los niveles totales de platino en plasma de rata también se determinaron en animales tratados con Lipoplatin®, un fármaco de platino liposomal diferente actualmente en evaluación de Fase III (Stathopoulos et al., 2005). Lipoplatin®, una cisplatina liposomal, se dio a 30 mg/kg i.p. Los niveles máximos fueron de ~17 mg platino total /ml plasma después de 30 mg/kg Lipoplatin y estos se alcanzaron a 20 min de la inyección en una estructura de tiempo similar a la oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (Figura 6A). La cisplatina como un control también se administró i.p. a ratas a su máxima dosis tolerada de 5 mg/kg; los niveles máximos fueron de ~7.5 mg de platino total /ml plasma después de cisplatina y estos se alcanzaron a 10 min de la inyección en una estructura de tiempo similar a la oxaliplatina. Los cuatro fármacos dieron comportamiento farmacocinético paralelo después de ~1.5 h posterior a la inyección; sin embargo, a 5h la inyección de Lipoplatin® dio como resultado ~2.5 mg platino total /ml plasma, seguido por oxaliplatina a 2.0 mg platino total /ml plasma, cisplatina a ~1.5 mg de platino total /ml plasma y oxaliplatina encapsulada de manera liposomal a ~1.0 mg platino total /ml plasma.

Biodistribución de platino total en tejidos de rata después de infusión i.p. de oxaliplatina encapsulada de

manera liposomal u oxaliplatina libre

Es útil estudiar la distribución del fármaco de platino en tejido de ratón o rata debido a la exactitud de los resultados y la relativa facilidad de ensayo del platino con absorción atómica. Niveles de platino en riñón: La cantidad máxima de platino total en el riñón fue de 13.7 mg/g tejido después de 15 mg/kg de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en comparación a ~10.5 mg/g de tejido después de 15 mg/kg oxaliplatina y se alcanzó en 7-20 min a partir de la inyección (Figura 7A). Sin embargo, después de aproximadamente 4 h, los niveles de Pt en el riñón alcanzaron un mínimo de 4.8 mg/g de tejido después de oxaliplatina y se incrementaron ligeramente a 6.9 mg/g tejido a 167 h después de la inyección. Después del tratamiento de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal, también hay un mínimo de ~1 mg/g Pt total en tejido en el riñón alcanzado a ~20 h después de la inyección que se incrementó ligeramente a 2.5 mg/g de tejido a 188 h. Por lo tanto, los riñones exhiben aproximadamente niveles 3 veces mayores de Pt después de la oxaliplatina en comparación a la misma dosis de tratamiento con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal a ~7 días después de la inyección (Figura 7B).

Para comparación, Lipoplatin® a 30 mg/kg alcanzó niveles máximos en el riñón de 34 mg/g de tejido en comparación a 10 mg/g de tejido después de 5 mg/Kg

cisplatina.

La farmacocinética en el riñón exhibió un comportamiento similar entre Lipoplatin® y oxaliplatina encapsulada de manera liposomal. El máximo son 34 y 14 mg/g tejido para 30 mg/kg Lipoplatin® y 15 mg/kg oxaliplatina encapsulada de manera liposomal, respectivamente. Esto apoya la similitud en biodistribución de riñón de los dos fármacos que comparten cubierta común pero difieren en el fármaco que confinan en su interior y en los tumores a los que se dirigen. A 120 h, los niveles de platino total en riñón son de 5 mg/g tejido para 30 mg/kg Lipoplatin® en comparación a ~2.5 mg/g tejido para 15 mg/kg de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (Figura 3B). A ~140 h después de la inyección, el platino total es de ~7 mg/g tejido después de 15 mg/kg de oxaliplatina libre en comparación a ~4 mg/g tejido después de 5 mg/kg de cisplatina (Figura 3B).

Conclusión:

Los niveles de Pt en riñones fueron los más elevados entre todos los tejidos de rata a 7 días, seguidos por hígado y bazo.

Niveles de platino en hígado

El platino total en hígado después de 15 mg/kg de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal fue de 3.5 mg/g tejido logrado a ~7-10 min a partir de infusión i.p. con una caída abrupta hasta 2.5 a 20 min y que posteriormente se

mantuvo durante 5 h (Figura 8A). Por el contrario, la infusión de la cavidad intraperitoneal en ratas con oxaliplatina libre a la misma dosis dio como resultado niveles similares de platino en total en el hígado (3.0-3.5 mg/g tejido) que se lograron a aproximadamente 30 min a partir de la infusión, mantenido durante 2h y después disminuyó gradualmente hasta 1.5 mg/g tejido a 5h (Figura 4A). A diferencia del plasma, cuyos niveles de platino cayeron hasta cero después de aproximadamente 40 h, hubo una acumulación de platino en hígado de ~2 mg/g tejido a 170-190 h después de ambos tratamientos con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal y oxaliplatina libre (Figura 8B).

Platino total en el bazo: La cantidad máxima de platino total en el bazo fue de 3.2 mg/g de tejido después de la administración de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal a 15 mg/kg en comparación a ~5.2 mg/g tejido después de 15 mg/kg oxaliplatina y se alcanzó en 15-20 min a partir de la inyección (figura 9A). Hasta ~5 h después de la inyección, hay una ligera disminución de ~2 y ~4 mg/g tejido después de la administración de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal vs. oxaliplatina, respectivamente. Después de esto, hubo un incremento en los niveles de platino total en bazo después de la oxaliplatina encapsulada de manera liposomal hasta ~45h a ~4.5 mg/g tejido seguido por una disminución hasta ~2 mg/g tejido a 190 h. Por el contrario,

existe una acumulación continua de platino total en el bazo después de la infusión de oxaliplatina libre que alcanza 18.5 mg/g tejido a 168 h (Figura 9B). Esto se acompaña por tremenda pérdida en el peso del bazo: a 7 días, presumiblemente como resultado de muerte apoptótica de mesplenocitos, proveniente de la toxicidad a oxaliplatina libre. De hecho, para un ratón de peso corporal promedio de 150 g antes del estudio, el peso corporal final a 7 días fue de 109 g y el peso del bazo fue de 0.188 g. Hubo congestión (acumulación de sangre) en el bazo de animales tratados con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal.

Sin embargo, después de aproximadamente 1 h, los niveles de Pt en el riñón fueron mayores a partir de oxaliplatina libre que de tratamiento con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal; alcanzaron un mínimo a 12-24 h (5 mg/g tejido después de oxaliplatina, 1 mg/g tejido después de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal) y comenzó el incremento de nuevo; a 170 h después de la inyección, el tejido de riñón exhibió 7 mg de Pt/g tejido después de la oxaliplatina y 2.5 mg Pt/g tejido después de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (Figura 5B).

Las mediciones comparativas de platino total en todos los tejidos de rata examinados después de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal y oxaliplatina libre se

resumen en la Figura 10. Los niveles en plasma después de 15 mg/kg oxaliplatina a 20 min de la inyección obtuvieron el nivel más elevado de platino total (14.2 mg/ml) entre todos los tejidos; el tejido de riñón tuvo un nivel elevado comparable a ~10 min después de inyección i.p. de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (13.8 mg/ml) (Figura 10A). Los siguientes niveles incluyen platino en riñón después de oxaliplatina y plasma después de oxaliplatina. El bazo parece ser el siguiente nivel mayor (5 mg/g tejido después de 15 mg/kg oxaliplatina) un nivel que se incrementa continuamente y se vuelve el más elevado después de 24 h e incluso mayor a 170 h (18.5 mg/g tejido). Por consiguiente, el bazo en general finalmente acumula el máximo nivel de platino después de la oxaliplatina. En este aspecto, es obvia la diferencia entre acumulación de platino en bazo después de la oxaliplatina libre u oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (Figura 10B).

Niveles máximos de platino (en mg Pt/ml plasma o por g de tejido) en tejidos de rata (logrados a 7-20 min) después de inyección i.p. de 4 fármacos. (ND, no determinado).

	Fármaco y dosis	Oxaliplatina encapsulada de manera liposomal 15 mg/kg	Oxaliplatina 15 mg/kg	Lipoplatin® 30 mg/kg	Cisplatina 5 mg/kg
5	Riñón	13.7	10.5	33.2	10.2
	Plasma	14.0	7.6	16.6	7.5
	Hígado	3.5	3.1	6.9	2.7
	Bazo	3.1	5.1	3.5	1.1
	Pulmón	3.7	3.2	7.5	2.0
	Corazón	1.8	1.1	4.5	0.8
	Cerebro	ND	ND	1.7	0.3
	5h				
10	Fármaco y dosis	Oxaliplatina encapsulada de manera liposomal 15 mg/kg	Oxaliplatina 15 mg/kg	Lipoplatin® 30 mg/kg	Cisplatina 5 mg/kg
	Riñón	2.0	5.0	4.2	6.8
	Plasma	0.9	1.7	2.4	1.1
	Hígado	2.4	1.5	6.8	2.4
	Bazo	1.8	3.8	2.7	1.2
15	Pulmón	0.8	1.7	0.6	0.7
	Corazón	0.3	0.8	0.2	0.2
	Cerebro	ND	ND	0.1	0.1
	5-7 días				
	Fármaco y dosis	Oxaliplatina encapsulada de manera liposomal 15 mg/kg	Oxaliplatina 15 mg/kg	Lipoplatin® 30 mg/kg	Cisplatina 5 mg/kg
20	Riñón	2.5	6.9	5.2	4.1
	Plasma	0	0	0.1	0.1
	Hígado	2.2	1.8	3.5	1.1
	Bazo	2.3	18.5	4.9	1.5
	Pulmón	0.4	2.4	0.2	0.3
	Corazón	0.6	0.5	0.1	0.1
25	Cerebro	ND	ND	0.1	0

Tabla 4. Comparación de niveles totales de platino en diversos tejidos de rata después de Oxaliplatina Liposomal, Oxaliplatina libre, Cisplatina Liposomal y Cisplatina libre a 7-20 min, 5 h y 5-7 días después de la inyección.

5

El riñón, bazo e hígado tienen niveles significativos de Pt a 5-7 días después del tratamiento con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal.

10. El bazo, riñón, pulmón e hígado tienen niveles significativos de Pt a 5-7 días después del tratamiento con Oxaliplatina libre.

El riñón, bazo e hígado tienen niveles significativos de Pt a 5-7 días después del tratamiento con Lipoplatin®.

15

El riñón, bazo e hígado tienen niveles significativos de Pt a 5-7 días después del tratamiento con Cisplatina.

20 Los datos muestran que después de 15 mg/kg i.p. de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en comparación a 15 mg/kg i.p. de Oxaliplatina libre:

1. Los niveles de plasma en platino total son de 14 mg/ml plasma después de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal, los niveles de plasma en platino total son de 7.6 mg/ml plasma después de Oxaliplatina.

25

Se alcanza el máximo en aproximadamente 7-20 min a

partir de inyección i.p.

Esto demuestra mayor circulación de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en comparación a Oxaliplatina.

5 2. Los niveles en riñón son mayores con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (14 mg/g tejido) en comparación a Oxaliplatina libre (11 mg/g en los 15 min iniciales a partir de inyección, pero a 1.5 h y posteriormente los niveles en el riñón se vuelven mayores con
10 Oxaliplatina libre (6.7 mg/g tejido) en comparación a oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (2.3 mg/g a 1.5 h).

3. Los niveles en el bazo son mayores con Oxaliplatina libre (3.8 mg/g tejido) en comparación a
15 oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (1.8 mg/g) a 1.5 h después de la inyección.

4. Los niveles en el corazón son comparables y bajos entre los dos fármacos.

Niveles de platino en plasma: La máxima cantidad de
20 platino total en el plasma es de 14 mg/ml después de 15 mg/kg i.p. de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en comparación a ~7.5 mg/ml tejido después de 15 mg/kg Oxaliplatina y se alcanza en 7-20 min a partir de la inyección (Figura 10A). Sin embargo, después de
25 aproximadamente 1 h, los niveles de Pt en el plasma se

vuelven mayores a partir de oxaliplatina libre que a partir de tratamiento con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal y esto se mantiene a través de todo el resto de la curva hasta 50 h, donde los niveles para oxaliplatina encapsulada de manera liposomal se vuelven cero y hasta ~100 h, donde los niveles para Oxaliplatina libre se vuelven cero.

Niveles de platino en riñón: La cantidad máxima de platino total en el riñón es de 13.5 mg/g tejido después de 15 mg/kg de Lipoxal en comparación a ~10.5 mg/g tejido después de 15 mg/kg Oxaliplatina y se alcanza en 15-20 min a partir de la inyección (Figura 10A). Sin embargo, después de aproximadamente 4 h, los niveles de Pt en el riñón alcanzan un mínimo de 4.8 mg/g tejido después de oxaliplatina libre y ligeramente se incrementan hasta 6.9 g/g tejido a 167 h después de la inyección. Después del tratamiento con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal, también hubo un mínimo de ~1 mg/g tejido, Pt total en el riñón se alcanzó a ~20 h después de la inyección con incrementos ligeros hasta 2.5 mg/g tejido a 188 h. Por lo tanto, los riñones exhiben niveles aproximadamente 3 veces mayores de Pt después de oxaliplatina libre en comparación a la misma dosis de tratamiento con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal a ~7 días después de la inyección. Los niveles de Pt en riñones son los mayores entre todos los tejidos de rata a 7 días seguidos por el hígado y bazo.

Niveles de platino en bazo: La máxima cantidad de platino total en el bazo es de 14 mg/g tejido después de 15 mg/kg de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal en comparación a ~7 mg/g tejido después de 15 mg/kg Oxaliplatina libre y se alcanza en 15-20 min a partir de la inyección (Figura 10A). Sin embargo, después de aproximadamente 1 h, los niveles de Pt en el riñón son mayores a partir de oxaliplatina libre que de tratamiento con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal, muestran un mínimo a aproximadamente 12-24 h (5 mg/g tejido después de oxaliplatina, 1 mg/g tejido después de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal) y comienzan a incrementarse nuevamente; a 170 h después de la inyección, el tejido de riñón exhibe 7 mg Pt/g tejido después de oxaliplatina libre y 2.5 mg Pt/g tejido después de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (Figura 10A).

Tratamiento de Fármaco que Da Como Resultado Diferencias de Peso y Reducción en Tamaño de Tejido

Los animales que se trataron con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (15 mg/kg) y Oxaliplatina libre (15 mg/kg) y se sacrificaron 7:8 y 7 días después de inyección i.p. del fármaco, exhiben ciertas grandes diferencias tanto en pérdida de peso total como en peso de órganos individuales.

	Fármaco	Oxaliplatina Liposomal 15 mg/kg	Oxaliplatina 15 mg/kg
5	Tiempo transcurrido después de administración i.p.	7.8 días	7 días
	Peso animal	167 gr	106 gr
	Órgano	Peso de órgano animal total (g)	
	Pulmón	1.059	0.934
	Corazón	0.604	0.523
	Riñón	0.645	0.475
	Bazo	0.617	0.188

10 Tabla 5. Reducción en peso corporal como resultado de
caquexia después de tratamiento con oxaliplatina. Los
animales tratados con dosis comparables de oxaliplatina
liposomal exhiben menos peso total o reducción de peso de
órganos. El bazo parece ser el tejido más afectado por
15 oxaliplatina libre.

Los animales tratados con Oxaliplatina libre
exhiben una gran pérdida de peso durante los 7 días después
de la administración del fármaco, lo cual se estima sobre 40
20 gr de peso corporal total al momento del tratamiento.
Además, existe una reducción significativa en el tamaño del
tejido del bazo, lo cual se refleja en un valor
extremadamente elevado de concentración de Pt (18.5 mg Pt/g
de tejido).

25 La pérdida de apetito después de la administración

de Oxaliplatina y toxicidad del fármaco, dieron como resultado la pérdida de peso y reducción del tamaño del bazo; observados aquellos fenómenos en animales sacrificados 7 días después de la administración del fármaco y por consiguiente
5 exhibieron valores de concentración de Pt. elevados en diagramas de tejido de Oxaliplatina libre a 7 días después de inyección I.P.

El mismo impacto podría considerarse con respecto a otro tejido, siempre y cuando los valores de concentración de
10 Pt en todos los diagramas de tejido de Oxaliplatina libre (Hígado, Pulmón, Corazón, Bazo, Riñón) en el punto de tiempo: 7 días, exhiban un incremento.

Los ratones inyectados con 5 mg/kg de Oxaliplatina murieron de toxicidad y la dosis se disminuyó a 4 mg/kg. La
15 dosis de Lipoxal fue de 16 mg/kg i.v. y la toxicidad fue menor de 4 mg/kg oxaliplatina. La eficacia anticáncer de 4 mg/kg oxaliplatina fue menor que la de 16 mg/kg Lipoxal en animales con tumores humanos.

EJEMPLO 2B

20 Un Estudio Clínico de Fase I

El propósito del estudio fue a) estimar las reacciones adversas y detectar la toxicidad limitante de dosis (DLT) así como la dosis máxima tolerada (MTD) de la oxaliplatina encapsulada de manera liposomal. Pacientes y
25 métodos: En total, se incluyeron 27 pacientes con enfermedad

avanzada en el estudio. Todos los pacientes se pre-trataron con la quimioterapia estándar de acuerdo con los lineamientos establecidos. Al entrar al presente ensayo, todos se encontraban en enfermedad progresiva o recurrente. Todos los pacientes tenían cánceres gastrointestinales de etapa IV (cánceres colorrectal, gástrico y pancreático). Establecimos seis niveles diferentes de dosis de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal y en cada nivel se incluyeron al menos 3 pacientes. Los niveles de dosis fueron: 1) 100 mg/m² 2) 150 mg/m² 3) 200 mg/m² 4) 250 mg/m² 5) 300 mg/m² 6) 350 mg/m². Se trataron ocho pacientes adicionales a 300 mg/m² como un MTD. El tratamiento se dio una vez a la semana durante tres semanas consecutivas, repetidas cada 4 semanas. Resultados: No se observó ningún efecto secundario serio en los primeros cuatro niveles de dosis (100-250 mg/m²). En los niveles 5 y 6 se observaron mielotoxicidad y náusea ligeras. La reacción adversa más común fue la neuropatía periférica de grado II y se observó en los 4 pacientes tratados a 350 mg/m². Por consiguiente, consideramos DLT el nivel de 350 mg/m² y MTD el nivel de 300 mg/m². De los 27 pacientes, tres mostraron respuesta parcial y 18 pacientes tuvieron enfermedad estable durante 4 meses, rango mediano (2-9). Conclusión: En el presente estudio de Fase I, encontramos que la toxicidad más común es la neuropatía periférica a los niveles de dosis de 300 y 350 mg/m². La oxaliplatina encapsulada de manera

liposomal se tolera bien y reduce significativamente todos los otros efectos secundarios de la oxaliplatina libre, especialmente la mielotoxicidad y toxicidades del tracto G.I. Estos resultados preliminares mostraron eficacia adecuada en 5 pacientes pre-tratados.

Dicho estudio fue un ensayo clínico con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (Lipoxal®) con los siguientes objetivos primarios: a) definir la toxicidad limitante de dosis (DLT) y dosis máxima tolerada (MTD) de dosis en escala de una administración semanal de Lipoxal, b) detectar el perfil de toxicidad y farmacocinética de monoterapia de lipoxal en pacientes de cáncer de tracto G.I. avanzado, pre-tratados. Los objetivos secundarios fueron la eficacia y supervivencia.

15. Pacientes y métodos

El estudio fue un ensayo de elevación de dosis, cohorte de fase I, de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal. El protocolo del estudio se revisó y aprobó por nuestro Panel de Revisión Institucional. Un documento de consentimiento informado que satisface todos los requisitos institucionales se lee por los pacientes y se firma como una condición de su registro.

Criterios de Elección

Se requirió que todos los pacientes cumplieran los siguientes criterios: diagnóstico histológico o citológico

confirmado de cáncer, al menos una enfermedad bidimensionalmente medible o evaluable, estado de desempeño WHO 0-2, una expectativa de vida mayor de 3 meses, tratamiento previo por quimioterapia estándar o de primera línea y al momento de la entrada haber sido refractario a cualquier tratamiento citotóxico previo. Los pacientes eran elegibles si habían tenido dos o tres procedimientos previos, considerando que se encontraban sin tratamiento durante al menos 3 semanas.

10 Determinación

Los pacientes elegibles sobre 18 años de edad se requirió que tuvieran funciones hematológicas, renales y hepáticas adecuadas, como se define por conteo WBC $3.5 \times 10^9/l$, conteo neutrófilo absoluto $1.5 \times 10^9/l$, conteo de plaquetas $100 \times 10^9/l$, nivel de hemoglobina 9 g/dl, nivel de bilirrubina total 1.5 mg/dl, ALT y AST dos veces el límite normal superior en ausencia de metástasis de hígado o cinco veces el límite normal superior en caso de metástasis de hígado documentada y nivel de creatinina 1.5 mg/dl. La historia médica, examen físico, determinación de signos vitales, electrocardiograma, tomografía computada de pecho y abdominal (o ultrasonido) se llevaron a cabo antes del tratamiento. Durante el tratamiento (1 día antes de cada procedimiento) se realizó conteo sanguíneo, urea y azúcar en sangre, pruebas de creatinina y ácido úrico en suero y ECG.

Las determinaciones por explorador CT se realizaron después de infusiones de fármaco de al menos ocho semanas o con anterioridad en el progreso de la enfermedad.

Tratamiento

5 Características del fármaco: Se proporcionaron en 3 mg/ml, 50 ml por frasco de vidrio, 150 mg de oxaliplatina por frasco de vidrio. Se almacena oxaliplatina encapsulada de manera liposomal a 4 grados Celsius, apariencia opaca. Características de un fármaco Liposomal: la oxaliplatina
10 encapsulada de manera liposomal se diluye en 1 lt de dextrosa al 5% y se da en infusión intravenosa a 3 horas, una vez a la semana durante 8 semanas consecutivas. En caso de efectos secundarios y en particular de mielotóxicidad o neurotoxicidad el retraso de la administración del
15 tratamiento tomaría lugar por una semana. No fue necesaria pre- o post-hidratación. No planeó darse ningún otro fármaco, tal como anti-hemético o anti-alérgico. En caso de náusea o vómito, se dio soporte por antieméticos (Ondasetron) o antialérgico (Dexametasona).

20 En estudios animales que precedieron, 400 mg/m² a 600 mg/m² se definieron como el MTD. En humanos, decidimos comenzar a una dosis de 100 mg/m² para el nivel uno. El incremento de dosis se decidió en 50 mg/m² por nivel. En la tabla 1, se presenta la elevación de dosis de la oxaliplatina
25 encapsulada de manera liposomal por grupo de pacientes.

140

Las toxicidades relacionadas con fármaco se evaluaron durante cada ciclo de terapia y se calificaron de acuerdo con criterios WHO. Se definió un DLT como cualquier toxicidad de Grado 3 ó 4, con conteo neutrófilo de $<500 \text{ mm}^2$ asociado con fiebre persistente más de 72 horas, en 50% de los pacientes. Otra toxicidad de Grado III y en particular neurotoxicidad también se consideró DLT si se observaba en al menos 50% de los pacientes. Un nivel de dosis menor del DLT se definió como MTD. Los cohortes de tres pacientes por lo menos se programaron para entrar en cada nivel de dosis. El aumento de la dosis al siguiente nivel mayor procedía después de que tres pacientes habían recibido el primer ciclo de terapia con la dosis precedente y cada uno se observaba durante al menos 3 semanas sin evidencia de un DLT. Se inscribían dos pacientes adicionales a un nivel de dosis dado si el primer paciente de ese nivel experimentaba un DLT, en el primer periodo de 3 semanas de tratamiento. El tratamiento se interrumpía con la ocurrencia de un DLT y el paciente continuaba en el nivel anterior.

20 Farmacocinética

Para el estudio de farmacocinética, los pacientes se sangraban en las siguientes horas. 0 (antes de la infusión del fármaco y después de iniciar la infusión 2, 4, 8, 24, 48, 72, 120 (5 días) y 168 (7 días) horas. Se extrajeron 3 ml de sangre en EDTA o tubos que contienen

heparina, después se centrifugó y refrigeró a 2°C y eventualmente se envió al laboratorio para analizarse respecto a niveles de platino. Se usó una muestra de 5 pacientes. Los niveles de platino (ultrafiltrados en suero y totales) se midieron con absorción atómica (Perkin Elmer AA 700 Espectrómetro de Absorción Atómica de Horno de Grafito Perkin Elmer AA 700 en Regulon A.E.). Se encontró a ciertos niveles de dosis ... (200 mg y 300 mg/m²): el área bajo la curva de tiempo-concentración de plasma (AUC), la C_{max} (concentración máxima de platino total en suero). La eliminación corporal total (Cl) se calculó a partir de $Cl = Div / AUC$, donde Div es la dosis intravenosa de Lipoplatin® y AUC el área relativa bajo la curva para una dosis específica. La Kel (constante de índice de eliminación) se calculó por análisis de regresión lineal de la curva de tiempo-concentración de plasma logarítmica a partir de la fórmula $Kel = [Ln(Cp1) - Ln(Cp2)] / (t2 - t1)$ donde t1 y t2 son los puntos de tiempo de inicio y final de mediciones y Cp1 y Cp2 las concentraciones, inicial y final, del platino total en suero para t1 y t2, respectivamente.

El t_{1/2} (tiempo promedio de eliminación) se calculó a partir de la fórmula $t_{1/2} = 0.693 (1/kel)$. 1/kel es el MRT (Tiempo de Residencia Promedio), la analogía del momento estadístico respecto a t_{1/2} promedio (Gibaldi et al., 1982).

En efecto, MRT representa el tiempo para que se elimine 63.2%

de la dosis administrada.

Resultados

Pacientes

Las características de los pacientes se muestran en la tabla 5. Se inscribieron en total 27 pacientes. Edad 32-78, edad promedio 62; hombres 18, mujeres 9. P.S. 0-2. Todos los pacientes se habían tratado previamente por quimioterapia. Tratamientos previos por tumor.

Toxicidad

La toxicidad del tracto G.I. por oxaliplatina encapsulada de manera liposomal fue insignificante. Sin antieméticos (Ondosetron), no se observaron náusea ni vómito moderado. Pero con ondosetron no se observó ni vómito ni náusea. Tampoco diarrea. Solo se observó mielotoxicidad moderada de grado 1 (neutropenia) en 2 pacientes (%) con la dosis más elevada dada (350 mg/m²). No se observó hepatotoxicidad, ni toxicidad renal, ni cardiotoxicidad, ni alopecia. Se observó astenia moderada en 3 pacientes.

El principal efecto secundario fue la neurotoxicidad, la cual se observó después de al menos 3 infusiones de los agentes y fue de grado 1 en el 3^{er} y 4^o niveles y de grado 2 en el 5^o nivel y de grado 2 en 100% de los pacientes en el 6^o nivel.

Sobre la base de estos resultados, la neurotoxicidad de grado III se consideró como la toxicidad

limitante de dosis observada en 100% de los pacientes tratados con 350 mg/m² de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal. La dosis bajo 300 mg/m² se definió como la máxima dosis tolerada (MTD). En la tabla 5, se presentan el aumento de dosis de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal y el número de pacientes tratados en cada uno de los seis niveles.

Farmacocinética: Los resultados se representan en la Tabla 7 y en las Figuras 15 y 16. Se encontró que la vida promedio de la oxaliplatina en concentración de plasma fue de 10.24 horas y la secreción de orina se integra en 7 días.

Cumplimiento del tratamiento

Se administró un número total de 104 infusiones (ciclos) con una media de 4 ciclos por paciente (variando de 2-15). El intervalo promedio entre ciclos fue de 7 días. La intensidad de la dosis fue de 100% lo planeado. Ningún paciente tuvo un retraso en el tratamiento ya que no se detectó toxicidad hematológica de grado III ó IV. Solo los pacientes con dosis de 350 mg/m² después de la mayoría de 4 ó 5 infusiones (ciclos) tuvieron un intervalo de dos semanas antes de clasificarse en la dosis inferior de 300 mg/m². Algunos pacientes detuvieron el tratamiento debido al progreso de la enfermedad después de 4-6 ciclos. Esto se aplicó en 17 pacientes (62.9%). Doce pacientes aún vivían al final del estudio (44.4%). Las causas de muerte fueron el progreso de la enfermedad.

Respuestas al tratamiento

Las respuestas se analizaron sobre una base de intención-a-tratar. No hubo respuestas completas. 3 pacientes de 27 (11.1%) mostraron respuesta parcial. Estos 5 pacientes fueron 2 con cáncer gástrico, uno con efusión pleural y el otro con metástasis de hueso; el tercero fue un paciente con metástasis de hígado proveniente de carcinoma de colon. La detección de la respuesta parcial se basó en explorador CT para el primer paciente, con exploración ósea en el segundo paciente y para el tercer paciente con exploración CT y nivel en suero de bilirrubina. Se presentan dos figuras: exploración ósea de la fig. 1 antes y después del tratamiento para el segundo paciente y curva de nivel en suero de bilirrubina en el tercer paciente.

15. Excepcionalmente, tratamos al tercer paciente mientras el nivel de bilirrubina en suero era de 51 mg/dl, lo cual después de 2 tratamientos disminuyó el nivel hasta 8 mg/dl y duró 5 semanas.

La duración de la respuesta fue de 4, 7, 2 meses para cada paciente, respectivamente. 18 pacientes mostraron enfermedad estable (66.66%) con una duración promedio de 4 meses (rango 2-9 meses). 5 de los pacientes pudieron clasificarse, de acuerdo con una clasificación ya no válida a respuestas menores. 6 pacientes mostraron progreso de la enfermedad. En los 3 grupos que respondieron al tratamiento,

también hubo una reducción del 50% o más del marcador CA-19-9. También, el nivel de estado del desempeño se mejoró de 2 a 1 en los 3 grupos que respondieron al tratamiento.

Conclusión

5 La oxaliplatina encapsulada de manera liposomal se ha examinado en el presente ensayo (ejemplo) como una monoterapia (tratamiento individual) en pacientes con cáncer avanzado del sistema gastrointestinal. Todos los pacientes se pre-trataron por un tratamiento estándar y todos los
10 pacientes colorrectales incluidos también se habían tratado con oxaliplatina libre. Este tratamiento con oxaliplatina encapsulada de manera liposomal solo se había examinado antes en estudios pre-clínicos. No se había llevado a cabo ningún otro ensayo clínico. El presente ensayo se basa en los datos
15 de los estudios pre-clínicos y en la experiencia y datos de la oxaliplatina no liposomal (libre). Lo último ayudó principalmente en enfocar nuestro presente ensayo a estimar las similitudes o diferencias de la oxaliplatina encapsulada de manera liposomal versus la oxaliplatina pura (libre). Los
20 efectos secundarios hematológicos y en tracto G.I. se mostró que se reducen en gran medida. El único efecto secundario que permaneció sin diferencia alguna - cualquier reducción, fue la neurotoxicidad. Eso se observó con frecuencia, incrementado de manera más o menos análoga con el incremento
25 de la dosis del agente y actuó como el único o principal

criterio para definir la toxicidad limitante de dosis. La dosis definida por MTD fue de 300 mg/m² administrada semanalmente. También hubo una neurotoxicidad aditiva como sucede también con la oxaliplatina liposomal (ref.). Con respecto a la eficacia de 11% de índice de respuesta observado en pacientes pre-tratados refractarios a tumores establecidos, previos, podría tener cierto significado para futuros ensayos en una modalidad de quimioterapia combinada. También es importante señalar que los tipos de cáncer seleccionados para este ensayo no son de los más sensibles a quimioterapia.

Este estudio ha establecido una MTD y se necesita investigación adicional en particular con otros agentes en combinación.

Como resultado, este ejemplo muestra que la oxaliplatina liposomal es un agente bien tolerado. La dosis de 300 mg/m² se definió como MTD. Las toxicidades en médula ósea y tracto G.I. son mucho muy reducidas en comparación a la forma pura de la oxaliplatina. La única reacción adversa que permanece es la neurotoxicidad que es la que define la DLT.

Nivel de dosis	Número de pacientes	Lipoxal® (mg/m ² por semana)
I	3	100
II	3	150
III	5	200
IV	4	250
V	4+4	300
VI	4	350

Lipoxal		
Aumento de dosis de Lipoxal		
Nivel de dosis	Número de pacientes	Lipoxal (mg/m ² por semana)
I	3	100
II	3	150
III	5	200
IV	4	250
V	4+4	300
VI	4	350

Tabla 6. Aumento de dosis de oxaliplátina encapsulada de manera liposomal (Lipoxal®)

		N	(%)
Pacientes en total		27	(100)
Edad, años			
Mediana	62		
Rango	32-78		
5 Hombre		18	(66.66)
Mujer		9	(33.33)
PS			
0		2	(7.40)
1		14	(51.85)
2		11	(40.74)
Etapa			
IV		27	(100)
10 Tumor primario			
Colo-rectal		12	(44.44)
Páncreas		8	(29.62)
Estómago		4	(14.81)
Biliar		2	(7.41)
Hígado		1	(3.70)
Histología			
Adenocarcinoma		27	(100)

15

	► Etapa de la enfermedad	
	IV	27 (100)
	► Tumor primario	
	Colo-rectal	12 (44.44)
	Páncreas	8 (29.62)
	Estómago	4 (14.81)
20	Biliar	2 (7.41)
	Hígado	1 (3.70)
	► Histología	
	Adenocarcinoma	27 (100)
	► Quimioterapia previa	

Tabla 7. Características de los pacientes de línea de base

25

Dosis (mg/m ²)	C _{max} (µg Pt/ml)	AUC (µg Pt*h/ml)	Cl (L/h*m ²)	K _{el} (1/h)	t _{1/2} (h)	V _{ss} (L/m ²)
250	9.175	424.4	0.289	0.028	24.3	9.7
350	12.087	782.3	0.219	0.020	35.5	10.9

Tabla 8. Estimados del parámetro farmacocinético de plasma para Lipoxal en pacientes (ver texto para definiciones de parámetros)

Toxicidad	Nivel de Dosis	Número de pacientes		
		Grado		
		I	II	III
Náusea vómito (sin....)	II	2	-	-
Neurotoxicidad	III	2	-	-
Neurotoxicidad	IV	3	-	-
Neurotoxicidad	V	2	3	-
Neurotoxicidad	VI	1	2	1
Renal	Todos los niveles	-	-	-
Cardiotoxicidad	Todos los niveles	-	-	-
Hepatotoxicidad	Todos los niveles	-	-	-
Alopecia	Todos los niveles	-	-	-
Astenia	Todos los niveles	-	-	-

Lipoxal

Respuesta a tratamiento

- 20 ► No se observó CR.
- 3 de 27 pacientes mostraron PR (11.1%)
- Dos de 3 fueron pacientes con cáncer gástrico avanzado
(.....).
- Uno fue paciente con cáncer colorrectal - metástasis de
- 25 Hígado - (ictericia).

► Duración de la respuesta 4, 7, 2 meses.

18 pacientes de enfermedad estable (66.66%)

duración promedio de 4 meses (rango 2-9)

5 5 pacientes con enfermedad en progreso

Referencias

1. De Gramont A, Vignond J, Tournigand C, et al.:
Oxaliplatina con leucovorin a dosis elevada e infusión de 5-
10 fluorouracilo 48 h continuas en cáncer colorrectal
metastásico pre-tratado. Eur Cancer 33: 214-219, 1997.
2. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, et al.:
Ensayo aleatorizado, multicentral de fase III de oxaliplatina
agregada a fluorouracilo-leucovorin cronomodulado como
15 tratamiento de primera línea de cáncer colorrectal
metastásico. J Clin Oncol 18: 136-147, 2000.
3. De Gramont A, Figer A, Seymour M, et al.:
Leucovorin y fluorouracilo con o sin oxaliplatina como
tratamiento de primera línea en cáncer colorrectal avanzado.
20 J Clin Oncol 18: 2938-2947, 2000.
4. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, et al.:
Ensayo aleatorizado multicentral de Fase III de oxaliplatina
agregada a fluorouracilo-leucovorin cronomodulado como
tratamiento de primera línea de cáncer colorrectal
25 metastásico. J Clin Oncol 18: 136-147, 2000.

5. Souglakos J, Mavroudis D, Kakolyris S, et al.:
Combinación triple con irrinotecan más oxaliplatina más
fluorouracilo de infusión continua y leucovorin como
tratamiento de primera línea en cáncer colorrectal
5 metastásico: un ensayo multicentral de fase II. J Clin Oncol
20: 2651-2657, 2002.

6. Schethauer W, Kornek GV, Raderer M, et al.:
Ensayo aleatorizado multicentral de fase II de dos diferentes
esquemas de capecitabina más oxaliplatina como tratamiento de
10 primera línea en cáncer colorrectal avanzado. J Clin Oncol
21: 1307-1312, 2003.

7. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, et al.: Un
ensayo controlado aleatorizado de fluorouracilo más
combinaciones de leucovorin, irinotecan y oxaliplatina en
15 pacientes con cáncer colorrectal metastásico previamente no
tratado, J. Clin Oncol 22: 23-30, 2004.

8. Sorbye H, Glimelius B, Berglund A, et al.:
Estudio multicentral de fase II de programa de bolo de
fluorouracilo nórdico y ácido folínico combinado con
20 oxaliplatina como tratamiento de primera línea de cáncer
colorrectal metastásico. J Clin Oncol 22: 31-38, 2004.

9. Cassidy J, Misset JL: Efectos secundarios
relacionados con oxaliplatina: características y manejo.
Semin Oncol 29 (Suppl 15), 11-20, 2002.

25 10. Cassidy J, Misset JL: Efectos secundarios

relacionados con oxaliplatina: características y manejo. Semin Oncol 29 (Suppl 15), 11-20, 2002.

11. Jerremalm E., Eksborg S, Ehrsson H: Hidrólisis de evaluación de oxaliplatina de la constante de disociación ácida para el complejo monodentado de oxalato. J Pharm Sci 92: 436-8, 2003.

12. Spingler B, Whittington Da, Lippard SJ: estructura de cristal 2.4 de un intra-filamento 1,2-d de oxaliplatina (GpG) degradado en dodecámero dúplex de ADN. Inorg Chem 40: 5596-602, 2001.

13. Arnould S, Hennebelle I, Canal P, Bugat R, Guichard S: Determinantes celulares de sensibilidad a oxaliplatina en líneas celulares de cáncer de colon. Eur J Cancer 39: 112-9, 2003.

14. De Vita F, Orditura M, Matano E, Bianco R, Carlomagno C, Infusino S, Damiano V, Simeone E, Diadema MR, Lieto E, Castéllano P, Pepe S, De Placido S, Galizia G, Di Martino N, Ciardiello F, Catalano G, Bianco AR. Un estudio de fase II de oxaliplatina dos veces a la semana más 5-fluorouracilo infusional y ácido folínico (FOLFOX-4) como tratamiento de primera línea de pacientes con cáncer gástrico avanzado. Br J Cáncer Mayo 9, 92 (9): 1644-1649, 2005.

15. Lersch C, Schmeiz R, Eckel F, Erdmann J, Mayr M, Schuite-Frohlinde E, Quasthoff S, Grosskreutz J, Adelsberger H: Prevención de neuropatía sensorial periférica

inducida por oxaliplatina mediante carbamazepina en pacientes con cáncer colorrectal avanzado. Clin Colorectal Cancer 2: 54-8, 2002.

5 CRF Lipoxal

200 mg/m² semanal

Nombre (o código) de Participante: --Psa.Ath.

Tipo de cáncer: estómago, Etapa: IV

Antes de Tratamiento de Lipoxal

10 FUNCIÓN DE LA MÉDULA ÓSEA

HEMOGLOBINA (gr/dl) 13.0

LEUCOCITOS (1,000/mm³) 3.7

PLAQUETAS (1,000/mm³) 207

FUNCIÓN RENAL

15 UREA EN SANGRE (mg%) 22

CREATININA (mg%) 0.4

ÁCIDO ÚRICO (mg%) 4.3

7 Días después de 4^a Infusión de Lipoxal

FECHA la sangre se extrajo para examinación bioquímica

20 2/11/2004

UNA FUNCIÓN DE MÉDULA

HEMOGLOBINA (gr/dl) 12.3

LEUCOCITOS (1,000/mm³) 7.1

PLAQUETAS (1,000/mm³) 315

25 FUNCIÓN RENAL

UREA EN SANGRE (mg%)	15
CREATININA (mg%)	0.5
ÁCIDO ÚRICO (mg%)	4.1

7 Días después de 9ª Infusión de Lipoxal

5. FUNCIÓN DE MÉDULA

HEMOGLOBINA (gr/dl)	9.8
LEUCOCITOS (1,000/mm ³)	2.6
PLAQUETAS (1,000/mm ³)	277

FUNCIÓN RENAL

10 UREA EN SANGRE (mg%)	17
CREATININA (mg%)	0.40
ÁCIDO ÚRICO (mg%)	3.5

7 Días después de 12ª Infusión de Lipoxal

FUNCIÓN DE MÉDULA ÓSEA

15 HEMOGLOBINA (gr/dl)	11.1
LEUCOCITOS (1,000/mm ³)	6.1
PLAQUETAS (1,000/mm ³)	263

FUNCIÓN RENAL

UREA EN SANGRE (mg%)	29
20 CREATININA (mg%)	0.51
ÁCIDO ÚRICO (mg%)	4.8

EJEMPLO III

CISPLATINA LIPOSOMAL COMBINADA CON GEMCITABINA EN PACIENTES
DE CÁNCER PANCREÁTICO AVANZADO, PRE-TRATADOS: UN ESTUDIO DE

25 FASE I-II

Propósito: El ensayo actualmente descrito es un estudio de fase I-II en base a nueva cisplatina encapsulada de manera liposomal (producida bajo la marca Lipoplatin® por Regulon Inc. de Mountain View, CA). Los datos preclínicos y
5 clínicos previos (farmacocinética de Fase I) conducen a la investigación de una modalidad de tratamiento combinado que involucra Lipoplatin® y gemcitabina.

Pacientes y Métodos: La dosis de gemcitabina se mantuvo estándar a 1000 mg/m² y la dosis de lipoplatina se
10 aumentó desde 25 mg/m² hasta 125 mg/m². El tratamiento se administró a pacientes de cáncer pancreático pre-tratado, avanzado, quienes fueron refractarios a quimioterapia previa que incluyeron gemcitabina.

Resultados: Lipoplatin® a 125 mg/m² se definió como
15 toxicidad limitante de dosis (DLT) y 100 mg/m² como la máxima dosis tolerada (MTD) en combinación con 1000 mg/m² de gemcitabina. Los datos de índice de respuesta objetiva preliminar mostraron una respuesta parcial en 2/24 pacientes (8.3%), estabilidad de enfermedad en 14 pacientes (58.3%)
20 para una duración promedio de 3 meses (rango de 2-7 meses) y beneficio clínico en 8 pacientes (33.3%).

Conclusión: La cisplatina encapsulada de manera liposoma es un agente alternativo no tóxico para cisplatina pura. En combinación con gemcitabina, tuvo una MTD de 100
25 mg/m² y muestra eficacia prometedora en cáncer pancreático

refractario.

Cisplatina, ($\text{cis-PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$) se utiliza a nivel mundial para el tratamiento de cáncer testicular y de ovarios así como para tumores de vejiga, cabeza, cuello, pulmón y gastrointestinales y muchos otros. 1-7 Aunque muy eficaces contra estos tumores, la cisplatina se ha asociado con severos efectos secundarios que incluyen nefrotoxicidad, ototoxicidad, neurotoxicidad, náusea y vómito. 7-9 Carboplatina, un análogo de cisplatina, es notablemente menos tóxico para los riñones y sistema nervioso que la cisplatina y origina menos náusea y vómito, aunque en general (y ciertamente para cáncer de ovario y cáncer de pulmón de célula pequeña) retiene actividad anti-tumor equivalente. Sin embargo, los efectos adversos hematológicos son más frecuentes con carboplatina que con cisplatina. (10, 11).

Gemcitabina (bajo la marca Gemzar®, Eli Lilly, Indianápolis, IN), un análogo nucleósido, se administra en combinación con cisplatina como tratamiento de primera línea de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña localmente avanzado (etapa IIIA o IIIB) o metastásico (etapa IV) y como tratamiento de línea frontal para pacientes con adenocarcinoma del páncreas localmente avanzado (etapa III no operable) o metastásico (etapa IIIB, IV). 12-14 La principal reacción adversa es mielotoxicidad. La ventaja de usar combinaciones de gemcitabina con platino se ha atribuido a la

inhibición de las trayectorias sintéticas de ADN involucradas en la reparación de aductos de platino-ADN. La gemcitabina y cisplatina actúan de manera sinérgica, incrementando la formación de aductos de platino-ADN e induciendo la concentración y cambios dependientes de combinación en depósitos ribonucleótidos y deoxiribonucleótidos en líneas celulares de cáncer de ovario (15).

Los estudios previos sobre Lipoplatin® (Regulon Inc, Mountain View, CA) mostró: un perfil de baja toxicidad, una capacidad para concentrarse en tumores y escapar a células inmunes y macrófagos, un índice de eliminación lenta de los riñones, propiedades de larga circulación en fluidos corporales, una vida promedio de 36 h en la sangre y eficacia terapéutica prometedora. En el presente estudio de Fase I-II se intentó explorar la eficacia terapéutica y perfil de toxicidad de la combinación de lipoplatin-gemcitabina, dado cada 14 días en pacientes de cáncer pancreático, pretratados, de etapa avanzada. Nuestros objetivos primarios fueron determinar la toxicidad y la máxima dosis tolerada (MTD) y nuestro propósito secundario determinar el índice de respuesta y beneficio clínico.

PACIENTES Y MÉTODOS

Los pacientes >18 años de edad con adenocarcinoma confirmado de manera histológica o citológica del páncreas y enfermedad bidimensionalmente medible, que habían

experimentado pre-tratamiento de quimioterapia y tenían enfermedad recurrente o sin respuesta, se inscribieron en el estudio. Otros criterios de elegibilidad incluyeron un estado de desempeño (PS) de la Organización Mundial de la Salud (WHO) de 0-2; expectativa de vida de al menos 3 meses, reservas adecuadas de médula ósea (conteo de granulocitos $\geq 1,500/\text{dl}$, conteo de plaquetas $\geq 120,000/\text{dl}$), pruebas normales de función renal y de hígado (concentración de creatinina en suero $< 1.2 \text{ mg/dl}$), (concentración total de bilirrubina en suero, $< 3 \text{ mg/dl}$, tomando en cuenta que las transaminasas en suero y las proteínas en suero eran normales), función cardiaca normal sin historia de angina de pecho clínicamente inestable o infarto al miocardio o falla cardiaca congestiva dentro de los 6 meses previos y sin involucrar el sistema nervioso central. Se permitió cirugía previa tomando en cuenta que tomara lugar al menos 3 semanas antes. Los pacientes con infección activa, desnutrición o un segundo tumor primario (excepto para un epiteloma dérmico de no melanoma o carcinoma de cérvix *in situ*) se excluyeron del estudio. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio.

PLAN DEL TRATAMIENTO

El plan fue combinar Lipoplatin® con gemcitabina. Lipoplatin®, suministrado por Regulon Inc., se administró como una infusión i.v. de 8 h los días 1 y 15; se eligieron 8

horas con objeto de ser capaces de controlar posibles efectos adversos sobre la base de nuestra experiencia en el ensayo de fase I. La gemcitabina se dio como una infusión i.v. de 60 min en 500 ml de solución salina normal los días 1 y 15 a una dosis de 1000 mg/m² y se repitieron ciclos cada 4 semanas (28 días). Las infusiones los días 1 y 15 se consideraron de 1 ciclo. Tomando en cuenta que los pacientes se habían recuperado lo suficiente de los efectos secundarios relacionados con fármacos, el tratamiento antiemético de ondansetron estándar estaba por administrarse a todos los pacientes. La administración profiláctica de factor estimulador de colonias de granulocitos humanos recombinantes (rhG-CSF) no se permitió. En casos de neutropenia de grado 3, estos pacientes recibirían infusiones posteriores de pegfilgrastim 6 mg, el día 6° o 7° y el tratamiento se pospondría por una semana. El tratamiento se administró durante al menos tres ciclos o hasta el progreso de la enfermedad. El estudio fue un ensayo de aumento de dosis, de cohorte fase I/II de Lipoplatin® y gemcitabina. Su propósito era determinar la toxicidad imitante de dosis (DLT) de la combinación y definir la máxima dosis tolerada (MTD) como una dosis recomendada para fase II y recolectar datos preliminares sobre la eficacia del fármaco en pacientes pre-tratados con cáncer pancreático. La mielotoxicidad con Lipoplatin® como un solo agente se consideró muy moderada en

un estudio de fase I previa. 16 Iniciamos con una dosis baja de Lipoplatin®, combinada con gemcitabina que es un agente mielotóxico, principalmente para determinar el grado de reacción adversa de la médula ósea. La dosis de inicio de
5 Lipoplatin® fue de 25 mg/m² y se incrementó por 25 mg/m² por nivel de dosis (Tabla 1). El protocolo se aprobó por el Comité Ético y Científico del hospital.

Los criterios de ajuste de dosis se basaron en parámetros hematológicos. En casos de neutropenia febril de
10 grado 3 o 4, se repitieron ciclos posteriores con administración profiláctica de pegfilgrastim, como se describe arriba. En casos de neutropenia febril o neutropenia de grado 3 ó 4, a pesar de la administración de rhG-CSF, las dosis de gemcitabina y Lipoplatin se redujeron
15 en 25% en la siguiente infusión de tratamiento. En casos de trombocitopenia de grado 3 ó 4 que duran >5 días, las dosis de ambos fármacos también se redujeron en 25%. Las toxicidades se calificaron de acuerdo con lineamientos de WHO.

20 EVALUACIÓN DEL PACIENTE

La evaluación de pre-tratamiento incluyó la historia médica completa y examen físico, conteo completo de células sanguíneas incluyendo los conteos diferenciales de leucocitos y plaquetas, un perfil bioquímico estándar (y
25 eliminación de creatinina cuando sea necesario), antígeno

carcinoembriónico en suero (CEA) y determinaciones 19-9 CA, electrocardiograma, rayos-X de pecho, ultrasonido del abdomen superior y exploraciones de tomografía computarizada (CT) del torso, abdomen superior e inferior. Se llevaron a cabo 5 estudios adicionales de formación de imágenes después de la indicación clínica. Se llevaron a cabo conteos sanguíneos completos con diferencial semanal; en caso de neutropenia de grado 3 u 4 o trombocitopenia de grado 4, los conteos sanguíneos completos con diferencial se evaluaron diariamente 10 hasta que el conteo absoluto de granulocitos fue $>1,000/dl$ y el conteo de plaquetas $>75,000/dl$. Se completó un examen médico y físico detallado antes de cada procedimiento de tratamiento con objeto de documentar síntomas de la enfermedad y toxicidades del tratamiento. Los exámenes 15 bioquímicos, ECG, CEA en suero y determinaciones 19-9 CA y los rayos-X de pecho se llevaron a cabo cada 6 semanas y se llevó a cabo una evaluación neurológica mediante examen clínico. Las lesiones se midieron después de cada ciclo si eran determinables por examen físico o por rayos-X en pecho; 20 las lesiones determinables por ultrasonido o exploraciones CT se evaluaron después de tres ciclos de quimioterapia.

DEFINICIÓN DE RESPUESTA

La respuesta completa (CR) se definió como la desaparición de todos los signos, síntoma, enfermedad 25 medible o evaluable y cambios bioquímicos relacionados con el

tumor durante al menos 4 semanas, durante cuyo tiempo no pueden aparecer nuevas lesiones. La respuesta parcial (PR) se definió como reducción $>50\%$ en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles en comparación a mediciones de pre-tratamiento, durando al menos 4 semanas, durante cuyo tiempo no pueden aparecer nuevas lesiones y no pueden agrandarse lesiones existentes. Para lesiones hepáticas, se requirió una reducción de $>30\%$ en la suma de las distancias medidas a partir del margen de costal en la línea media claviclar y en el proceso xifoide hasta la orilla del hígado. La enfermedad estable (SD) se definió como $<50\%$ reducción y un incremento de $<25\%$ en la suma de los productos de los dos diámetros perpendiculares de todas las lesiones medidas y la no aparición de nuevas lesiones durante 8 semanas. La enfermedad progresiva (PD) se definió como un incremento en el producto de los dos diámetros perpendiculares de cualquier lesión medible por $>25\%$ sobre el tamaño presente a la entrada en el estudio o, para pacientes que respondieron, el tamaño al momento de la máxima regresión y la aparición de nuevas áreas de enfermedad maligna. El incremento de bilirrubina sin recuperación después de colédoco-pancreatografía retrógrada endoscópica (ERCP) o colocación de micro-andamio se consideró como progreso de la enfermedad. Un deterioro de dos etapas en el estado de desempeño, una pérdida de $>10\%$ de peso en el pre-

tratamiento o incremento de los síntomas no constituyen por sí solos progreso de la enfermedad; sin embargo, la aparición de estos padecimientos fue seguida de una nueva evaluación del grado de la enfermedad. Todas las respuestas tenían que 5 mantenerse durante al menos 4 semanas y confirmarse por un panel independiente de radiólogos.

RESULTADOS

Demografía de pacientes

A partir de Enero de 2003 hasta Diciembre de 2004, 10 se inscribieron 24 pacientes (11 hombres, 13 mujeres; edad promedio 66 años, rango de 47-80 años) en el estudio. Las características de los pacientes se muestran en la Tabla 2. El estado de desempeño de WHO fue de 0 en 4.2% de los pacientes, 1 en 45.8% y 2 en 50%. La gran mayoría de los 15 pacientes era etapa IV (79.2%). Todos los pacientes habían experimentado quimioterapia previa: once pacientes con gemcitabina como tratamiento de un solo agente y 13 con gemcitabina combinada con irrinotecan.

Intensidad de la dosis

20 Los pacientes recibieron 38 procedimientos (108 infusiones cada dos semanas) y el número promedio de procedimientos fue 2 (rango 1-5). De los 24 pacientes, 10 pacientes completaron 3 procedimientos. No hubo reducción de dosis para fármaco alguno y los pacientes recibieron 99.5% de 25 la intensidad de dosis planeada (rango 93-100%) de cada grupo

hasta el cuarto nivel de dosis.

Toxicidad

No se observó neurotoxicidad o toxicidad renal. El dolor abdominal temporal que duró por 2-4 minutos y que se corrigió por sí solo, se observó en 10/24 pacientes al inicio de la infusión de Lipoplatin®. La mielotoxicidad de grado 3 se observó en 2 de 4 pacientes en el quinto nivel de dosis. No se observó neutropenia febril. La toxicidad se muestra en las Tablas 3 y 4. La dosis de quinto nivel (125 mg/m² de lipoplatina y 1000 mg/m² de gemcitabina) se consideró como DLT y el nivel de dosis 4 como la MTD. Se trataron cuatro pacientes adicionales en el cuarto nivel de dosis.

Respuesta al tratamiento

La determinación de la respuesta medible sobre la tomografía computarizada se llevó a cabo por dos radiólogos independientes y dos oncólogos experimentados. No se detectaron respuestas completas. PR se logró en 2 pacientes (8.3%) con duraciones de 6 y 5 meses. La enfermedad estable se observó en 14 pacientes (58.3%) con una duración promedio de 3 meses (rango de 2-7 meses). El beneficio clínico principalmente debido a reducción de dolor se observó en 8 pacientes (33.3%). Al final del estudio, 7 pacientes (29.2%) aún estaban vivos. La supervivencia promedio desde el inicio del tratamiento de segunda línea fue de 4 meses (rango 2-8+ meses).

Conclusión

Esta nueva cisplatina encapsulada de manera liposomal (Lipoplatin®) se propone principalmente evitar la toxicidad renal, lo cual se observa con frecuencia en administración de cisplatina, mientras que al mismo tiempo produce eficacia similar. Los farmacocinéticos de Lipoplatin® son diferentes de la cisplatina, como se ha demostrado en estudios animales, así como en un ensayo clínico en pacientes. La falta de toxicidad es una importante ventaja, lo cual se demuestra cuando Lipoplatin® se administra como un solo agente. En el presente ensayo de fase I-II, la toxicidad y la eficacia se estudiaron mediante administración de Lipoplatin® en combinación con gemcitabina, un agente cuya toxicidad está bien definida, particularmente cuando se combina con otros agentes. La combinación de cisplatina-gemcitabina se ha usado de manera similar como tratamiento en cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer urotelial y pancreático. Parece que los datos del presente ensayo indican la ventaja de muy baja toxicidad. La administración cada dos semanas de la combinación es bien tolerada hasta la dosis de 100 mg/m² de Lipoplatin® cuando la gemcitabina se mantiene a una dosis estándar de 1000 mg/m². A la dosis de 125 mg/m² de Lipoplatin®, la mielotoxicidad alcanzó grados 3 y 4 y por consiguiente esta dosis se consideró como DLT. Los 100 mg/m² de Lipoplatin® y 1 gr/m²

de gemcitabina se consideraron como DLT. Los 100 mg/m² de Lipoplatin® y 1 gr/m² de gemcitabina se consideraron como la MTD. La combinación logró una respuesta objetivo en 8.33% de los pacientes, estabilidad de la enfermedad en 58.3% y alivio del dolor en 33.3%. Tomando en cuenta que todos los pacientes fueron refractarios o en progreso de la enfermedad aunque incluían gemcitabina en un tratamiento previo; el índice de respuesta aquí producido debe atribuirse a la adición de Lipoplatin®.

10. La cisplatina encapsulada de manera liposomal combinada con gemcitabina administrada cada dos semanas en pacientes de cáncer pancreático pre-tratados, avanzado, tiene una MTD de 100 mg/m² y 1000 mg/m², respectivamente. Es un tratamiento bien tolerado con signos de eficacia
15. prometedores.

REFERENCIAS

1. Rosenberg B: Complejos de platino para el tratamiento de cáncer: porqué continúa la búsqueda, In Lippert B (ed): Cisplatina: Química y Bioquímica de un Fármaco Anticáncer Guía. Zurich, Verlag Helvetica Chimica Acta, 1999, pág: 3
2. Sorenson C, Eastman A: Mecanismo de citotoxicidad inducida por cis-diaminodicloroplatino (II): función de arresto de G2 y rupturas de doble filamento de ADN. Cancer Res: 4484-8, 1988

3. Einhorn LH, Williams SD, Loehrer PJ, et al.:
Evaluación de duración óptima de quimioterapia en pronósticos
favorables de tumores de célula germinal diseminada: un
protocolo de grupo de Estudio de Cáncer del Sudeste, J Clin
Oncol 7(3): 387-91, 1989

4. Aabo K, Adams M, Adnitt P, et al.:
Quimioterapia en cáncer de ovario avanzado: cuatro meta-
análisis sistemáticos de datos de pacientes individuales a
partir de 37 ensayos aleatorizados. Br J Cancer 78: 1479-87,
10 1998

5. Kaufman D, Raghavan D, Carducci M, et al.:
Ensayo de fase II de gemcitabina más cisplatina en pacientes
con cáncer urotelial metastásico, J Clin Oncol 18(9): 1921-7,
2000

6. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, et al.:
Quimioterapia agregada a tratamiento tócoregional para
carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello: tres meta-
análisis de datos individuales actualizados. Lancet 355:
949-955, 2000

7. Grupo colaborador de cáncer de pulmón de
célula no pequeña: Quimioterapia en cáncer de pulmón de
célula no pequeña, un meta-análisis usando datos actualizados
en pacientes individuales de 52 ensayos clínicos
aleatorizados. Br Med J 311: 899-909, 1995

8. Hayes D, Cvitkovic E, Golfey R et al.:

Diaminocloruro de cis-platino a dosis elevada: disminución de toxicidad renal por diuresis de manitol. Cáncer 39(4): 1372-8, 1977

- 5 9. Gandara DR, Nahhas NA, Adelson MD, et al.:
Evaluación multicéntrica controlada por placebo, aleatorizada,
de dietilditiocarbamato para quimioprotección contra
toxicidades inducidas por cisplatina. J Clin Oncol 13:490-
496, 1995

- 10 10. Sculier JP, Lafitte JJ, Lecomte J, et al.:
Parte Trabajadora de Cáncer de Pulmón Europea: un ensayo
aleatorizado de fase III de tres extremidades, que compara
combinaciones de ifosfamida derivada de platino y/o
gemcitabina en cáncer de pulmón de célula no pequeña de etapa
IV. Ann Oncol 13: 874-882, 2002

- 15 11. Tognoni A, Pensa F, Vaira F, et al.: Un
estudio para hallar la dosis de carboplatina y gemcitabina en
cáncer de pulmón de célula no pequeña, avanzado. J Chemother
14: 296-300, 2002

- 20 12. Burris HA 3rd, Moore MJ, Anderson J, et al.:
Mejoras en supervivencia y beneficio clínico con gemcitabina
como terapia de primera línea para pacientes con cáncer de
páncreas avanzado: Un ensayo aleatorizado. J Clin Oncol 15:
2403-2413, 1997

- 25 13. Heinemann V, Wilke H, Mergenthaler HG, et al.:
Gemcitabina y cisplatina en el tratamiento de cáncer avanzado

y metastásico pancreático. Ann Oncol 11: 1399-1403, 2000.

14. Stathopoulos GP, Rigatos SK, Dimopoulos MA et al.: Tratamiento de cáncer pancreático con una combinación de irinotecan. (CPT-11) y gemcitabina: Un estudio multicéntrico de fase II del Grupo Cooperativo Greek para Cáncer Pancreático. Ann Oncol 14: 388-394, 2003.

15. Van Moorsel CJ, Smid K, Voorn DA, et al.: Efecto de gemcitabina y combinaciones de cis-platino en depósitos ribonucleótidos y deoxiribonucleótido en líneas celulares de cáncer de ovario. Int J Oncol 22: 201-207, 2003

16. Stathopoulos GP, Boulikas T, Vougliouka M, et al.: Farmacocinética y reacciones adversas de una nueva cisplatina liposomal (Lipoplatin): Estudio de fase I. Reportes de Oncología 13: 589-595, 2005.

15. 17. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A: (WHO) Resultados de reporte de tratamiento de cáncer. Cáncer, 47(1): 207-214, 1981

Nivel de dosis	No. de pacientes	Lipoplatin (mg/m ² por semana)	Gemcitabina (mg/m ² por semana)
Primero	4	25	1000
Segundo	4	50	1000
Tercero	4	75	1000
Cuarto	4+4	100	1000
Quinto	4	125	1000

Tabla 1. Lipoplatin® y Gemcitabina Aumento de Dosis

Nivel de Dosis No. de Pacientes Lipoplatin® Gemcitabina
(mg/m² por semana) (mg/m² por semana) Primero 4 25 1000,
Segundo 1 50 1000, Tercero 4 75 1000, Cuarto 4+4 100
1000, Quinto 4 125 1000.

	No.	%
No. de pacientes inscritos	24	100
Edad (años)		
Mediana	66	
Rango	47-80	
Género		
Masculino	11	45.8
Femenino	13	54.2
Desempeño		
Estado (WHO)		
0	1	4.2
1	11	45.8
2	12	50.0
Etapas de la enfermedad		20.8
III	5	
IV	19	79.2
Histología		
Bien diferenciado	3	12.5
Moderadamente diferenciado	12	50.0
Baja diferenciación	9	37.5
Tratamiento previo	Días	
Gemcitabina 1 mg/m ²	1,8,15/cada	
	4 sem	11 45.8
Gemcitabina	Días 1,8	
900 mg/m ² +	cada 3 sem	13 54.2
Irinotecan	Días 8/cada	
300 mg/m ²	3 sem	

Tabla 2. Características de los pacientes en la Línea Base

No. % No. de pacientes inscritos 24 100 Edad (años) Mediana 66 Rango 47-80 Género Masculino 11 45.8 Femenino 13 54.5

Estado de Desempeño (WHO) 0 14.2 1 11 45.8 2 12 50.0 Etapa de la Enfermedad III 5 20.8 IV 19 79.2 Histología Bien diferenciada 3 12.5 Moderadamente diferenciada 12 50.0 Baja diferenciación 9 37.5 Tratamiento previo Gemcitabina 1 gr/m 2 días 1, 8, 15/cada 4 semanas 11 45.8 Gemcitabina 900 mg/m2+ días 1,8/cada 3 semanas + 13 54.2 Irinotecan 300 mg/m2 día 10. 8/cada 3 semanas

Nivel de dosis	Lipoplatin Mg/m ²	Gemcitabina Mg/m ²	Toxicidad No. pts	Toxicidad máxima (grado)	Tipo de toxicidad
Primero	25	1000	-	-	-
Segundo	50	1000	-	-	-
Tercero	75	1000	-	-	-
Cuarto	100	1000	2/4 ^a	2-3	Neutropenia
Quinto	125	1000	2/4	3-4	Neutropenia
^a Original 4 pacientes					

Tabla 3. Toxicidad Hematológica por Nivel de Dosis

Lipoplatin® Toxicidad de Gemcitabina Toxicidad Máxima mg/m2

mg/m2 No. de Pts Toxicidad (grado) Tipo

Primero 25 1000 --- Segundo 50 1000 --- Tercero 75 1000 --- Cuarto 100 1000 2/4* 2-3 Neutropenia Quinto 125 1000 2/4 3-4 Neutropenia* original 4 pacientes

(80)

	Grado 1 n(%)	Grado 2 n(%)	Grado 2 n(%)	Grado 4 n(%)
Episodios				
Náusea	5 (20.8)	-	-	-
Vómito	2 (8.3)	-	-	-
Alopecia	14 (58.3)	-	-	-
Fatiga	8 (33.3)	-	-	-
Diarrea	2 (8.3)	-	-	-
Cardiotoxicidad	-	-	-	-
Neurotoxicidad	3 (12.5)	-	-	-
Nefrotoxicidad	-	-	-	-
Trombótica	4 (16.7)	-	-	-

Tabla 4. Dosis de Toxicidad No Hematológica Grado 1 Grado 2

Grado 3 Grado 4 Nivel n.(%) n(%) n(%) n(%) Náusea 5 (20.8)---
Vómito 2 (8.3)--- Alopecia 14 (58.3)--- Fatiga 8 (33.3)---
Diarrea 2 (8.3)---Cardiotoxicidad--- Neurotoxicidad 3 (12.5)-
-- Nefrotoxicidad--- Episodios trombóticos 4 (16.7)---

REIVINDICACIONES

1. Un método para formar un micelo que comprende oxaliplatina, comprendiendo el método combinar una cantidad efectiva de oxaliplatina y un lípido de fosfatidil glicerol
5 cargado de manera negativa con un solvente.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el solvente es etanol y se presenta de 20 hasta 40%.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el lípido de fosfatidil glicerol cargado de
10 manera negativa es fosfatidil glicerol de dipalmitoilo (DPPG), fosfatidil glicerol de dimiristol (DMPG), fosfatidil glicerol de diaproilo (DCPG), fosfatidil glicerol de diestearoilo (DSPG) o fosfatidil glicerol de dioleilo (DOPG).

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera
15 negativa es DPPG.

5. Un método de acuerdo con una reivindicación precedente, en donde la proporción molar de oxaliplatina al lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa es
20 1:1 hasta 2:1.

6. Un método para encapsular oxaliplatina en un liposoma que comprende combinar un micelo de oxaliplatina como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con un liposoma o lípidos preformados.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6,

en donde el liposoma o lípidos preformados comprenden lípidos cargados de manera negativa y/o positiva.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los lípidos son fosfolípidos o derivados de los mismos.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el lípido es DDAB, bromuro de dimetildioctadecil amonio; DMRIE: bromuro de N-[1-(2,3-dimiristiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxietyl) amonio; DMTAP: 1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio propano; DOGS: Dioctadecilamidoglicilespermina; DOTAP: cloruro de N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio; DOTMA: cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-n,n,n-trimetilamonio; DPTAP: 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio propano o DSTAP: 1,2-diesteroil-3-trimetilamonio propano.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el liposoma comprende uno o más de colesterol, fosfatidil colina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina de soya hidrogenada o ceramida.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el liposoma preformado comprende además una sal de amonio.

12. Un método para encapsular oxaliplatina en un liposoma que comprende las siguientes etapas:

e) formar un micelo que comprende oxaliplatina al

combinar una cantidad efectiva de oxaliplatina y un lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa con un solvente y

f) combinar dicho micelo de oxaliplatina con un
5 liposoma o lípidos preformados.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el solvente es etanol y se presenta de 20 hasta 40%.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, en donde el lípido de fosfatidil glicerol cargado de
10 manera negativa es DPPG, DMPG, DCPG, DSPG o DOPG.

15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa es DPPG.

16. Un método de acuerdo con cualquiera de las
15 reivindicaciones 12 a 15, en donde la proporción molar de oxaliplatina a lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa es 1:1 a 1:2.

17. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, que comprende además cubrir la
20 superficie de la membrana de liposoma con un polímero.

18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde un ligando se conjuga con el polímero.

19. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el ligando es capaz de dirigir el liposoma a un tipo
25 de célula específico con receptores superficiales reconocidos

por el ligando.

20. Un método de acuerdo con la reivindicación 18 ó la reivindicación 19, en donde el ligando es un péptido.

21. Un método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el ligando se selecciona a partir de un factor de crecimiento epidérmico o un epítipo del mismo, endostatina, antitrombina, anastelina, angiostatina, PEX o factor derivado de epitelio de pigmento.

22. Un método de acuerdo con una reivindicación precedente que comprende además incluir otro fármaco anti-tumor en el micelo o liposoma.

23. Un método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el fármaco se selecciona a partir de cisplatina, paclitaxel, SN-38, docetaxel, irrinotecan, 5-fluorodeoxiuridina o doxorubicina.

24. Un micelo obtenido por el método de las reivindicaciones 1 a 5.

25. Un micelo que comprende una cantidad efectiva de oxaliplatina y un lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa.

26. Un micelo de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el lípido de fosfatidil glicerol es DPPG.

27. Un micelo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 26, que además comprende otro fármaco anticáncer.

(85)

28. Un micelo de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el fármaco se selecciona a partir de cisplatina, paclitaxel, SN-38, docetaxel, irrinotecan, 5-fluorodeoxiuridina o doxorubicina.

29. Un liposoma que comprende oxaliplatina obtenida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 23.

30. Un liposoma que comprende una cantidad efectiva de oxaliplatina en donde la capa interna y externa del liposoma comprende diferentes lípidos.

31. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 30 que comprende un lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa.

32. Un micelo de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el lípido de fosfatidil glicerol es DPPG.

33. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 32, que comprende además uno o más de colesterol, fosfatidil colina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina de soya hidrogenada, ceramida.

34. Un liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33, en donde la superficie del liposoma se cubre con una cubierta que permite que el liposoma evada la supervivencia inmune.

35. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la cubierta es un polímero.

(25)

36. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el polímero es PEG.

37. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 35 ó 36, en donde un ligando se conjuga con el polímero.

5 38. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 37, en donde el ligando es capaz de dirigir el liposoma a un tipo de célula específico con receptores superficiales reconocidos por el ligando.

10 39. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 37 ó la reivindicación 38, en donde el ligando es un péptido.

40. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 37, en donde el ligando se selecciona a partir del factor de crecimiento epidérmico o un epítipo del mismo, endostatina, antitrombina, anastelina, angiostatina, PEX o factor derivado
15 de epitelio de pigmento.

41. Un liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 40, en donde el liposoma tiene un tamaño de partícula de 80-120 nm.

42. Un liposoma de acuerdo con las
20 reivindicaciones 28 a 38, que comprende además una cantidad efectiva de otro fármaco anticáncer caracterizado en que la oxaliplatina y el otro fármaco se encapsulan en el mismo liposoma.

43. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación
25 39, en donde el fármaco anticáncer se selecciona a partir de

cisplatina, docetaxel, paclitaxel, gemcitabina, navelbina, doxorubicina, irrinotecan, SN-38, gemcitabina o 5-fluorodeoxiuridina.

44. Un liposoma de acuerdo con las reivindicaciones 28 a 38, que comprende además una cantidad efectiva de un gen anticáncer caracterizado en que la oxaliplatina y el otro fármaco se encapsulan en el mismo liposoma.

45. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el gen anticáncer es p53, IL-2, IL-12, angiostatina y oncostatina.

44. Un liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 45 para utilizarse como un medicamento contra el cáncer.

46. El uso de un liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 45 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

47. Un método para el tratamiento de cáncer que comprende administrar un liposoma como se define en cualquiera de las reivindicaciones 27 a 45.

48. El uso o método de acuerdo con las reivindicaciones 46 ó 47, en donde el liposoma se administra cada semana o cada dos semanas por infusión intravenosa 3 horas y la oxaliplatina se presenta en una dosis de 100 hasta 350 mg/m².

49. El uso o método de acuerdo con las reivindicaciones 48, en donde la dosis es de 100, 150, 200, 250 ó 300 mg/m².

50. El uso o método de acuerdo con la reivindicación 49, en donde la dosis es de 300 mg/m².

51. El uso o método de acuerdo con las reivindicaciones 48 a 50, en donde la infusión es durante 3 horas de infusión una vez a la semana.

52. El uso o método de acuerdo con las reivindicaciones 48 a 51, en donde la administración es en 2 a 4 ciclos, durando cada ciclo aproximadamente 8 semanas y seguido por una semana de reposo entre ciclos.

53. El uso o método de acuerdo con las reivindicaciones 48 a 51, en donde el cáncer se selecciona a partir de cáncer colorrectal, gástrico, pancreático, de vejiga, cáncer de mama, colorrectal, gástrico, esofágico, pancreático, urotelial, de pulmón de célula no pequeña, de mama, próstata, cabeza y cuello, melanoma, testicular o de ovario.

54. El uso o método de acuerdo con la reivindicación 53, en donde el cáncer es cáncer colorrectal, gástrico o pancreático.

55. Un liposoma que comprende una cantidad efectiva de oxaliplatina y otro fármaco anticáncer o un fármaco de gen anticáncer y un lípido de fosfatidil glicerol

cargado de manera negativa.

56. Una terapia de combinación que comprende administrar un liposoma que encapsula una cantidad efectiva de oxaliplatina y encapsular otro fármaco anticáncer o un
5 fármaco de gen anticáncer.

57. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 55 ó 56, en donde el fármaco se selecciona a partir de cisplatina, paclitaxel, SN-38, docetaxel, irrinotecán, 5-fluorodeoxiuridina o doxorubicina.

10 58. Una terapia de combinación que comprende administrar una cantidad efectiva de gemcitabina y un liposoma que encapsula una cantidad efectiva de cisplatina.

60. Una terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 58, en donde la gemcitabina no forma parte del
15 liposoma de cisplatina.

61. Una terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 58 ó 60, en donde la gemcitabina se administra al mismo tiempo que el liposoma de cisplatina.

62. Una terapia de combinación de acuerdo con la
20 reivindicación 58 ó 60, en donde la gemcitabina se administra en un momento diferente del liposoma de cisplatina.

63. Una terapia de combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 58 a 62, en donde el cáncer es cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer
25 gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón de célula no

pequeña, cáncer de ovarios, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, testicular, cáncer intestinal, de vejiga, de esófago o cáncer urotelial.

64. Una terapia de combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 58 a 63, en donde la gemcitabina se administra en una dosis de 800 hasta 1000 mg/m².

65. Una terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 64, en donde la gemcitabina se administra por infusión intravenosa en una dosis de 1000 mg/m².

66. Una terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 64 ó 65, en donde la gemcitabina se administra como una infusión iv de 60 min cada dos semanas.

67. Una terapia de combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 58 a 66, en donde el liposoma de cisplatina se administra por infusión intravenosa a una dosis de 100 hasta 125 mg/m².

68. Una terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 67, en donde el liposoma de cisplatina se administra como una infusión Iv de 8 horas cada dos semanas.

RESUMEN

La presente invención se refiere a liposomas que comprenden oxaliplatina encapsulada y a métodos para elaborar oxaliplatina encapsulada. La invención también se refiere a liposomas que comprenden oxaliplatina y otros fármacos anticáncer. Los liposomas de la invención son útiles en los tratamientos para cáncer.

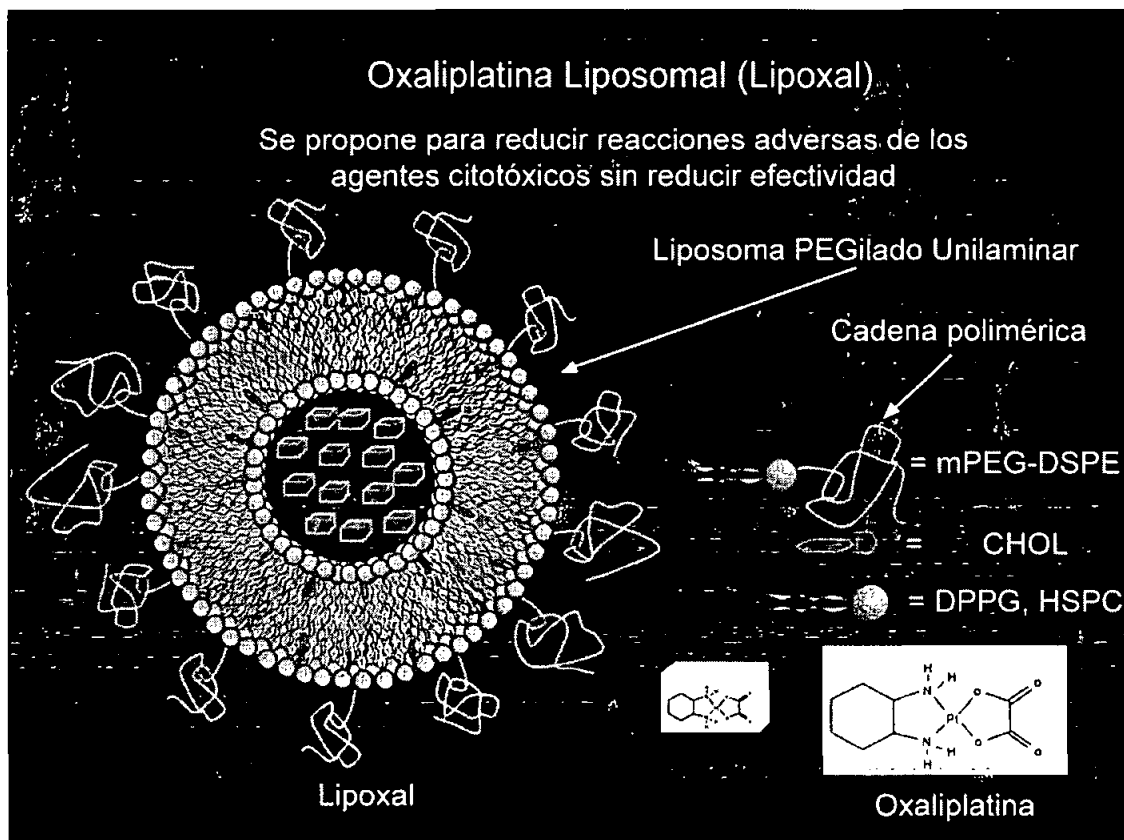
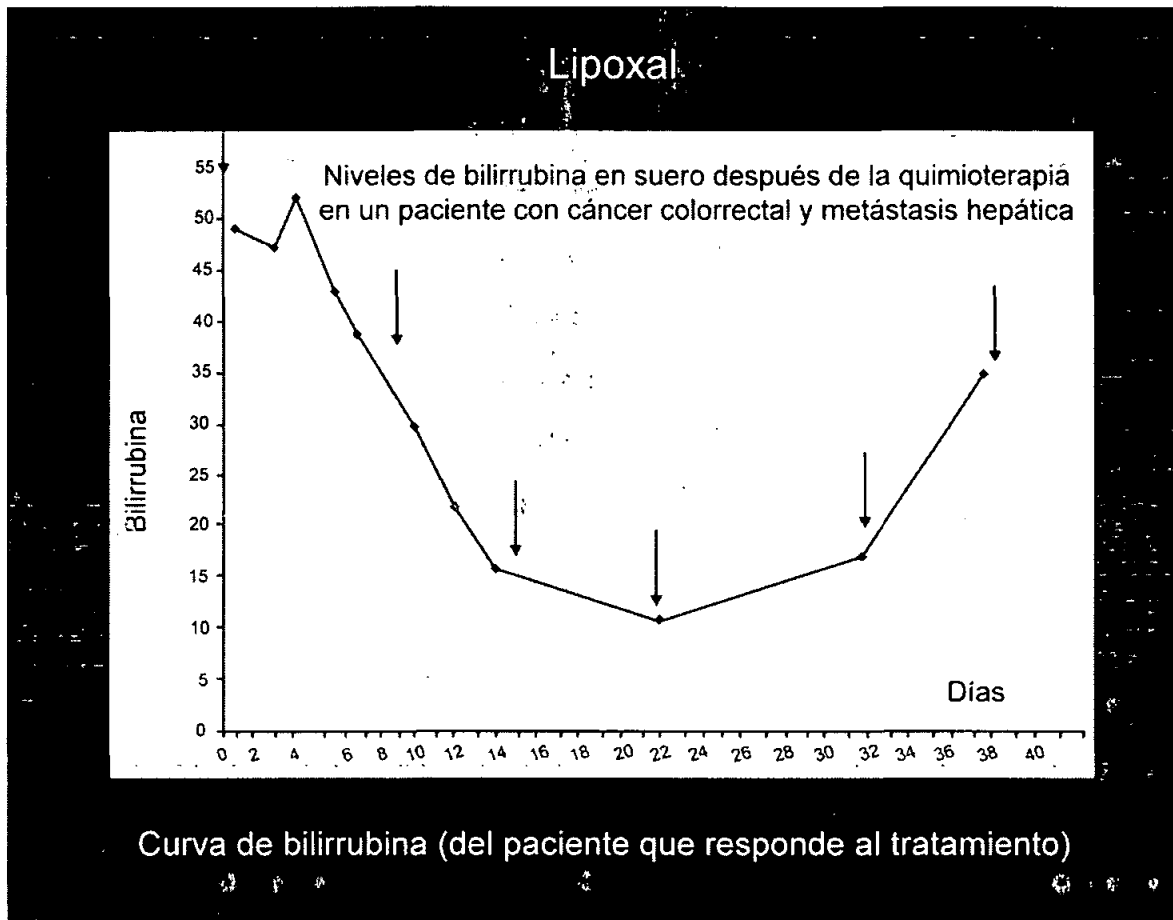


FIG. 1

FIG. 2

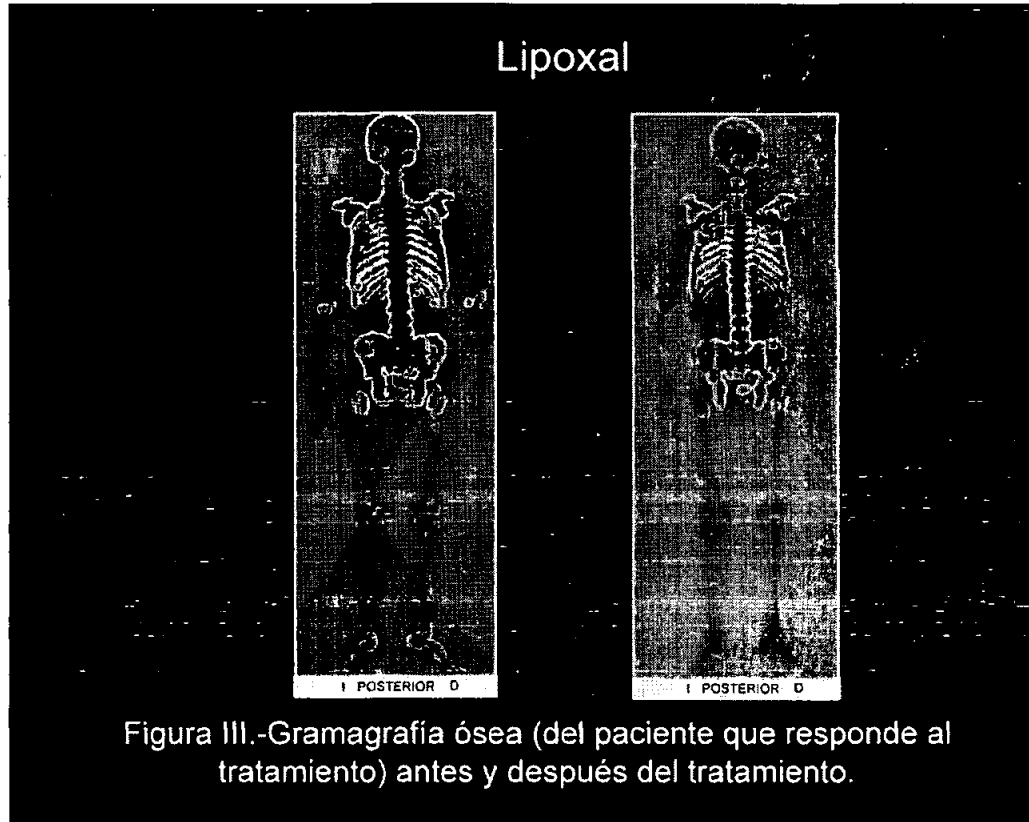
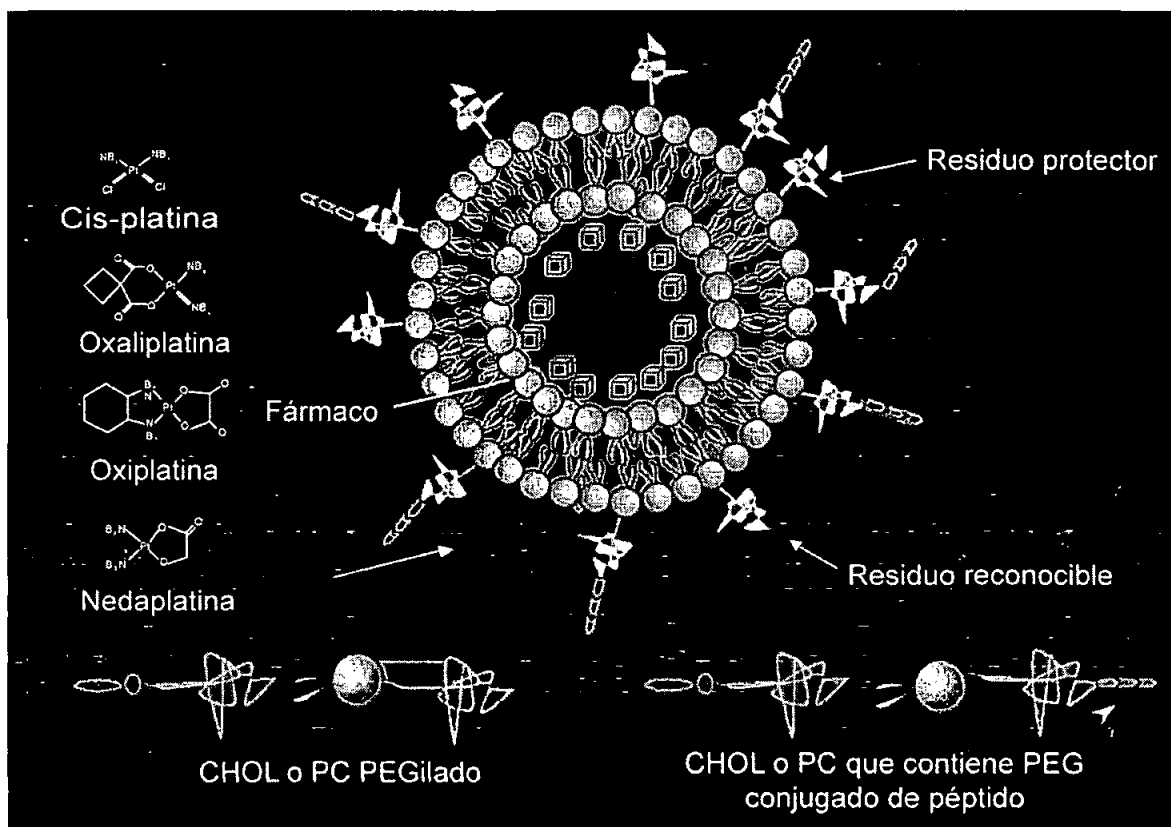


FIG. 3

**FIG. 4**

5/18

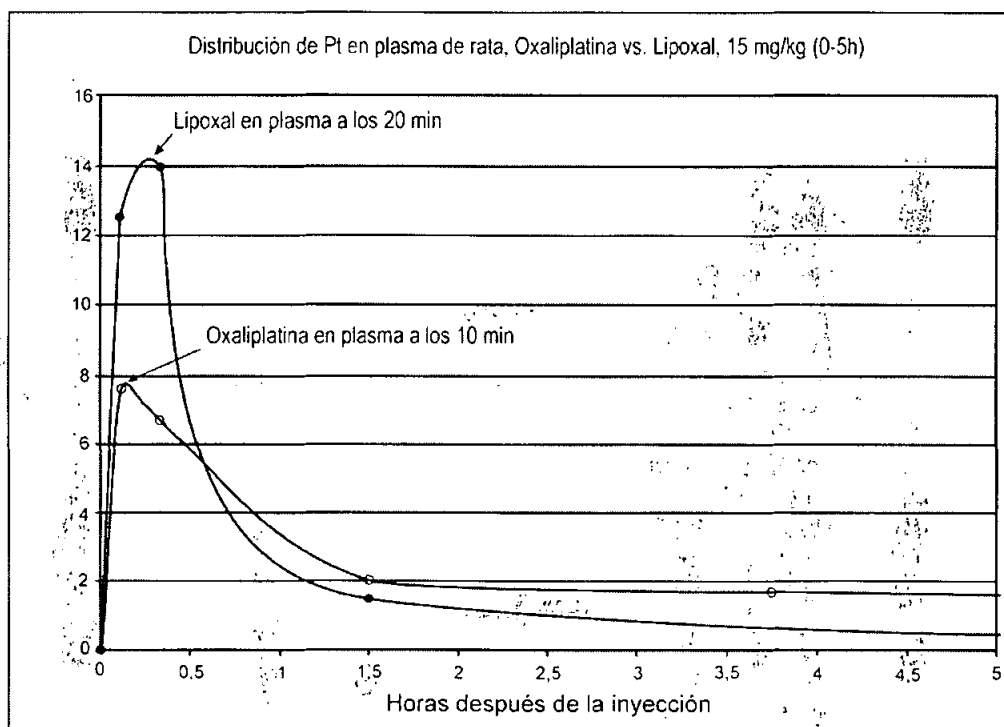


FIG. 5A

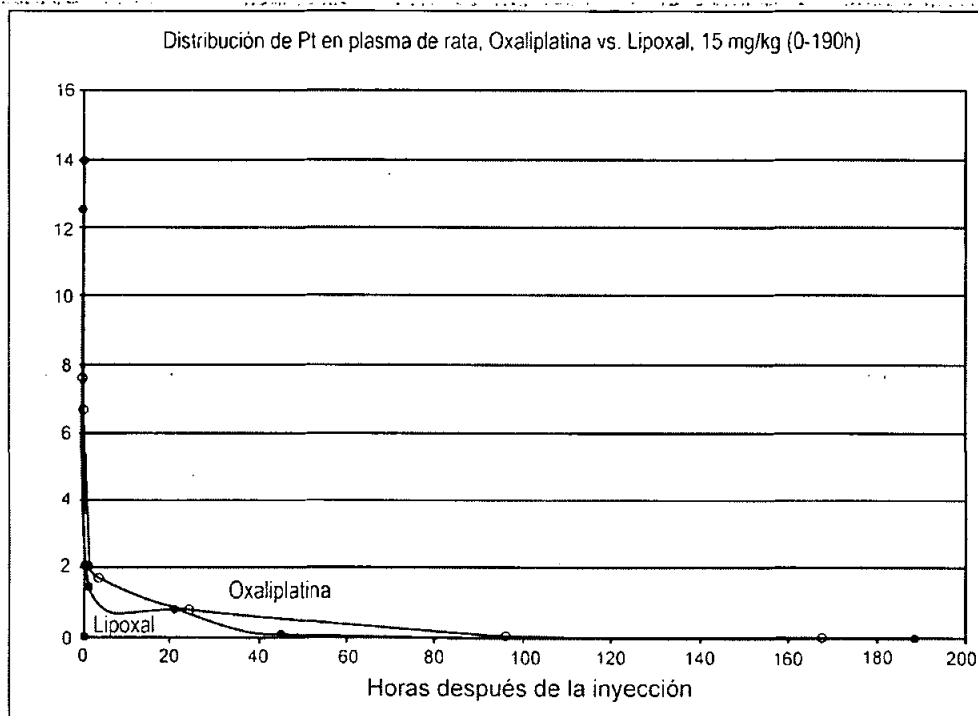


FIG. 5B

6/18

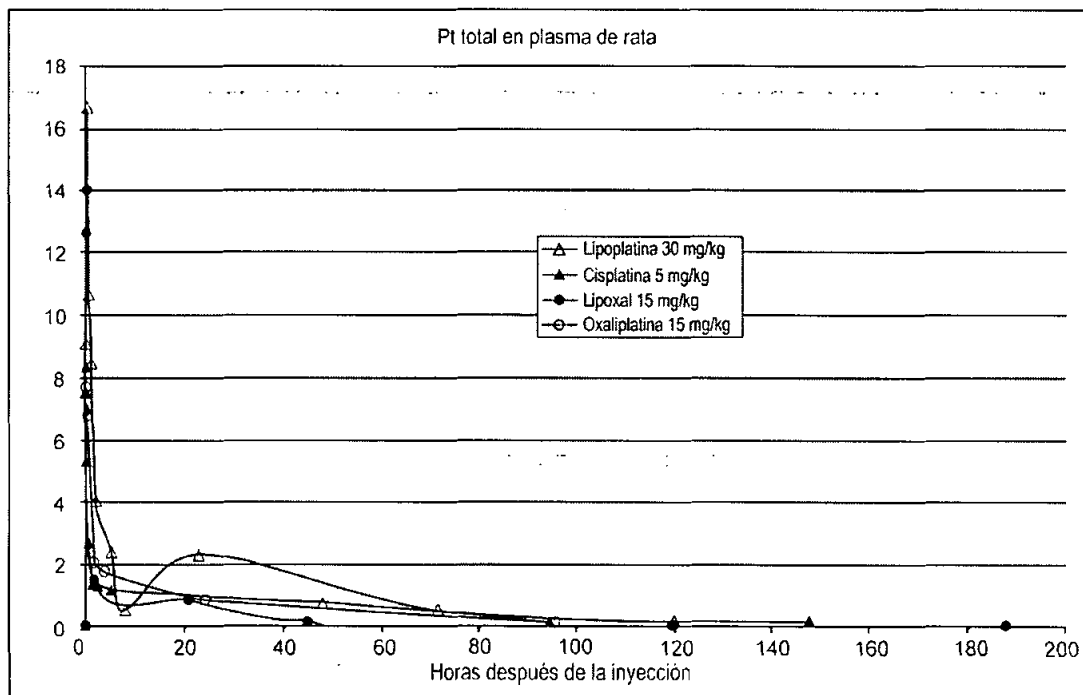
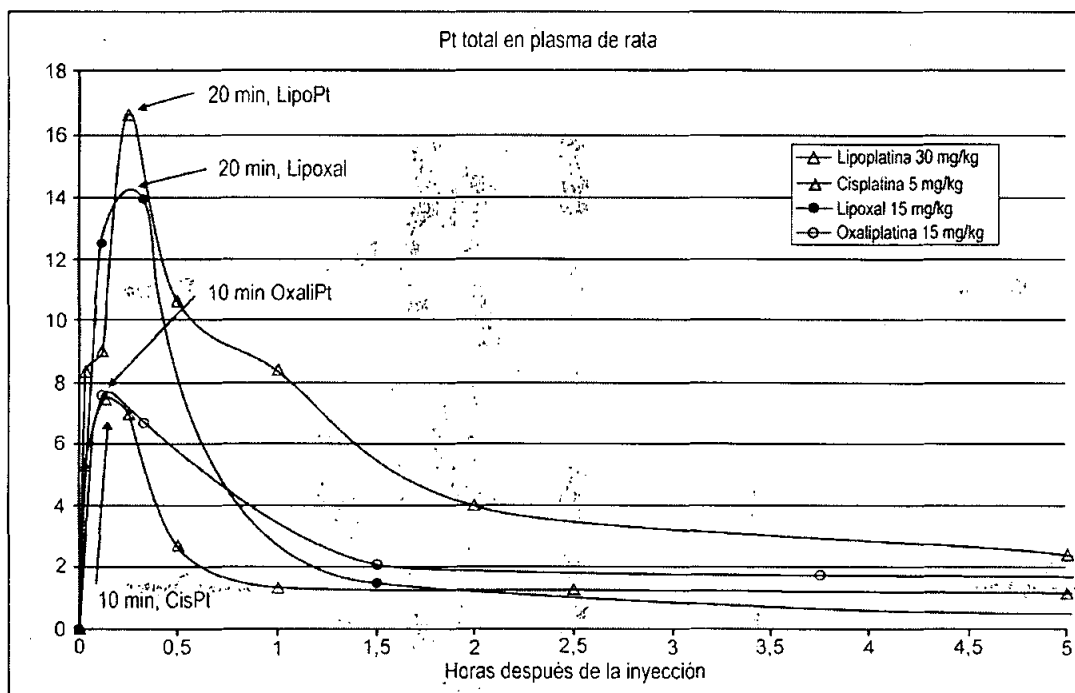


FIG. 6

7/18

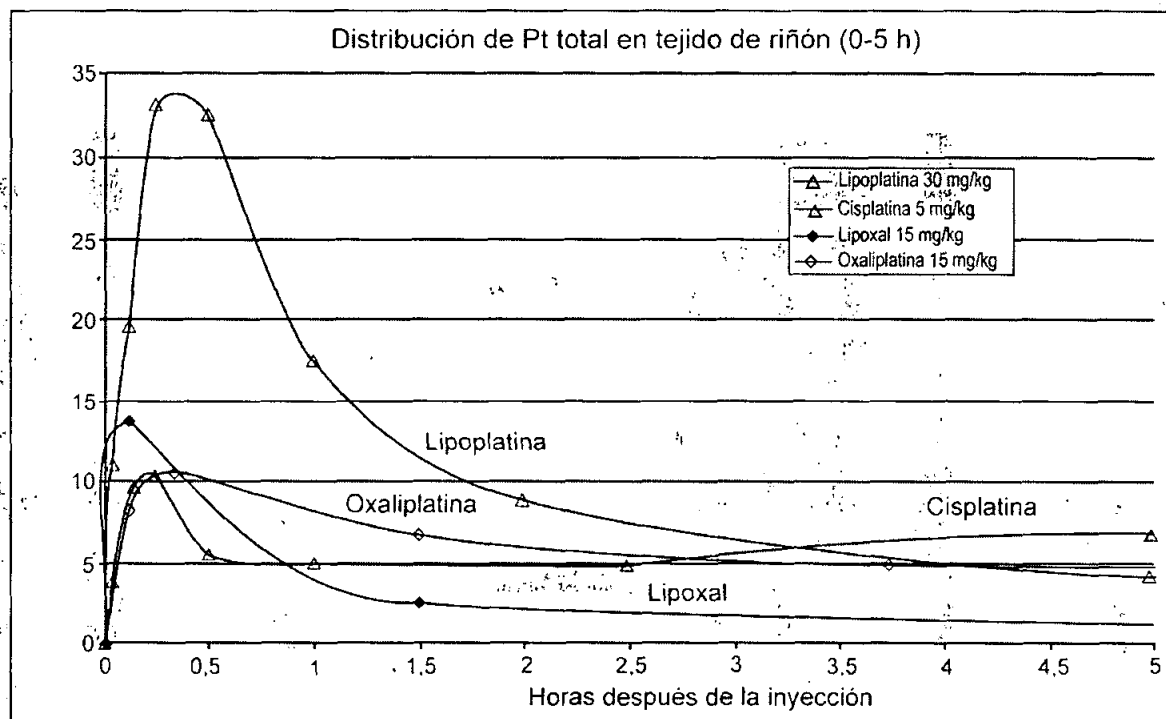


FIG. 7A

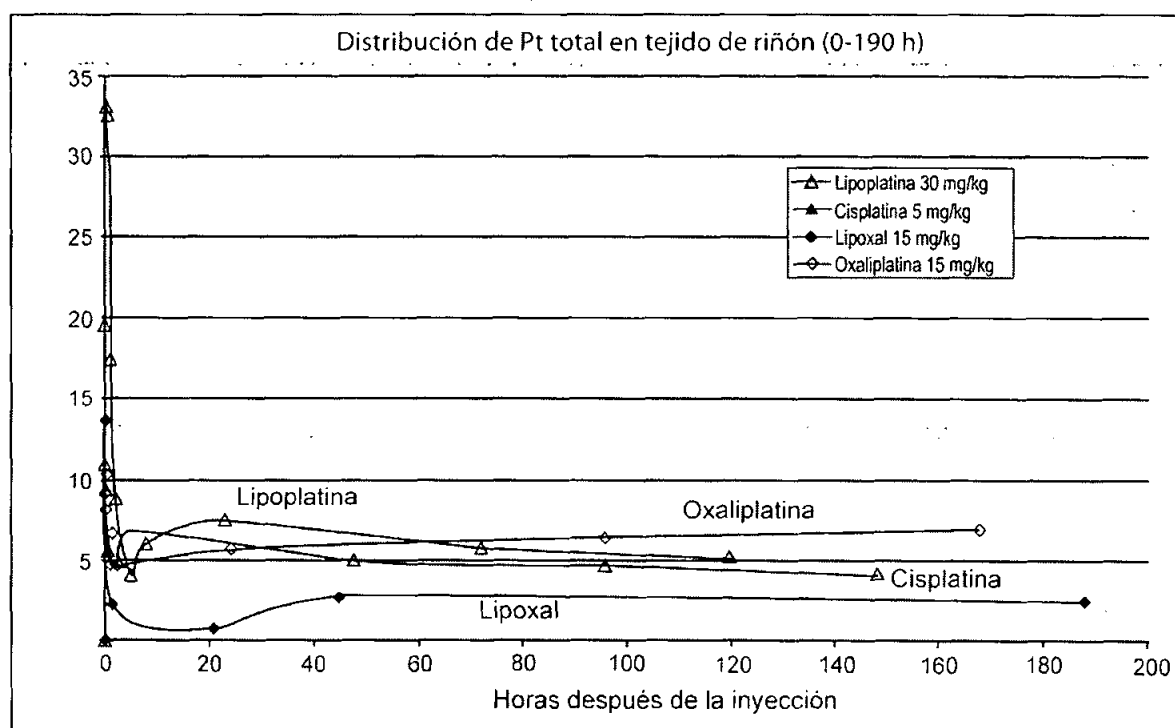


FIG. 7B

8/18

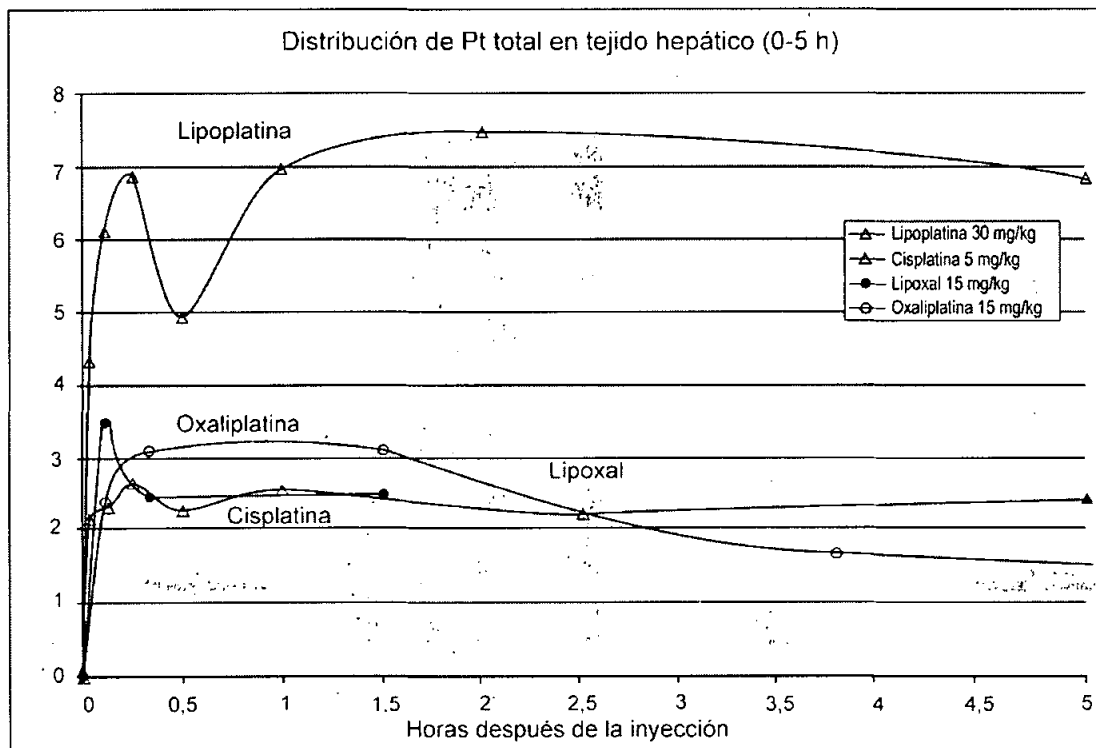


FIG. 8A

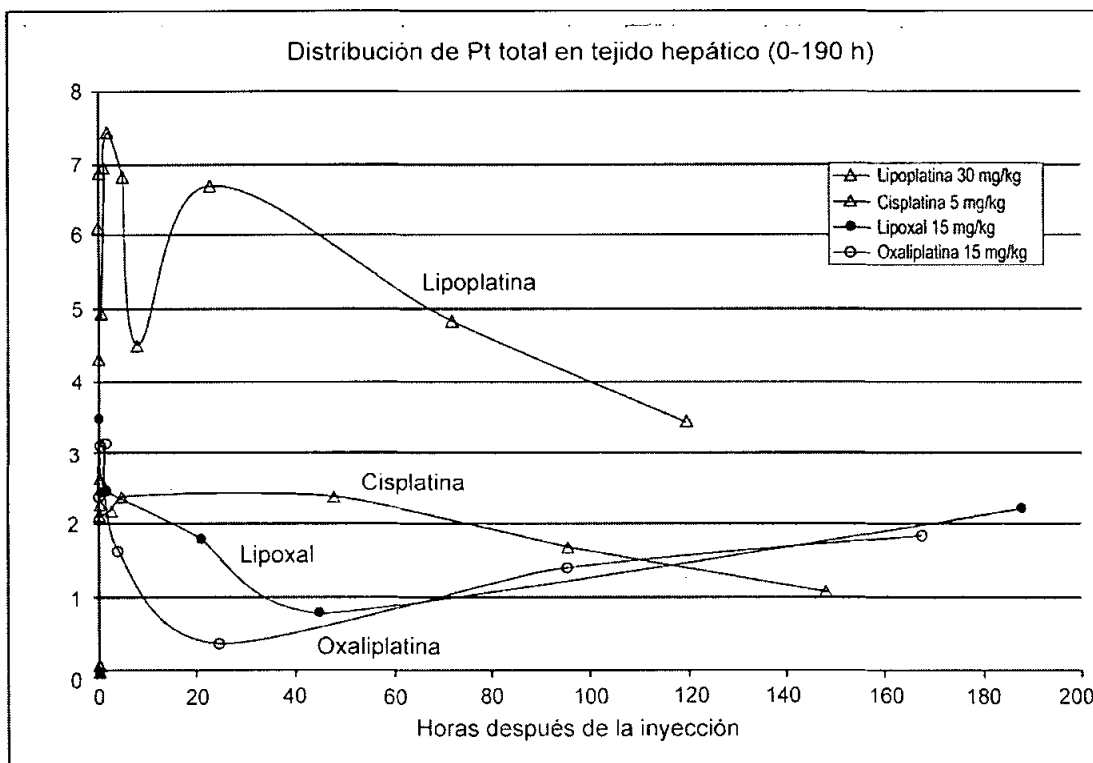


FIG. 8B

Platino total en hígado

9/18

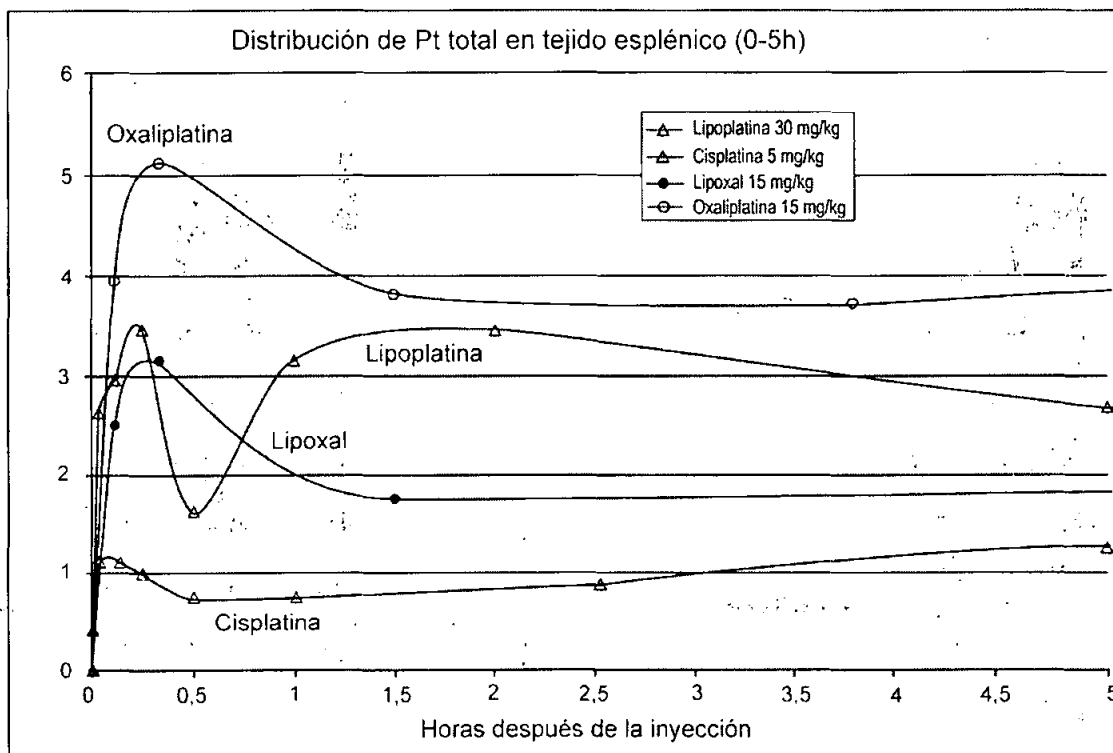


FIG. 9A

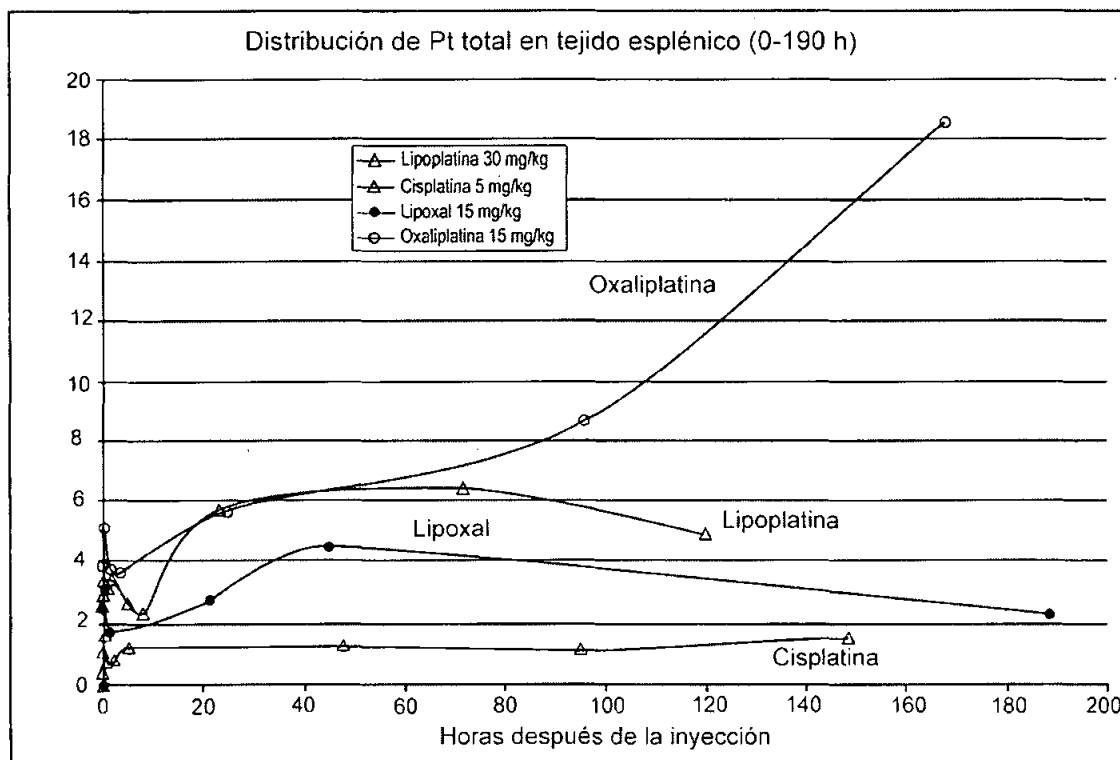
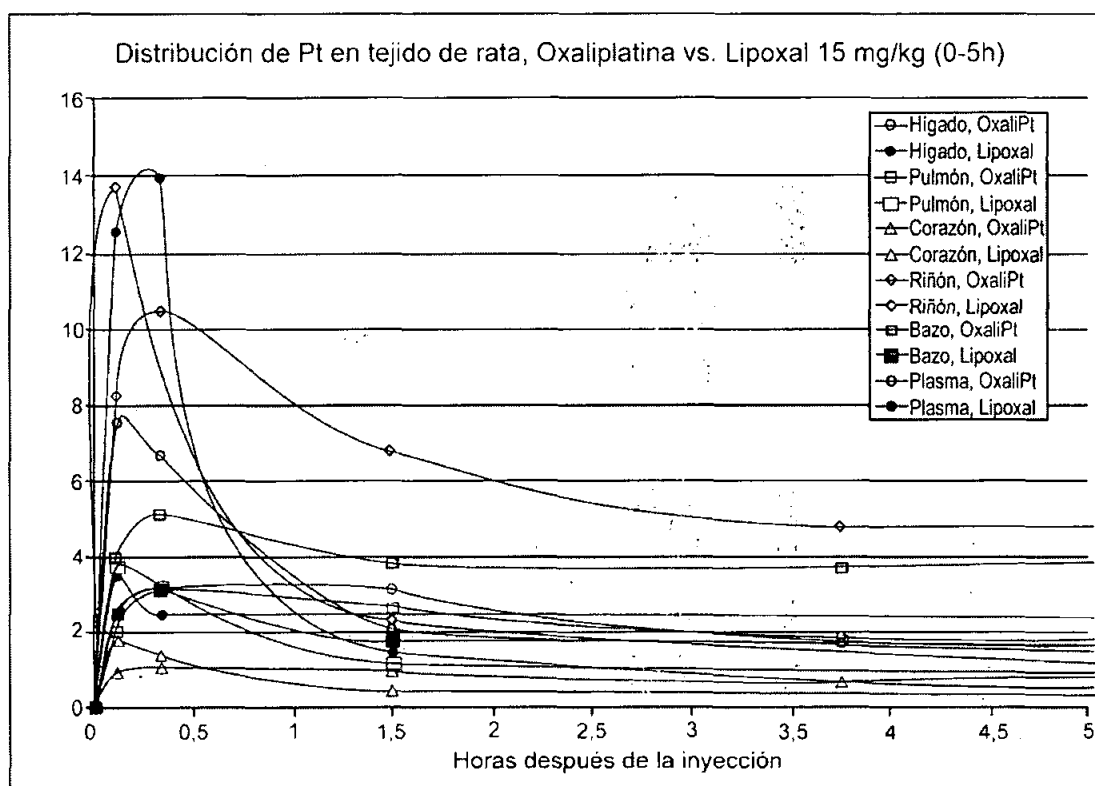
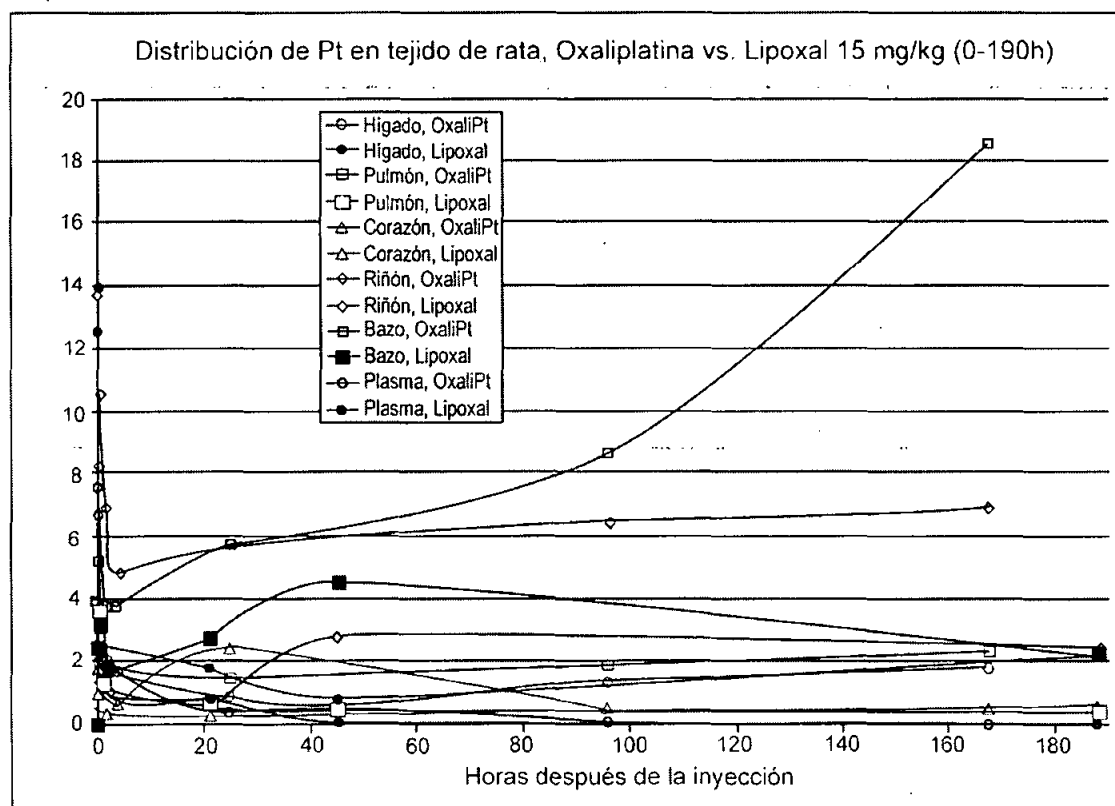


FIG. 9B

10/18

**FIG. 10A****FIG. 10B**

11/18

Diagramas de Ratas Tratadas Repetidamente con Oxaliplatina encapsulada de manera liposomal

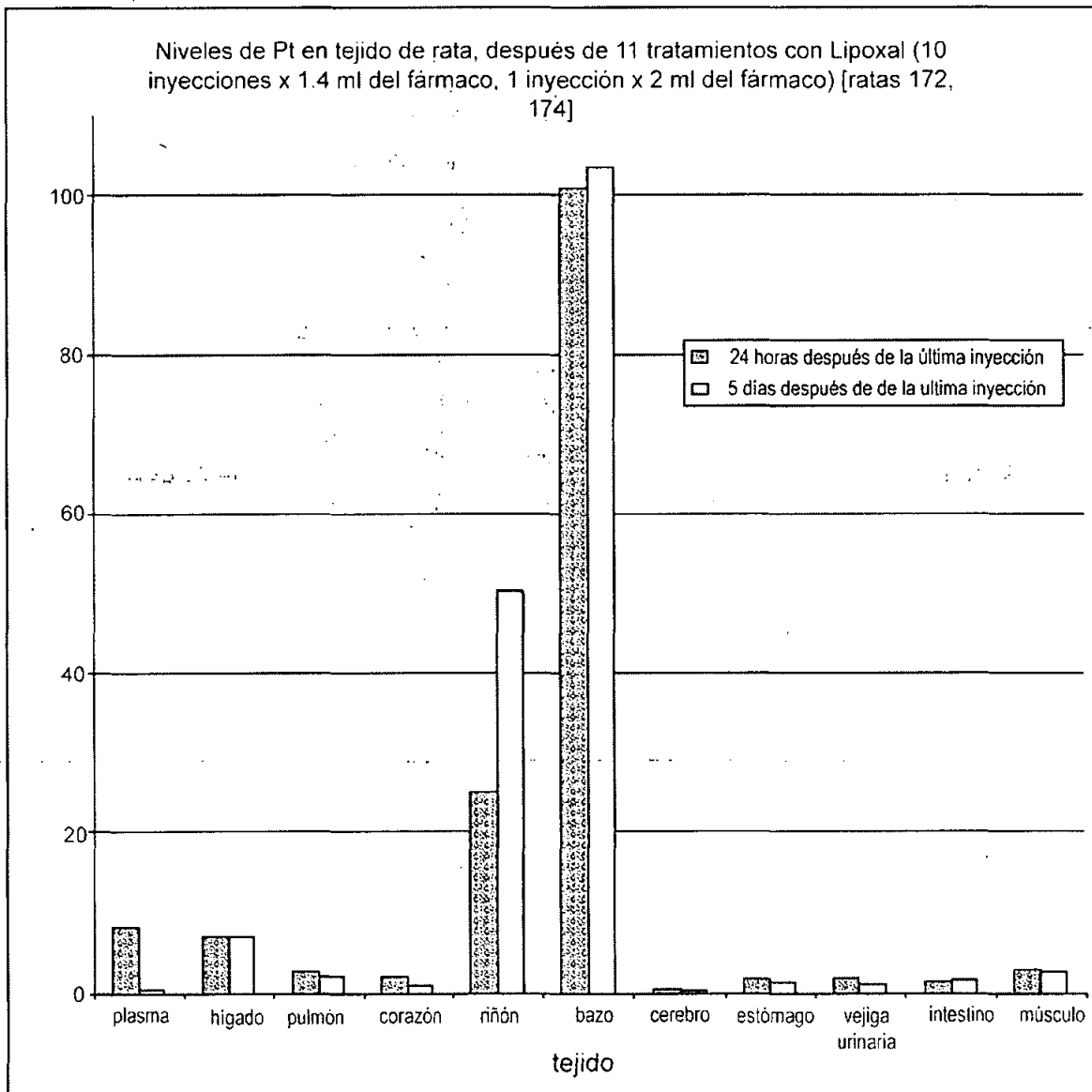
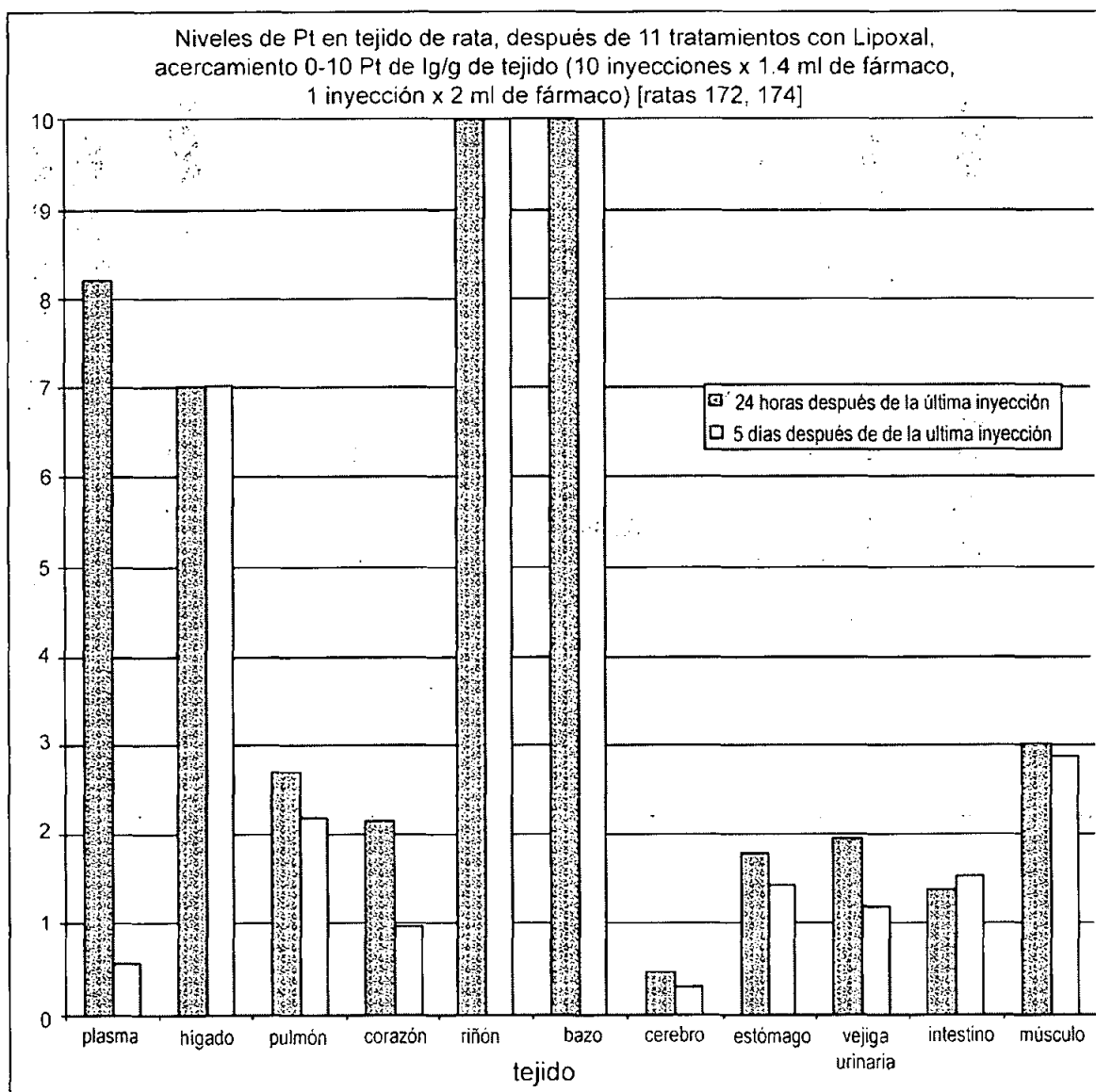
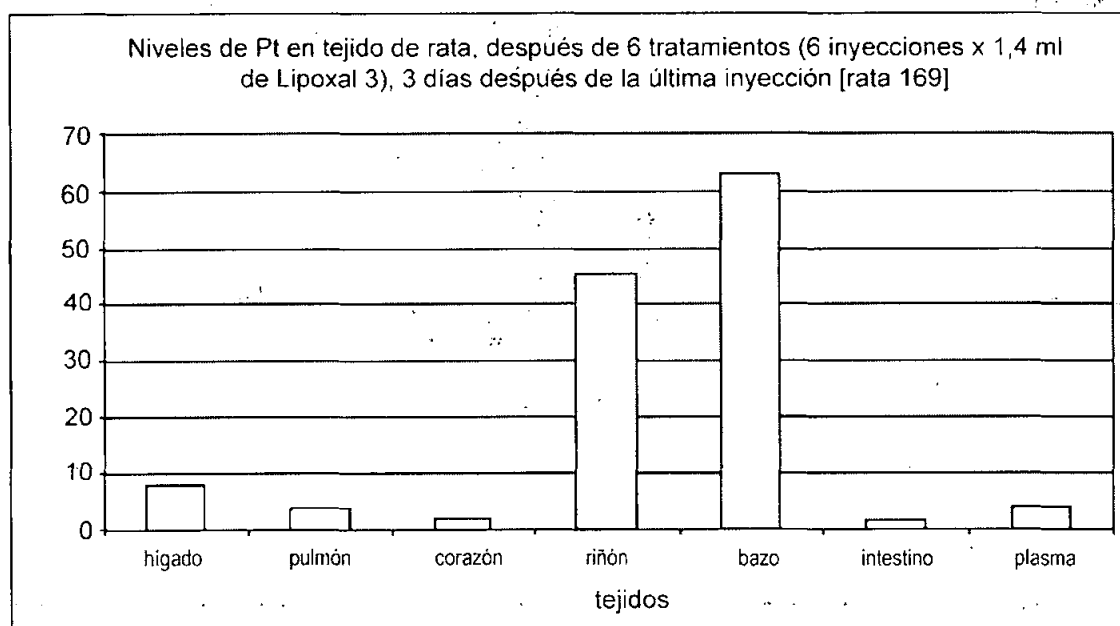


FIG. 11A

12/18

**FIG. 11B**

**FIG. 12**

Tratamiento de Lipoxal de ratones desnudos con
xenoinjertos de tumor de mama MX-1 humano

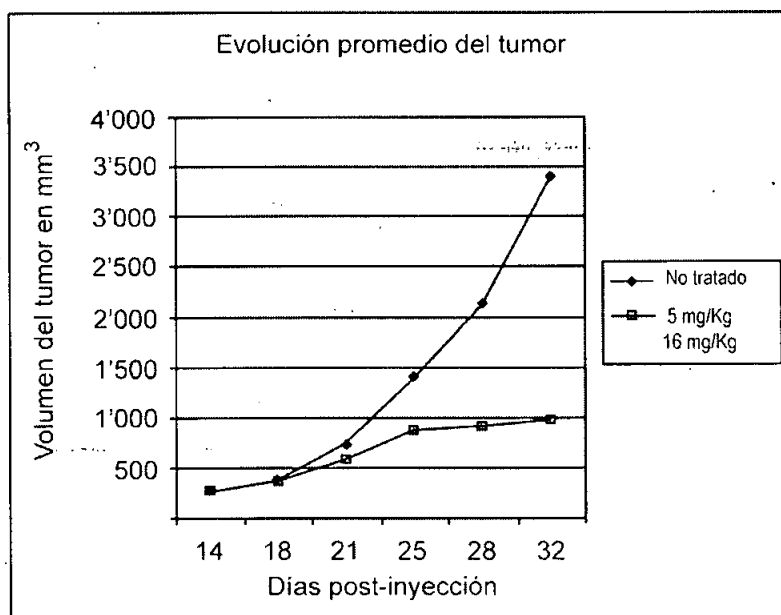


FIG. 13

15/18

Lipoxal: xenoinjertos de ratón desnudo/MX-1
humano

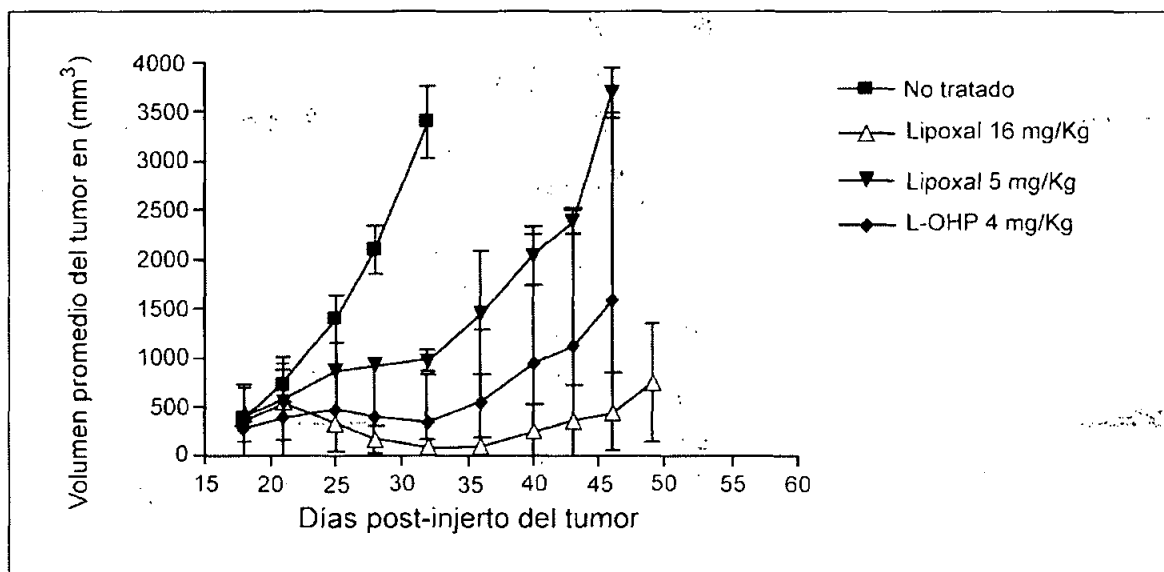


FIG. 14

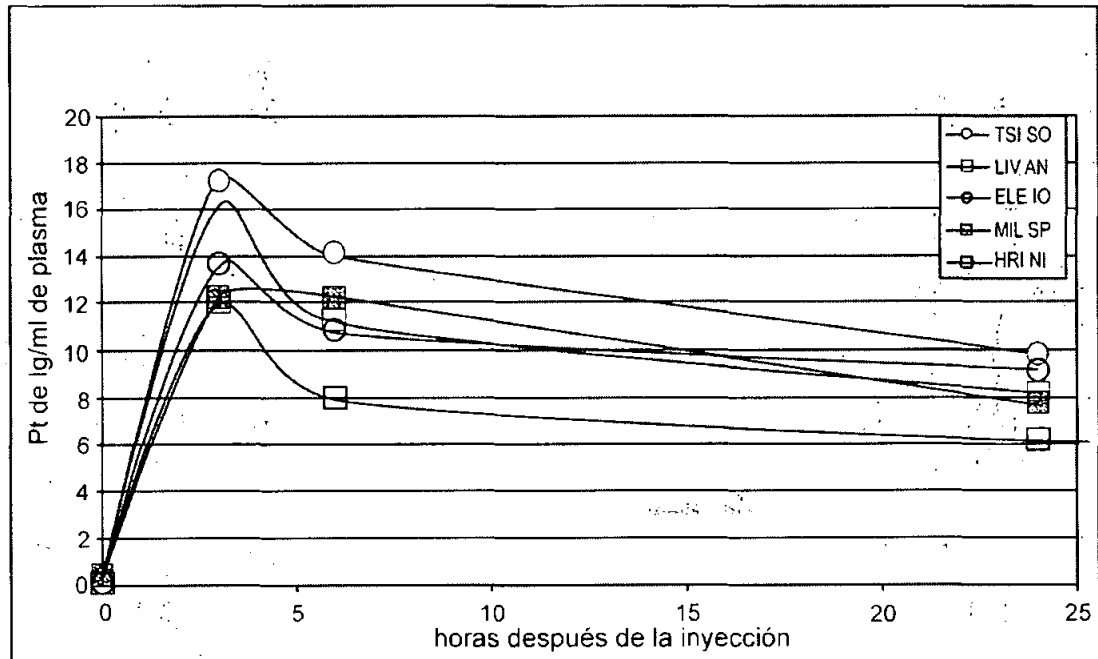


FIG. 15

Niveles de Pt durante la quimioterapia de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal (0-25 horas)

Dosis de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal: 350 mg/m²

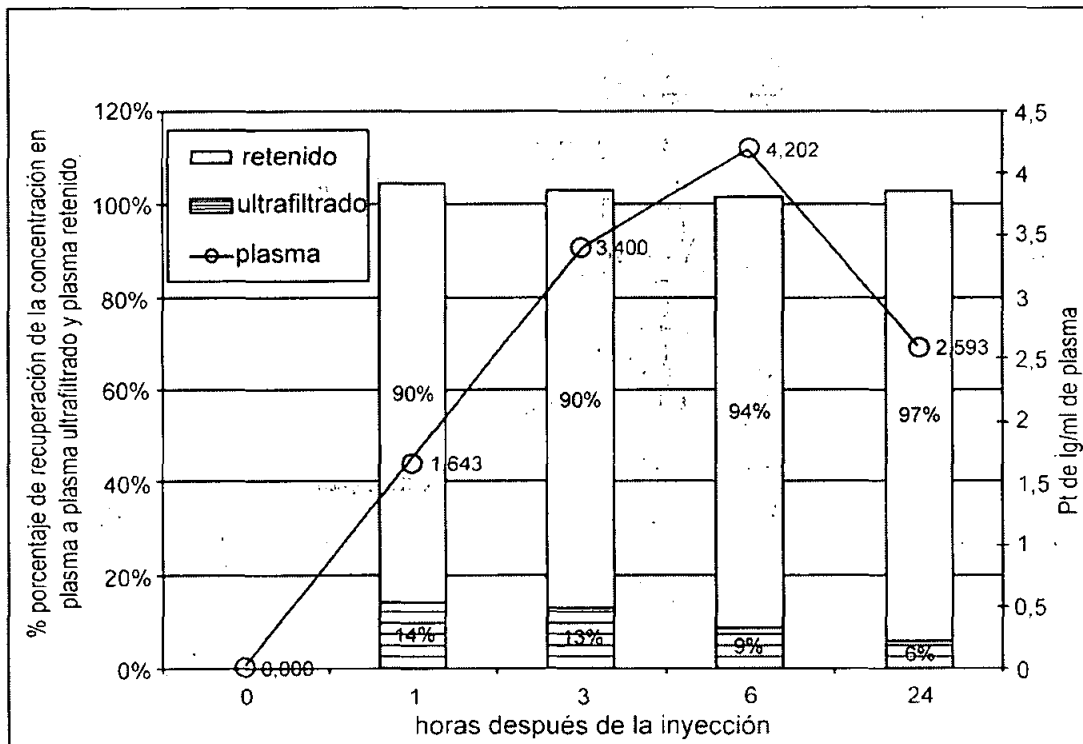


Fig. 16 Distribución de niveles de Pt en plasma durante el tratamiento de quimioterapia de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal
Dosis de oxaliplatina encapsulada de manera liposomal 420 mg (250 mg/m²)

2627

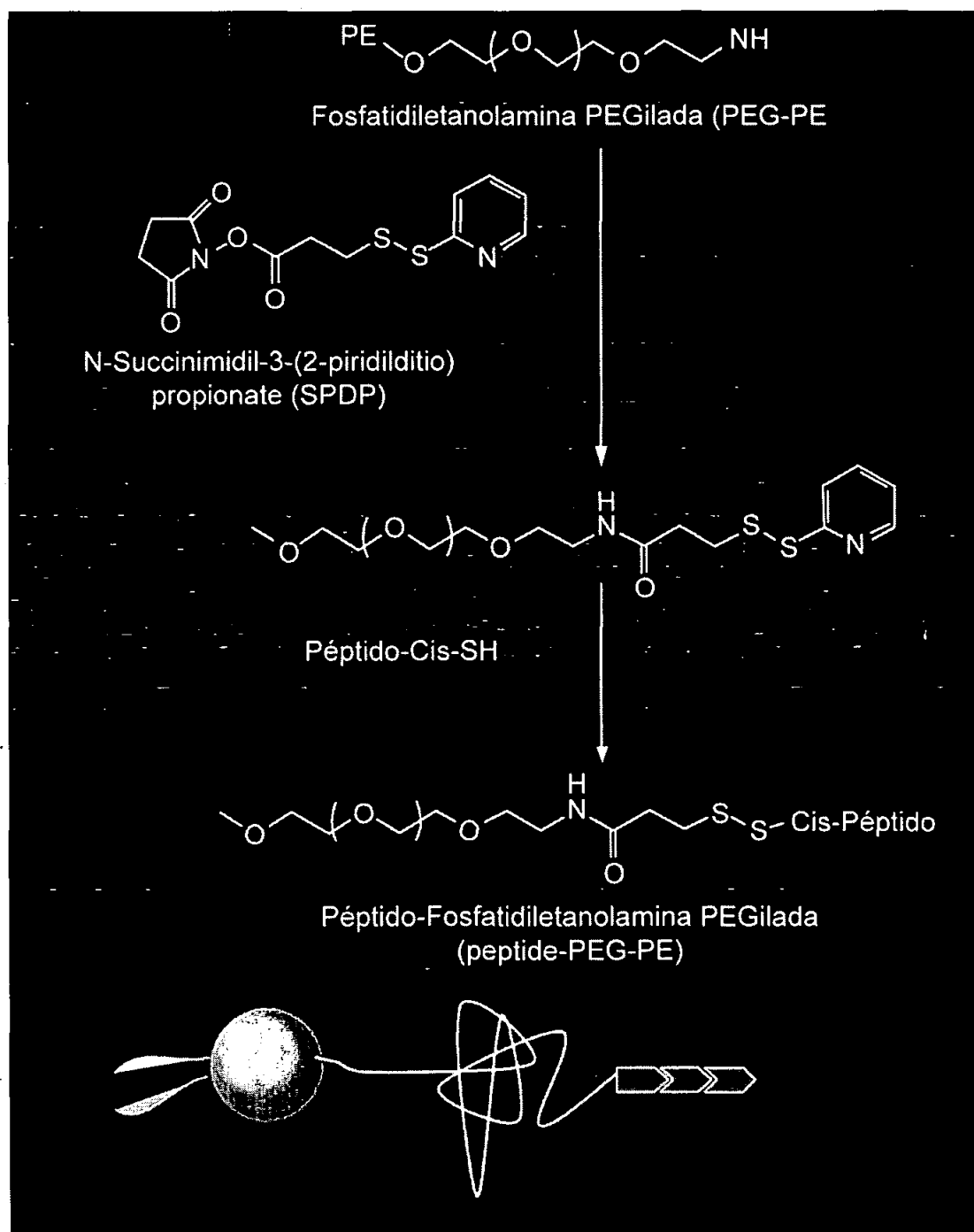


FIG. 17 Procedimiento químico para acoplar péptidos a PEG-DSPE

CLAIMS:

1. A method for forming a micelle comprising oxaliplatin, the method comprising combining an effective amount of oxaliplatin and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid with a solvent.
2. A method according to claim 1 wherein the solvent is ethanol and is present at 20 to 40%.
3. A method according to claim 1 or 2 wherein the negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG), dimyristoyl phosphatidyl glycerol (DMPG), diaproyl phosphatidyl glycerol (DCPG), distearoyl phosphatidyl glycerol (DSPG) or dioleoyl phosphatidyl glycerol (DOPG).
4. A method according to claim 3 wherein the negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is DPPG.
5. A method according to a preceding claim wherein the molar ratio of oxaliplatin to negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is 1:1 to 2:1.
6. A method for encapsulating oxaliplatin into a liposome comprising combining an oxaliplatin micelle as defined in any of claims 1 to 5 with a preformed liposome or lipids.
7. A method according to claim 6 wherein the preformed liposome or lipids comprise negatively and/or positively charged lipids.
8. A method according to claim 7 wherein lipids are phospholipids or derivatives thereof.
9. A method according to claim 8 wherein the lipid is DDAB, dimethyldioctadecyl ammonium bromide; DMRIE: N-[1-(2,3-dimyristyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-(2-hydroxyethyl) ammonium bromide; DMTAP: 1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonium propane; DOGS: Dioctadecylamidoglycylspermine; DOTAP: N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride; DOTMA: N-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-n,n,n-trimethylammonium chloride; DPTAP: 1,2- dipalmitoyl-3-trimethylammonium propane or DSTAP: 1,2-distearoyl-3-trimethylammonium propane.

10. A method according to claim 7 wherein the liposome comprises one or more of cholesterol, phosphatidyl choline, phosphatidylethanolamine, hydrogenated soy phosphatidylcholine or ceramidine.

11. A method according to claim 10 wherein the preformed liposome further comprise an ammonium salt.

12. A method for encapsulating oxaliplatin into a liposome comprising the following steps:

Eliminado: oxaliplatin

- e) forming a micelle comprising oxaliplatin by combining an effective amount of oxaliplatin and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid with a solvent and
- f) combining said oxaliplatin micelle with a preformed liposome or lipids.

13. A method according to claim 12 wherein the solvent is ethanol and is present at 20 to 40%.

14. A method according to claim 12 or 13 wherein the negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is DPPG, DMPG, DCPG, DSPG or DOPG.

15. A method according to claim 14 wherein the negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is DPPG.

16. A method according to any of claims 12 to 15 wherein the molar ratio of oxaliplatin to negatively charged phosphatidyl glycerol lipid is 1:1 to 1:2.

17. A method according any of claims 6 to 16 further comprising coating the surface of the liposome membrane with a polymer.

18. A method according to claim 17 wherein a ligand is conjugated to the polymer.

19. A method according to claim 18 wherein the ligand is capable of directing the liposome to a specific cell type with surface receptors recognized by the ligand.

20. A method according to claim 18 or claim 19 wherein the ligand is a peptide.

21. A method according to claim 19 wherein the ligand is selected from epidermal growth factor or an epitope thereof, endostatin, antithrombin, anastellin, angiostatin, PEX or pigment epithelial-derived factor

22. A method according a preceding claim further comprising including another antitumour drug in the micelle or liposome.

23. A method according to claim 22 wherein the drug selected from cisplatin, paclitaxel, SN-38, docetaxel, irinotecan, 5-fluorodeoxyuridine or doxorubicin.

24. A micelle obtained by the method of claims 1 to 5.

25. A micelle comprising an effective amount of oxaliplatin and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid.

26. A micelle according to claim 25 wherein the phosphatidyl glycerol lipid is DPPG.

27. A micelle according to any of claims 25 to 26 further comprising another anticancer drug.

28. A micelle according to claim 27 wherein the drug selected from cisplatin, paclitaxel, SN-38, docetaxel, irinotecan, 5-fluorodeoxyuridine or doxorubicin.

Eliminado: 29

29. A liposome comprising oxaliplatin obtained by the method of any of claims 6 to 23.

30. A liposome comprising an effective amount of oxaliplatin wherein the inner and outer layer of the liposome comprise different lipids.

31. A liposome according to claim 30 comprising a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid.

32. A micelle according to claim 31 wherein the phosphatidyl glycerol lipid is DPPG.

33. A liposome according to claim 32 further comprising one or more of cholesterol, phosphatidyl choline, phosphatidylethanolamine, hydrogenated soy phosphatidylcholine, ceramide.

34. A liposome according to any of claims 30 to 33 wherein the surface of the liposome is coated with a coating which allows the liposome to evade immune surveillance.

35. A liposome according to claim 34 wherein the coating is a polymer.

36. A liposome according to claim 35 wherein the polymer is PEG.

37. A liposome according to claim 35 or 36 claim wherein a ligand is conjugated to the polymer.

38. A liposome according to claim 37 wherein the ligand is capable of directing the liposome to a specific cell type with surface receptors recognized by the ligand.

39. A liposome according to claim 37 or claim 38 wherein the ligand is a peptide.

40. A liposome according to claim 37 wherein the ligand is selected from epidermal growth factor or an epitope thereof, endostatin, antithrombin, anastellin, angiostatin, PEX or pigment epithelial-derived factor.

41. A liposome according to any of claims 28 to 40 wherein the liposome has a particle size of 80-120nm.

42. A liposome according to claims 28 to 38 further comprising an effective amount of another anticancer drug characterised in that oxaliplatin and the other drug are encapsulated in the same liposome.

43. A liposome according to claim 39 wherein the anticancer drug selected from cisplatin, docetaxel, paclitaxel, gemcitabine, navelbine, doxorubicin, irrinotecan, SN-38, gemcitabine or 5-fluorodeoxyuridine.

44. A liposome according to claims 28 to 38 further comprising an effective amount of an anticancer gene characterised in that oxaliplatin and the other drug are encapsulated in the same liposome.

45. A liposome according to claim 44 wherein the anticancer gene is p53, IL-2, IL-12, angiostatin, and oncostatin.

46. A liposome according to any of claims 27 to 45 for use as a cancer medicament.

Eliminado: 44

47. The use of a liposome according to any of claims 27 to 45 in the manufacture of a medicament for the treatment of cancer.

Eliminado: 46

48. A method of treating cancer comprising administering a liposome as defined in any of claims 27 to 45.

Eliminado: 47

49. The use or method according to claims 46 or 47 wherein the liposome is administered weekly or biweekly by intravenous infusion 3 hour and oxaliplatin is present at a dosage of 100 to 350mg/m².

Eliminado: 48

50. The use or method according to claims 48 wherein the dosage is 100, 150, 200, 250 or 300mg/m².

Eliminado: 49

51. The use or method according to claim 49 wherein the dosage is 300mg/m².

Eliminado: 50

52. The use or method according to claims 48 to 50 wherein infusion is for 3 hours infusion once a week.

Eliminado: 51

53. The use or method according to claims 48 to 51 wherein administration is in 2 to 4 cycles, each cycle lasting about 8 weeks and followed one week rest between cycles.

Eliminado: 52

54. The use or method according to claims 48 to 51 wherein the cancer is selected from colorectal cancer, gastric, pancreatic, bladder, breast cancer, colorectal, gastric, oesophageal, pancreatic, urothelial, non-small cell lung, breast, prostate, head & neck, melanoma, testicular or ovarian cancer.

Eliminado: 53

55. The use or method according to claim 53 wherein the cancer is colorectal, gastric or pancreatic cancer.

Eliminado: 54

56. A liposome comprising an effective amount of oxaliplatin and another anticancer drug or an anticancer gene drug and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid.

Eliminado: 55

57. A combination therapy comprising administering a liposome encapsulating effective amount of oxaliplatin and encapsulating another anticancer drug or an anticancer gene drug.

Eliminado: 56

58. A liposome according to claim 55 or 56 wherein the drug selected from cisplatin, paclitaxel, SN-38, docetaxel, irinotecan, 5-fluorodeoxyuridine or doxorubicin.

Eliminado: 57

59. A combination therapy comprising administering an effective amount of gemcitabine and a liposome encapsulating an effective amount of cisplatin.

Eliminado: 58

60. A combination therapy according to claim 58 wherein gemcitabine does not form part of the cisplatin liposome.

61. A combination therapy according to claim 58 or 60 wherein gemcitabine is administered at the same time as the cisplatin liposome.

62. A combination therapy according to claim 58 or 60 wherein gemcitabine is administered at a different time than the cisplatin liposome.

63. A combination therapy according to any of claims 58 to 62 wherein the cancer is pancreatic cancer, colorectal cancer, gastric cancer, breast cancer, non-small cell lung cancer, ovarian cancer, head and neck cancer, prostate cancer, testicular, intestinal cancer, bladder, oesophageal or urothelial cancer.

64. A combination therapy according to any of claims 58 to 63 wherein gemcitabine is administered at a dosage of 800 to 1000mg/m².

65. A combination therapy according claim 64 wherein gemcitabine is administered by intravenous infusion at a dosage 1000mg/m².

66. A combination therapy according claim 64 or 65 wherein gemcitabine is administered as a 60 min iv infusion every two weeks.

67. A combination therapy according to any of claims 58 to 66 wherein the cisplatin liposome is administered by intravenous infusion at a dosage of 100 to 125 mg/m².

REIVINDICACIONES

1. Un método para formar un micelo que comprende oxaliplatina, comprendiendo el método combinar una cantidad efectiva de oxaliplatina y un lípido de fosfatidil glicerol
5 cargado de manera negativa con un solvente.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el solvente es etanol y se presenta de 20 hasta 40%.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el lípido de fosfatidil glicerol cargado de
10 manera negativa es fosfatidil glicerol de dipalmitoilo (DPPG), fosfatidil glicerol de dimiristol (DMPG), fosfatidil glicerol de diaproilo (DCPG), fosfatidil glicerol de diestearoilo (DSPG) o fosfatidil glicerol de dioleilo (DOPG).

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3,
15 en donde el lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa es DPPG.

5. Un método de acuerdo con una reivindicación precedente, en donde la proporción molar de oxaliplatina al lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa es
20 1:1 hasta 2:1.

6. Un método para encapsular oxaliplatina en un liposoma que comprende combinar un micelo de oxaliplatina como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con un liposoma o lípidos preformados.

25 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6,

en donde el liposoma o lípidos preformados comprenden lípidos cargados de manera negativa y/o positiva.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los lípidos son fosfolípidos o derivados de los mismos.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el lípido es DDAB, bromuro de dimetildioctadecil amonio; DMRIE: bromuro de N-[1-(2,3-dimiristiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil) amonio; DMTAP: 1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio propano; DOGS: Dioctadecilamidoglicilespermina; DOTAP: cloruro de N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio; DOTMA: cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-n,n,n-trimetilamonio; DPTAP: 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio propano o DSTAP: 1,2-diesteroil-3-trimetilamonio propano.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el liposoma comprende uno o más de colesterol, fosfatidil colina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina de soya hidrogenada o ceramida.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el liposoma preformado comprende además una sal de amonio.

12. Un método para encapsular oxaliplatina en un liposoma que comprende las siguientes etapas:

e) formar un micelo que comprende oxaliplatina al

combinar una cantidad efectiva de oxaliplatina y un lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa con un solvente y

f) combinar dicho micelo de oxaliplatina con un liposoma o lípidos preformados.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el solvente es etanol y se presenta de 20 hasta 40%.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, en donde el lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa es DPPG, DMPG, DCPG, DSPG o DOPG.

15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa es DPPG.

16. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en donde la proporción molar de oxaliplatina al lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa es 1:1 a 1:2.

17. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, que comprende además cubrir la superficie de la membrana de liposoma con un polímero.

18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde un ligando se conjuga con el polímero.

19. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el ligando es capaz de dirigir el liposoma a un tipo de célula específico con receptores superficiales reconocidos

por el ligando.

20. Un método de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19, en donde el ligando es un péptido.

21. Un método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el ligando se selecciona a partir de factor de crecimiento epidérmico o un epítipo del mismo, endostatina, antitrombina, anastelina, angiostatina, PEX o factor derivado de epitelio de pigmento.

22. Un método de acuerdo con una reivindicación precedente que comprende además incluir otro fármaco anti-tumor en el micelo o liposoma.

23. Un método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el fármaco se selecciona a partir de cisplatina, paclitaxel, SN-38, docetaxel, irrinotecan, 5-fluorodesoxiuridina o doxorubicina.

24. Un micelo obtenido por el método de las reivindicaciones 1 a 5.

25. Un micelo que comprende una cantidad efectiva de oxaliplatina y un lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa.

26. Un micelo de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el lípido de fosfatidil glicerol es DPPG.

27. Un micelo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 26, que además comprende otro fármaco anti-cáncer.

28. Un micelo de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el fármaco se selecciona a partir de cisplatina, paclitaxel, SN-38, docetaxel, irrinotecan, 5-fluorodesoxiuridina o doxorubicina.

29. Un liposoma que comprende oxaliplatina obtenida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 23.

30. Un liposoma que comprende una cantidad efectiva de oxaliplatina en donde la capa interna y externa del liposoma comprende diferentes lípidos.

31. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 30 que comprende un lípido de fosfatidil glicerol cargado de manera negativa.

32. Un micelo de acuerdo con la reivindicación 31, en donde el lípido de fosfatidil glicerol es DPPG.

33. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 32, que comprende además uno o más de colesterol, fosfatidil colina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina de soya hidrogenada, ceramida.

34. Un liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33, en donde la superficie del liposoma se cubre con una cubierta que permite que el liposoma evada la supervivencia inmune.

35. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la cubierta es un polímero.

36. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el polímero es PEG.

37. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 35 ó 36, en donde un ligando se conjuga con el polímero.

5 38. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 37, en donde el ligando es capaz de dirigir el liposoma a un tipo de célula específico con receptores superficiales reconocidos por el ligando.

39. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 37 ó la reivindicación 38, en donde el ligando es un péptido.

40. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 37, en donde el ligando se selecciona a partir del factor de crecimiento epidérmico o un epítipo del mismo, endostatina, antitrombina, anastelina, angiostatina, PEX o factor derivado
15 de epitelio de pigmento.

41. Un liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 40, en donde el liposoma tiene un tamaño de partícula de 80-120 nm.

42. Un liposoma de acuerdo con las
20 reivindicaciones 28 a 38, que comprende además una cantidad efectiva de otro fármaco anti-cáncer caracterizado en que la oxaliplatina y el otro fármaco se encapsulan en el mismo liposoma.

43. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación
25 39, en donde el fármaco anti-cáncer se selecciona a partir de

223
cisplatina, docetaxel, paclitaxel, gemcitabina, navelbina, doxorubicina, irrinotecan, SN-38, gemcitabina o 5-fluorodesoxiuridina.

5 44. Un liposoma de acuerdo con las reivindicaciones 28 a 38, que comprende además una cantidad efectiva de un gen anti-cáncer caracterizado en que la oxaliplatina y el otro fármaco se encapsulan en el mismo liposoma.

10 45. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el gen anti-cáncer es p53, IL-2, IL-12, angiostatina y oncostatina.

46. Un liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 45 para utilizarse como un medicamento para el cáncer.

15 47. El uso de un liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 45 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

20 48. Un método para el tratamiento de cáncer que comprende administrar un liposoma como se define en cualquiera de las reivindicaciones 27 a 45.

49. El uso o método de acuerdo con las reivindicaciones 46 ó 47, en donde el liposoma se administra cada semana o cada dos semanas por infusión intravenosa 3 horas y la oxaliplatina se presenta en una dosis de 100 hasta 25 350 mg/m².

50. El uso o método de acuerdo con la reivindicación 48, en donde la dosis es de 100, 150, 200, 250 ó 300 mg/m².

51. El uso o método de acuerdo con la reivindicación 49, en donde la dosis es de 300 mg/m².

52. El uso o método de acuerdo con las reivindicaciones 48 a 50, en donde la infusión es durante 3 horas de infusión una vez a la semana.

53. El uso o método de acuerdo con las reivindicaciones 48 a 51, en donde la administración es en 2 a 4 ciclos, durando cada ciclo aproximadamente 8 semanas y seguido por una semana de reposo entre ciclos.

54. El uso o método de acuerdo con las reivindicaciones 48 a 51, en donde el cáncer se selecciona a partir de cáncer colorrectal, gástrico, pancreático, de vejiga, cáncer de mama, colorrectal, gástrico, esofágico, pancreático, urotelial, de pulmón de célula no pequeña, de mama, próstata, cabeza y cuello, melanoma, testicular o de ovario.

55. El uso o método de acuerdo con la reivindicación 53, en donde el cáncer es cáncer colorrectal, gástrico o pancreático.

56. Un liposoma que comprende una cantidad efectiva de oxaliplatina y otro fármaco anti-cáncer o un fármaco de gen anti-cáncer y un lípido de fosfatidil glicerol

cargado de manera negativa.

57. Una terapia de combinación que comprende administrar un liposoma que encapsula una cantidad efectiva de oxaliplatina y encapsular otro fármaco anti-cáncer o un fármaco de gen anti-cáncer.

58. Un liposoma de acuerdo con la reivindicación 55 ó 56, en donde el fármaco se selecciona a partir de cisplatina, paclitaxel, SN-38, docetaxel, irrinotecan, 5-fluorodesoxiuridina o doxorubicina.

59. Una terapia de combinación que comprende administrar una cantidad efectiva de gemcitabina y un liposoma que encapsula una cantidad efectiva de cisplatina.

60. Una terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 58, en donde la gemcitabina no forma parte del liposoma de cisplatina.

61. Una terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 58 ó 60, en donde la gemcitabina se administra al mismo tiempo que el liposoma de cisplatina.

62. Una terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 58 ó 60, en donde la gemcitabina se administra en un momento diferente del liposoma de cisplatina.

63. Una terapia de combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 58 a 62, en donde el cáncer es cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón de célula no

pequeña, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, testicular, cáncer intestinal, de vejiga, esofágico o cáncer urotelial.

64. Una terapia de combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 58 a 63, en donde la gemcitabina se administra en una dosis de 300 hasta 1000 mg/m².

65. Una terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 64, en donde la gemcitabina se administra por infusión intravenosa a una dosis de 1000 mg/m².

66. Una terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 64 ó 65, en donde la gemcitabina se administra como una infusión iv de 60 min cada dos semanas.

67. Una terapia de combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 58 a 66, en donde el liposoma de cisplatina se administra por infusión intravenosa a una dosis de 100 hasta 125 mg/m².

68. Una terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 67, en donde el liposoma de cisplatina se administra como una infusión IV de 8 horas cada dos semanas.

227

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44bis)

Applicant's or agent's file reference lipoxal/pct	FOR FURTHER ACTION		See item 4 below
International application No. PCT/GR2007/000015	International filing date (day/month/year) 05 March 2007 (05.03.2007)	Priority date (day/month/year) 03 March 2006 (03.03.2006)	
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237			
Applicant BOULIKAS, Parthenios			

1.	This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 bis.1(a).		
2.	This REPORT consists of a total of 14 sheets, including this cover sheet.		
In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.			
3.	This report contains indications relating to the following items:		
	☒ Box No. I	Basis of the report	
	☐ Box No. II	Priority	
	☒ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	
	☒ Box No. IV	Lack of unity of invention	
	☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	
	☒ Box No. VI	Certain documents cited	
	☐ Box No. VII	Certain defects in the international application	
	☒ Box No. VIII	Certain observations on the international application	
4.	The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44bis.3(c) and 93bis.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44bis .2).		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland		Date of issuance of this report 09 September 2008 (09.09.2008)
Facsimile No. +41 22 338 82 70		Authorized officer Athina Nickitas-Etienne
		e-mail: pt04.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/GR2007/000015

International filing date (day/month/year)
05.03.2007

Priority date (day/month/year)
03.03.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K9/127 A61K31/555 A61P35/00

Applicant
BOULIKAS, Parthenios

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Collins, Sally

Telephone No. +49 89 2399-4724



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GR2007/000015

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**International application No.
PCT/GR2007/000015**Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 47-54

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 47-54 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13~~ter~~.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

 International application No.
PCT/GR2007/000015

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
 - ☒ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
 - ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
 - ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-29</u>
	No: Claims	<u>30-68</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>none</u>
	No: Claims	<u>1-68</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-46, 55-68</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GR2007/000015

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)
and /or
2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)
see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GR2007/000015

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to industrial applicability

Claims 47-54 relate to methods of treatment of the human or animal body by therapy and/or by surgery. In this regard, for the assessment of these claims with respect to industrial applicability, no unified criteria exist in the PCT. The Applicant is warned however, that certain regional/national authorities, e.g. the EPO, do not accept methods of treatment of the human or animal body by therapy and/or by surgery. Further consideration of this matter will be made during the national/regional phase.

Re Item IV

Lack of unity of invention

This authority considers that there is a lack of unity in the present application (Rule 13.1 PCT) for the reasons given in form PCT/ISA/206. There are two inventions covered by the claims as follows:

Invention Subject 1 (Claims 1-57): Encapsulated oxaliplatin and its use in cancer therapy

Invention Subject 2 (Claims 58-68): Combination of encapsulated cisplatin and gemcitabine for cancer therapy.

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

1. Invention Subject 1: Encapsulated oxaliplatin and its use in cancer therapy

Reference is made to the following documents:

D1: WO 01/34130 A1 (BOULIKAS TENI [US]) 17 May 2001 (2001-05-17)

D2: PROCEEDINGS OF THE 8TH INTERNATIONAL CONFERENCE : EMERGING

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/GR2007/000015

TECHNOLOGIES IN DRUG AND GENE BASED THERAPEUTICS, September 2005 (2005-09), XP002446495

D3: WO 2005/000266 A (NEOPHARM INC [US]; JAMIL HARIS [US]; AHMAD IMRAN [US]; AHMAD ZAFEER [U] 6 January 2005 (2005-01-06)

D4: US 2004/022842 A1 (ERIGUCHI MASAZUMI [JP] ET AL) 5 February 2004 (2004-02-05).

D5: WO 01/93836 A (BOULIKAS TENI [US]) 13 December 2001 (2001-12-13)

1.1 Essential Features

1.1.1 Claim 1 of the present application is for a method of forming a micelle, comprising combining oxaliplatin and a negatively charged phosphatidyl glycerol lipid, in a solvent. It appears doubtful that simple mixing of oxaliplatin and the lipid in any solvent, under any conditions would indeed give rise to a micelle. The description of the present application (p.19, ex. 1) seems to imply that much more precise conditions are required to cause micelles to form. Therefore, there is a lack of essential features in claim 1, contrary to Art. 6 PCT in conjunction with Rule 6.3 (b) PCT, as a person skilled in the art would not necessarily obtain a micelle despite carrying out all the steps specified in the claim.

1.1.2 A similar consideration applies for independent claims 6 and 12 of the present application. These two claims both disclose a method of forming a liposome, consisting of first forming a micelle, then combining this micelle with a preformed liposome. Again, it is doubtful whether simple mixing of a liposome with a micelle under any possible conditions would indeed result in the product as claimed, leading to a lack of essential features.

1.2 Novelty

1.2.1 Claim 1 of the present application is for a method of forming a micelle comprising combining oxaliplatin and a **negatively** charged phosphatidyl glycerol lipid. As no documents have been found which disclose a micelle comprising oxaliplatin and such a lipid, claims 1-5, if rendered acceptable under rule 6.3(b) PCT, could be seen as being

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/GR2007/000015

new (Art. 33 (2) PCT).

1.2.2 Independent claims 6 and 12 disclose a method for forming a liposome. One of the steps of said method is forming the micelle as described in claim 1. As claim 1 is considered to be novel, claims 6-23 must also be new (Art. 33 (2) PCT).

1.2.3 Independent claims 24, 25 and 29 disclose the products obtained by the methods disclosed previously. As the methods are novel, by consequence their products must be new. Therefore, **claims 1-29, if rendered acceptable under rule 6.3(b) PCT, may be considered new (Art. 33 (2) PCT).**

1.2.4 Claim 30 of the present application is for a liposome comprising different lipids in the inner and outer layer. Figure 1 of the present invention is a drawing of encapsulated oxaliplatin. The liposome appears to have a different lipids in the outer and inner layers. The figure labels this encapsulated oxaliplatin as being lipoxal. Document D2 states that a presentation was given in September 2005 on lipoxal. Therefore, a liposome comprising different lipids in the inner and outer layers must have been known in 2005. Hence **claim 30 of the present application is not new** in the sense of article 33 (1) PCT.

1.2.5 Dependent claims 31-41 define the desired liposome more precisely. However, it has been assumed that these are the characteristics of lipoxal, and hence do not confer novelty to the claimed liposomal formulation.

1.2.6 Claims 42-45 of the present application combine a second anti-cancer agent into the oxaliplatin liposome. There is no indication in D2 that a combination of agents was encapsulated. Only lipoxal itself is mentioned. Therefore, **claims 42-45 appear to be novel.**

1.2.7 Claim 46 of the present application as well as the preceding, erroneously numbered claim, are for the use of a liposome as defined in claim 30 to treat cancer. However, D2 discloses that the use of lipoxal to treat cancer was discussed at the 8th international Conference "Emerging Technologies in Drug and Gene Based Therapeutics". Therefore, **claims 46-54 are not new in the sense of article 33 (2) PCT.**

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/GR2007/000015

1.2.8 Claims 55-57 are for any liposome containing oxaliplatin as well as a second anti cancer drug, wherein the liposome comprises negatively charged phosphatidyl glycerol lipids. Document D3 discloses a liposome which can comprise phosphatidyl glycerol lipids, and can be negatively charged (claims 15, 17). This liposome contains two or more anti cancer agents, selected from a list including oxaliplatin (claim 1, 2, 35). Therefore, **claims 55-57 are not new** in the sense of article 33 (2) PCT.

1.3 Inventive Step

1.3.1 Document D1 discloses a liposomal formulation containing cisplatin. The liposomes are the same as those of the present application, and the methods of formation are also the same. The only difference between D1 and the present application is that in the present application oxaliplatin is used as the active ingredient instead of cisplatin.

1.3.2 Platinum based cancer drugs are well known to a person skilled in the art. Oxaliplatin and other similar drugs were developed as alternatives to cisplatin. As the properties of these drugs are similar, a person skilled in the art would consider them to be known equivalents. When looking for a different platinum based cancer drug to encapsulate in a specific liposome, a skilled person would choose any one of a number of alternatives, knowing that they would all react in essentially the same way. Therefore, the use of oxaliplatin instead of cisplatin cannot be seen as comprising an inventive step, unless an unexpected technical effect due to this replacement can be demonstrated.

1.3.3 Moreover, preparations containing oxaliplatin liposomes are known in the prior art. D4 uses a pegylated liposome, derivatised with transferrin to target certain cells. The objective technical problem of the current application over D4 appears to be: to use an alternative liposome to encapsulate oxaliplatin. A person skilled in the art, with knowledge of D1 in which the same liposomes as those of the present application are used with an alternative platinum based anticancer drug, would combine D1 and D4 to arrive at the encapsulation of the present application. Therefore, **no inventive step may be recognised for claims 1-57 of the present application** (Art. 33 (3) PCT).

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GR2007/000015

1.3.4 Notwithstanding the above argument, no technical effect of the current liposome over any other liposome has been demonstrated in the present application. Therefore, the simple replacement of one liposome by another is a simple use of known measures, and no inventive step can be recognised.

2. Invention Subject 2: Combination of encapsulated cisplatin and gemcitabine for cancer therapy.

Reference is made to the following documents:

D1: WO 01/34130 A1 (BOULIKAS TENI [US]) 17 May 2001 (2001-05-17)

D11: BOULIKAS T ET AL: "Liposomally encapsulated cisplatin and oxaliplatin as revolutionary chemotherapy drugs" 2004, ANTICANCER RESEARCH, HELENIC ANTICANCER INSTITUTE, ATHENS,, GR, PAGE(S) 4265-4266 ; XP009088082 ISSN: 0250-7005

D12: US 2003/147945 A1 (TARDI PAUL [CA] ET AL) 7 August 2003 (2003-08-07)

D13: V. HEINEMANN ET AL: "Gemcitabine and cisplatin in the treatment of advanced or metastatic pancreatic cancer" ANNALS OF ONCOLOGY, vol. 11, 2000, pages 1399-1403, XP002468858

D14: T. BAUKNECHT ET AL: "Gemcitabine combined with cisplatin as first-line treatment in patients 60 years or older with epithelial ovarian cancer: a phase II study" INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNECOLOGICAL CANCER, vol. 13, 2003, pages 130-137, XP002468859

D15: "994 ORAL Paclitaxel and gemcitabine vs. paclitaxel and pegylated liposomal doxorubicin in advanced non-nasopharyngeal head and neck cancer. a phase III study conducted by the hellenic cooperative oncology group (HeCOG)" October 2005 (2005-10), EUROPEAN JOURNAL OF CANCER. SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, GB, PAGE(S) 286 ; XP005133108 ISSN: 1359-6349

D16: WO 2004/054499 A (TRANSAVE INC [US]) 1 July 2004 (2004-07-01)

D17: MARK J. MCKEAGE: "New-generation platinum drugs in the treatment of cisplatin-resistant cancers" EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GR2007/000015

DRUGS, vol. 14, no. 8, 2005, pages 1033-1046, XP002468860

2.1 Novelty

2.1.1 Claim 58 of the present application seeks protection for a combination of gemcitabine and liposomally encapsulated cisplatin to treat cancer. Claim 60 restricts this further in that only the cisplatin may be encapsulated.

2.1.2 Document D11 discloses the use of a combination of lipoplatin (which is liposomally encapsulated cisplatin) and gemcitabine to treat a number of cancers.

Therefore, the subject matter of claims 58-68 is not novel (Art 33(2) PCT).

2.1.3 Document D12 discloses a combination of lipoplatin and gemcitabine (claim 20), wherein both agents are encapsulated in a liposome. The subject matter of claim 58 is not new over D12.

2.2 Inventive Step

2.2.1 Document D1 discloses the use of liposomally encapsulated cisplatin to treat cancer. The lipoplatin may be administered in combination with another anti-cancer drug (claim 28). The difference between D1 and the present claims 58-68 appears to be that a different combination partner is administered with the lipoplatin. The objective technical problem is: to provide an alternative anti-cancer combination therapy using lipoplatin.

2.2.2 To select one possible anti-cancer drug amongst the many available would be seen as a mere selection amongst equally likely alternatives, unless an advantage of choosing gemcitabine instead of one of the drugs given in D1 can be demonstrated.

2.2.3 Moreover, the combination of gemcitabine with cisplatin is described in documents D13 and D14. Therefore, a person skilled in the art, looking for a combination partner for liposomally encapsulated cisplatin would preferentially select gemcitabine, as it has already been demonstrated that no adverse effects occur in such a combination.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GR2007/000015

Therefore, the subject matter of claims 58-68 of the present application does not comprise an inventive step (Art. 33(3) PCT).

Re Item VI

Certain documents cited

The Applicant is warned that the disclosure of documents:

- D8: G. P. STATHOPOULOS, T. BOULIKAS, A. KOURVETARIS, J. STATHOPOULOS:
"Liposomal Oxaliplatin in the Treatment of Advanced Cancer: A Phase I Study"
ANTICANCER RESEARCH, vol. 26, 2006, pages 1489-1494, XP002446497
D9: ANDRÉ FEDIER ET AL: "MLH1-deficient tumor cells are resistant to lipoplatin,
but retain sensitivity to lipoxal" ANTI-CANCER DRUGS, RAPID
COMMUNICATIONS, OXFORD, GB, vol. 17, 2006, pages 315-323,
XP009087880 ISSN: 0959-4973
D10: US 2007/160656 A1 (DZIEWISZEK KRZYSZTOF J [US] ET AL) 12 July 2007
(2007-07-12)

may become relevant in respect of novelty according national/ regional patent law. This matter will be considered further by the relevant national/ regional examining authorities, if and when the present application enters the national/regional phase(s).

Re Item VIII

Certain observations on the international application

Claim 28 is erroneously numbered, as are the claims 45-46.

Claim 32 is for a micelle, despite being dependent upon a claim for a liposome. It has been assumed that this is an error, and that the claim should read "A liposome according to claim 31...".

Claim 57 is for a liposome, but is dependent upon claim 56, which is for a combination therapy. Moreover, the wording of claim 57 is not clear.

240

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GR2007/000015



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 79,251
FECHA : OCTUBRE 3 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
GOMEZ PINZON ASEMARCAS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	4752580	03/10/2008	2,940,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-105757- -00000-0000

Fecha: 2008-10-03 16:34:57 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 241



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 ☐

Claudia M Nova
Firma Responsable

Fecha _____

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

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
JARAMILLO CAMPUZANO MAURICIO
Apoderado(a) y/o Representante de
PARTHENIOS BOULIKAS

REFERENCIA	Radicación No.	8 105757
	Solicitud internacional	PCT/GR2007/000015
	Fecha inicio fase nacional	03/10/2008
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	

13267

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. El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al capítulo I o II del PCT por que la indicación en el petitorio no corresponde a los documentos del expediente, en caso necesario adjuntar los documentos que corresponden.
2. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)
3. 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, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

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

Continúa en la página siguiente...

254

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 8 105757

e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 17 OCT. 2008
adpall