

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 944 576**

51 Int. Cl.:

A61K 31/436	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01) A61K 45/06	(2006.01)
A61K 47/10	(2007.01)	
A61K 47/18	(2007.01)	
A61K 47/20	(2006.01)	
A61K 47/22	(2006.01)	
A61K 47/24	(2006.01)	
A61K 47/26	(2006.01)	
A61K 47/34	(2007.01)	
A61K 47/36	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2017 PCT/JP2017/047408**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2018 WO18128173**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2017 E 17890478 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2023 EP 3565553**

54 Título: **Administración intratumoral de sirólimus para el tratamiento del cáncer de próstata**

30 Prioridad:

06.01.2017 US 201762443599 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2023

73 Titular/es:

**SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
9-19, Shimoshinjo 3-chome Higashiyodogawa-ku
Osaka-shi, Osaka 533-8651, JP**

72 Inventor/es:

**KUNDU, AISHWARYA;
ESCUDERO, CECILE y
MUDUMBA, SREENIVASU**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 944 576 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Administración intratumoral de sirólimus para el tratamiento del cáncer de próstata

5 La presente divulgación se refiere a métodos de tratamiento del cáncer de próstata mediante la administración local de una cantidad eficaz de sirólimus en la próstata de un sujeto que lo necesite. En particular, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento del cáncer de próstata mediante la inyección intratumoral de una formulación líquida que comprende sirólimus en la que la cantidad de sirólimus administrada está muy por encima de la dosificación utilizada para prevenir el rechazo de trasplantes.

10 Las referencias a métodos de tratamiento en la descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

15 La mayoría de los cánceres de próstata son adenocarcinomas de la próstata. De acuerdo con el National Cancer Institute, la edad mediana en el momento del diagnóstico del cáncer de próstata es de 66 años, y se prevé que en 2016 se lo diagnostique en más de 180.000 hombres. Aunque la tasa de supervivencia a los cinco años es muy alta para los hombres con enfermedad localizada o regional, la tasa de supervivencia cae a menos del 30 % para los hombres con cáncer de próstata metastásico. En la actualidad, el cáncer de próstata es la segunda causa principal de muerte por cáncer en los hombres estadounidenses.

25 Muchos cánceres de próstata se detectan durante las pruebas de detección de rutina. Las opciones de tratamiento varían según el estadio del cáncer en el momento del diagnóstico, la edad del paciente y la presencia de afecciones concomitantes. La extirpación quirúrgica de la próstata (prostatectomía) se emplea comúnmente para curar el cáncer de próstata en caso de que el cáncer no haya metastatizado. Sin embargo, hay riesgos significativos asociados con la cirugía mayor, tales como la extirpación incompleta del tumor y la recurrencia resultante. Adicionalmente, los efectos secundarios de la cirugía de próstata, tales como la incontinencia urinaria, pueden ser debilitante. Otras opciones de tratamiento incluyen radiación, crioterapia, terapia hormonal y quimioterapia. Ninguna es ideal y, con el tiempo, el cáncer de un paciente puede volverse insensible a la terapia hormonal y resistente a los agentes de quimioterapia convencionales.

Por tanto, se necesitan opciones de tratamiento locales adicionales, como tratamiento único o como complemento del tratamiento de referencia.

35 La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Una formulación líquida que comprende sirólimus 5 mg/ml a 500 mg/ml para su uso en un método de tratamiento del cáncer de próstata en un sujeto mamífero, en donde la formulación líquida se administra localmente en la próstata del sujeto mediante inyección intratumoral, y el sujeto mamífero es un ser humano.

2. La formulación líquida para el uso del punto 1, en donde la administración de sirólimus da como resultado una reducción del volumen del cáncer de próstata en comparación con el volumen antes del tratamiento.

3. La formulación líquida para el uso del punto 1 o 2, en donde el nivel del antígeno prostático sérico (PSA) en la sangre del sujeto es de 4 ng/ml o mayor antes de la administración de sirólimus.

4. La formulación líquida para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde se obtiene una biopsia del cáncer de próstata antes de la administración de sirólimus.

5. La formulación líquida para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en donde las células del cáncer de próstata expresan mTOR o el cáncer de próstata es cáncer de próstata insensible a hormonas.

6. La formulación líquida para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en donde el cáncer de próstata tiene una puntuación de Gleason de 5 a 10.

7. La formulación líquida para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde el cáncer de próstata es un cáncer en estadio local, un cáncer en estadio regional o un cáncer con metástasis.

8. La formulación líquida para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en donde la administración de sirólimus se suma a la radioterapia, la terapia de privación androgénica o la quimioterapia para el cáncer de próstata.

9. La formulación líquida para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde la administración de sirólimus se inicia después de que el cáncer de próstata ha (i) recidivado después de la radioterapia o la terapia de privación androgénica o (ii) regresado después de un régimen de quimioterapia que comprende docetaxel.

10. La formulación líquida para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en donde la formulación líquida se

administra repetidamente semanal o bisemanalmente.

11. La formulación líquida para el uso del punto 10, en donde la formulación líquida se administra repetidamente durante de 2 a 52 semanas al año.

12. La formulación líquida para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 11, en donde la formulación líquida comprende sirólimus 10 mg/ml a 25 mg/ml.

13. La formulación líquida para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 12, en donde la formulación líquida comprende del 0,5 % al 35 % en peso de sirólimus.

14. La formulación líquida para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 13, en donde la formulación líquida comprende un polietilenglicol (PEG).

15. La formulación líquida para el uso del punto 14, en donde la formulación líquida comprende además etanol.

16. La formulación líquida para el uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 15, en donde la formulación líquida comprende sirólimus al 2,0 % (p/p), polietilenglicol 400 al 94 % (p/p) y etanol al 4 % (p/p).

La presente divulgación proporciona métodos de tratamiento del cáncer de próstata en un sujeto mamífero (por ejemplo, un macho humano) que comprende administrar localmente a la próstata del sujeto una formulación líquida que comprende una cantidad eficaz de sirólimus para tratar el cáncer de próstata, en donde la formulación líquida comprende sirólimus a aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. En algunas realizaciones, en donde la formulación líquida comprende sirólimus a aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. En algunas realizaciones, la administración de sirólimus da como resultado una reducción del volumen del cáncer de próstata en comparación con el volumen antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la administración de sirólimus inhibe el crecimiento del cáncer de próstata en comparación con el crecimiento esperado en ausencia del tratamiento. En algunas realizaciones, la administración local comprende la inyección intratumoral de la formulación líquida. En algunas realizaciones, el nivel del antígeno prostático sérico (PSA) en la sangre del sujeto es menor de 4 ng/ml antes de la administración de sirólimus. En otras realizaciones, el nivel del antígeno prostático sérico (PSA) en la sangre del sujeto es de 4 ng/ml o mayor antes de la administración de sirólimus. En un subconjunto de estas realizaciones, el nivel de PSA en la sangre del sujeto es de 4 ng/ml a 10 mg/ml. Como alternativa, el nivel de PSA en la sangre del sujeto es superior a 10 mg/ml. En algunas realizaciones preferidas, la administración de sirólimus da como resultado una reducción en el nivel de PSA en la sangre del sujeto en comparación con el nivel anterior a la administración de sirólimus. En algunas realizaciones, el cáncer de próstata es detectable mediante tacto rectal del sujeto antes de la administración de sirólimus. En algunas realizaciones, el sujeto no es candidato para una prostatectomía radical, mientras que en otras realizaciones el sujeto es candidato para una prostatectomía radical. La presente divulgación proporciona métodos que comprenden además la obtención de una biopsia del cáncer de próstata antes de la administración de sirólimus. En algunas realizaciones, las células del cáncer de próstata expresan mTOR. En algunas realizaciones, las células del cáncer de próstata expresan el receptor de andrógenos. En realizaciones alternativas, las células del cáncer de próstata no expresan el receptor de andrógenos. En algunas realizaciones, el cáncer de próstata tiene una puntuación de Gleason de 5 a 7. En otras realizaciones, el cáncer de próstata tiene una puntuación de Gleason de 8 a 10. En algunas realizaciones, el cáncer de próstata es un cáncer en estadio local o en estadio regional. En otras realizaciones, el cáncer de próstata es un cáncer con metástasis. En algunas realizaciones, la administración de sirólimus se suma a la radioterapia para el cáncer de próstata. En algunas realizaciones, la administración de sirólimus se inicia después de que el cáncer de próstata haya recidivado después de radioterapia. En algunas realizaciones, la administración de sirólimus se suma a la terapia de privación androgénica para el cáncer de próstata. En algunas realizaciones, la administración de sirólimus se inicia después de que el cáncer de próstata haya recidivado después de la terapia de privación androgénica. En algunas realizaciones, el cáncer de próstata es un cáncer de próstata insensible a hormonas. En algunas realizaciones, la administración de sirólimus se suma a la quimioterapia para el cáncer de próstata. En un subconjunto de estas realizaciones, el fármaco quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en docetaxel, cabazitaxel, mitoxantrona, estramustina y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la administración de sirólimus se inicia después de que el cáncer de próstata haya regresado después de un régimen de quimioterapia que comprende docetaxel. En algunas realizaciones, la formulación líquida se administra repetidamente semanal o bisemanalmente. En particular, la formulación líquida se puede administrar repetidamente durante de 2 a 52 semanas al año.

La formulación líquida para tratar el cáncer de próstata en un sujeto mamífero (por ejemplo, un macho humano) mediante administración local en la próstata del sujeto comprende sirólimus a aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, o sirólimus a aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, o sirólimus a aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml. Las formulaciones líquidas de este párrafo son adecuadas para su uso en relación con los métodos del párrafo anterior. En algunas realizaciones, la formulación líquida comprende de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 35 % en peso de sirólimus. En algunas realizaciones, la formulación líquida comprende del 0,5 % al 8,0 % en peso de sirólimus. En algunas realizaciones preferidas, la formulación líquida comprende del 1,0 % al 4,0 % en peso de sirólimus. En algunas realizaciones preferidas, la administración de sirólimus no da como resultado inmunosupresión sistémica. En algunas realizaciones, la formulación

líquida comprende un polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, el PEG es PEG 300 o PEG 400. En algunas realizaciones, la formulación líquida comprende además etanol. En algunas realizaciones preferidas, la formulación líquida comprende aproximadamente el 2,0 % (p/p) de sirólimus, aproximadamente el 94 % (p/p) de polietilenglicol 400, aproximadamente el 4 % (p/p) de etanol. En otras realizaciones, la formulación líquida es una formulación descrita en la Tabla 2-1. En algunas realizaciones, la formulación líquida comprende PLA. En algunas realizaciones, la formulación líquida comprende DMSO o DMA. En algunas realizaciones, la formulación líquida comprende PLA. En algunas realizaciones preferidas, el sujeto mamífero es un ser humano.

Las figuras muestran:

La FIG. 1 ilustra el diseño del estudio descrito en el Ejemplo 1, que se realizó para comparar la eficacia de los artículos de prueba en el tratamiento de xenoinjertos subcutáneos de cáncer de próstata humano en ratones lampiños BALB/c.

La FIG. 2 muestra las pautas posológicas y el esquema de recopilación de datos del estudio descrito en el Ejemplo 1.

La FIG. 3A muestra el efecto de los artículos de prueba sobre el tamaño de xenoinjertos de tumor de PC-3 en ratones lampiños BALB/c. La FIG. 3B muestra el efecto de los artículos de prueba sobre el tamaño de xenoinjertos de tumor de 22Rv1 en ratones lampiños BALB/c.

La FIG. 4A muestra el efecto de los artículos de prueba sobre el crecimiento de xenoinjertos de tumor de PC-3 en ratones lampiños BALB/c. La FIG. 4B muestra el efecto de los artículos de prueba sobre el crecimiento de xenoinjertos de tumor de 22Rv1 en ratones lampiños BALB/c.

La FIG. 5 muestra la regresión de xenoinjertos tumorales de PC-3 en ratones lampiños BALB/c tratados con una formulación de sirólimus al 2 % administrada bisemanalmente mediante suministro intratumoral.

[fig.6] La FIG. 6 muestra los niveles de antígeno prostático específico (PSA) en plasma en ratones lampiños BALB/c portando xenoinjertos de tumor de 22Rv1.

[fig.7] La FIG. 7A muestra el efecto de los artículos de prueba sobre los niveles de mTOR de células de xenoinjerto de tumor de PC-3. La FIG. 7B muestra el efecto de los artículos de prueba sobre los niveles de mTOR de células de xenoinjerto de tumor de 22Rv1.

[fig.8] La FIG. 8A muestra el efecto de los artículos de prueba sobre los niveles de 4E-BP1 fosforilada de células de xenoinjerto de tumor de PC-3. La FIG. 8B muestra el efecto de los artículos de prueba sobre los niveles de 4E-BP1 fosforilada de células de xenoinjerto de tumor de 22Rv1.

[fig.9] La FIG. 9A muestra el efecto de los artículos de prueba sobre los niveles de S6K1 fosforilada de células de xenoinjerto de tumor de PC-3. La FIG. 9B muestra el efecto de los artículos de prueba sobre los niveles de S6K1 fosforilada de células de xenoinjerto de tumor de 22Rv1.

[fig.10] La FIG. 10A muestra el efecto de los artículos de prueba sobre la expresión de Ki67 en células de xenoinjerto de tumor de PC-3. La FIG. 10B muestra el efecto de los artículos de prueba sobre la expresión de Ki67 en células de xenoinjerto de tumor de 22Rv1.

[fig.11] La FIG. 11A muestra el efecto de los artículos de prueba sobre los niveles de caspasa 3 escindida de células de xenoinjerto de tumor de PC-3. La FIG. 11B muestra el efecto de los artículos de prueba sobre los niveles de caspasa 3 escindida de células de xenoinjerto de tumor de 22Rv1.

[fig.12] La FIG. 12A muestra el efecto de los artículos de prueba sobre la expresión de cadherina E en células de xenoinjerto de tumor de PC-3. La FIG. 12B muestra el efecto de los artículos de prueba sobre la expresión de cadherina E en células de xenoinjerto de tumor de 22Rv1.

La diana según el mecanismo de acción de la rapamicina (mTOR) es un miembro de la familia de cinasas relacionadas con la fosfatidilinositol 3-cinasa. mTOR es un componente de dos complejos proteicos distintos, que desempeñan un papel importante en las vías de señalización implicadas en el crecimiento, proliferación y supervivencia celulares. La rapamicina (también conocida como sirólimus) se identificó inicialmente como agente antifúngico antes de que se desarrollara como agente inmunosupresor. RAPAMUNE (marca registrada) (administración oral de sirólimus comercializado por Wyeth Pharmaceuticals Inc., Filadelfia, PA) fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. en 1999 para prevenir el rechazo de órganos en los receptores de trasplantes de riñón.

También se descubrió que la rapamicina tiene actividad antineoplásica contra líneas celulares de cáncer humanas (Dourous y Suffnes, *Cancer Treat Rev*, 8:63-87, 1981). Posteriormente, la rapamicina y sus análogos (rapálogos) se evaluaron como agentes antineoplásicos en diversos ensayos clínicos (Yuan *et al.*, *J Hematol Oncol*, 2:45, 2009; y Dufour *et al.*, *Cancers*, 3:2478-2500, 2011). Se determinó que el perfil farmacocinético de las formulaciones orales de rapamicina no era conveniente para un agente quimioterapéutico. Por tanto, se han evaluado más extensamente varios rapálogos en regímenes de quimioterapia. TORISEL (marca registrada) (kit de temsirólimus para inyección comercializado por Wyeth Pharmaceuticals Inc., Filadelfia, PA) se aprobó para tratar el carcinoma de células renales (CCR) avanzado. AFINITOR (marca registrada) (everólimus para administración oral comercializado por Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ) también se aprobó para tratar el CCR avanzado después del fracaso del tratamiento con sunitinib o sorafenib, y se aprobó para varios otros cánceres solo o en combinación con una clase distinta de agente quimioterapéutico.

Se informó que hasta el 80 % de los cánceres de próstata tenían niveles de expresión de mTOR de medios a altos, según lo determinado por inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-mTOR. Por el contrario, el tejido de cáncer

de próstata normal tenía solo un bajo nivel de expresión de mTOR. Este fenotipo sugiere que mTOR sería una buena diana farmacológica para el cáncer de próstata. En un pequeño estudio piloto de rapamicina administrada por vía oral a hombres con cáncer de próstata insensible a hormonas, solo uno de doce hombres tuvo una respuesta radiográfica (Amato *et al.*, Clin Genitourin Cancer, 6:97-102, 2008). Hasta la fecha, rapamicina, temsirlimus y everolimus no se han aprobado para tratar el cáncer de próstata.

Durante el desarrollo de la presente divulgación, se descubrió que el sirólimus es un agente antineoplásico mucho más potente cuando se administra mediante inyección intratumoral en lugar de administración oral. En el Ejemplo 1 se proporcionan detalles de dos estudios en dos modelos de ratón distintos de cáncer de próstata humano.

Sin quedar ligados a teoría alguna, se cree que la administración local de sirólimus es ventajosa debido a la escasa disponibilidad tisular de sirólimus tras la administración sistémica. De hecho, la biodisponibilidad oral de sirólimus es solo del 14 % según Medscape. Por tanto, se contempla que la administración local de sirólimus sea más eficaz que la administración sistémica de sirólimus debido a una mayor disponibilidad tisular. Adicionalmente, se espera que la administración local de sirólimus minimice los efectos sistémicos nocivos (por ejemplo, inmunosupresión, toxicidad hepática, toxicidad renal, etc.). Específicamente, no se espera que la inyección intratumoral de sirólimus de como resultado una susceptibilidad aumentada a la infección, mientras que una administración oral aumentada de sirólimus para lograr la disponibilidad deseada en el tejido prostático probablemente provocaría inmunosupresión. Los niveles de sirólimus en sangre de 8 a 10 ng/ml son eficaces para lograr la inmunosupresión para la prevención del rechazo del trasplante renal. Por tanto, en realizaciones preferidas, la administración local de sirólimus en la próstata da como resultado niveles de sirólimus en sangre por debajo de 8-10 ng/ml.

Específicamente, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento del cáncer de próstata en un sujeto mamífero (por ejemplo, un macho humano), que comprende administrar localmente a la próstata del sujeto una formulación líquida que comprende una cantidad eficaz de sirólimus para tratar el cáncer de próstata, en donde la formulación líquida comprende sirólimus a aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, o sirólimus a aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. Una formulación líquida ilustrativa, denominada en el presente documento "SRL" es una solución que comprende sirólimus a aproximadamente al 2,0 % (p/p), polietilenglicol (PEG) 400 aproximadamente al 94 % (p/p) y etanol aproximadamente al 4 % (p/p). Sin embargo, la presente divulgación no se limita a la formulación líquida ilustrativa.

El sirólimus está presente en una cantidad de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, o aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml en formulaciones líquidas de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el sirólimus está presente en una cantidad superior a (límite inferior) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 mg/ml. En algunas realizaciones, el sirólimus está presente en una cantidad inferior a (límite superior) 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 45, 40, 35, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 mg/ml. Es decir, el sirólimus está presente en una cantidad en el intervalo entre los límites superior e inferior seleccionados independientemente.

Cuando se expresa como un porcentaje en peso, el sirólimus está presente en una concentración del 1 % al 35 % (p/p) o desde el 0,5 % al 8,0 % (p/p) en formulaciones líquidas de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el sirólimus está presente en una concentración superior a (límite inferior) el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % (p/p). En otras realizaciones, el sirólimus está presente en una concentración superior a (límite inferior) el 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 % (p/p). En algunas realizaciones, el sirólimus está presente en una concentración inferior a (límite superior) el 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 % (p/p). En otras realizaciones, el sirólimus está presente en una concentración inferior a (límite superior) el 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0 o 2,5 % (p/p). Es decir, el sirólimus está presente en una concentración en el intervalo entre los límites superior e inferior seleccionados independientemente.

Diversas formulaciones que comprenden concentraciones de sirólimus en el intervalo de sirólimus a aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml o sirólimus a aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml también son adecuadas para su uso en los métodos descritos en el presente documento. En formulaciones alternativas pueden utilizarse disolventes además o en lugar de uno o ambos PEG 400 y etanol. Adicionalmente, las formulaciones líquidas pueden comprender un excipiente tal como un antioxidante para aumentar la estabilidad. Además, las formulaciones líquidas de la presente divulgación no se limitan a soluciones. En algunas realizaciones, la formulación líquida es una suspensión o un sistema formador de gel *in situ*.

Los disolventes adecuados para el sirólimus incluyen, pero sin limitación, PEG 400, propilenglicol, glicerina, triacetina, diacetina, citrato de acetiltriethyl, lactato de etilo, capril glicérido poliglicolado, etanol, N-metil-2-pirrolidona, gammabutirolactona, dimetil isosorbida, trietilenglicol dimetil éter, etoxi diglicol, glicerol, dimetilformamida, dimetil acetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO), alcohol bencílico y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Simamora *et al.*, Int J Pharmaceutics, 213:25-29, 2001). También puede haber agua, solución salina o solución salina tamponada con fosfato. En aspectos adicionales, la formulación líquida puede contener uno o ambos de un copolímero basado en polimetacrilato (véase, por ejemplo, Thakral *et al.*, Expert Opin Drug Deliv, 10:131-149, 2013) y polivinilpirrolidona. Para la administración local de sirólimus también pueden incluirse polímeros biodegradables en vehículos. En algunos aspectos, el polímero biodegradable es un compuesto de poliéster. Los polímeros

biodegradables adecuados incluyen, pero son limitación, poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, la formulación líquida comprende uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en DMSO, DMA, DOPC, PLA, trehalosa, goma gellan y agua.

5 Definiciones

Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de andrógenos" se refiere a un receptor que se activa mediante la unión de testosterona o dihidrotestosterona (hormonas androgénicas). El receptor de andrógenos también se conoce como la "subfamilia de receptores nucleares 3, grupo C, miembro 4" y "NR3C4". La secuencia de aminoácidos del receptor de andrógenos humano se expone como el número de referencia de GenBank NP_000035 (isoforma 1), y la secuencia de ácido nucleico del receptor de andrógenos humano se expone como el número de referencia de GenBank NM_000044 (variante 1).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "diana según el mecanismo de acción de la rapamicina" y "mTOR" se refieren a una proteína cinasa que es la subunidad catalítica de mTORC1 y mTORC2, que están implicadas en diversos procesos celulares. mTOR también se conoce como "diana de la rapamicina en mamíferos", "Proteína de unión a FK506 12-proteína asociada a rapamicina 1", y "FRAP1". La secuencia de aminoácidos de mTOR humana se expone como el número de referencia de GenBank NP_004949, y la secuencia de ácido nucleico de mTOR humana se expone como el número de referencia de GenBank NM_004958.

La administración "en combinación con" o "además de" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (coincidente) y consecutiva en cualquier orden.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, el alivio o la mejora de uno o más síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) de la patología, la prevención de la propagación de la enfermedad, el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o el alivio de la patología, y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Como tal, los términos "tratar" o "tratamiento" como se usa en el presente documento, no requieren el alivio completo de los signos o síntomas, no requieren una cura, e incluyen específicamente protocolos que tienen un efecto modesto sobre el individuo.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "o", y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique otra cosa. Por ejemplo, "un excipiente" incluye uno o más excipientes.

Se entiende que los aspectos y realizaciones descritos en el presente documento como "que comprenden" incluyen aspectos y realizaciones "que consisten" y/o "que consisten esencialmente en".

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento en referencia a un valor, describe del 90 % al 110 % de ese valor. Por ejemplo, aproximadamente el 2 % (p/p) de sirólimus describe el 1,8 % al 2,2 % (p/p) de sirólimus, e incluye el 2,0 % (p/p) de sirólimus.

Ejemplos

Abreviaturas: BIW (dos veces por semana); CPIH (cáncer de próstata insensible a hormonas); IT o i.t. (intratumoral); PEG (polietilenglicol); PO o p.o.(oral); PSA (antígeno específico de próstata); QD (una vez al día); QW (una vez por semana); RAPAMUNE (marca registrada) (solución oral de sirólimus comercializada por Wyeth Pharmaceuticals Inc., Filadelfia, PA); y SRL (solución inyectable de sirólimus proporcionada por Santen Inc., Emeryville, CA).

EJEMPLO 1: Tratamiento de xenoinjertos subcutáneos de cáncer de próstata humano Este ejemplo describe dos estudios realizados en ratones lampiños BALB/c para probar el efecto del sirólimus administrado sistémicamente (vía oral) y localmente (inyección intratumoral). Los ratones eran machos de 6 a 8 semanas de edad con pesos corporales en el intervalo de 18 a 22 gramos al inicio del estudio. Para la formación de los xenoinjertos se seleccionaron dos líneas celulares de carcinoma de próstata humano fenotípicamente distintas. PC-3 y 22Rv1 se pueden obtener de ATCC (marca registrada) (American Type Culture Collection, Manassas, VA). El diseño del estudio se ilustra en la FIG. 1.

[Tabla 1]

Tabla 1-1. Líneas celulares de carcinoma de próstata

Línea Celular	Receptor de andrógenos	PSA	ATCC (marca registrada)
PC-3	negativa	negativa	CRL-1435
22Rv1	positiva	positiva	CRL-2505

Las células tumorales PC-3 y 22Rv1 se mantuvieron en un cultivo en monocapa en condiciones convencionales de cultivo celular. Las células que crecían en una fase exponencial se recogieron para la inoculación del tumor. A cada ratón se le inocularon células tumorales (1×10^7) en 0,1 ml de PBS mezclado con matrigel (1:1) en las regiones del flanco izquierdo y derecho para el desarrollo tumoral. Los tratamientos se iniciaron cuando el tamaño tumoral medio del flanco izquierdo o derecho alcanzó aproximadamente 100-150 mm³.

Antes de la agrupación y el tratamiento, se pesaron todos los animales y se midieron los volúmenes de los tumores cada dos días utilizando un compás calibrador. Dado que el volumen del tumor puede afectar la eficacia de cualquier tratamiento dado, el volumen del tumor se usó como parámetro numérico para distribuir al azar animales seleccionados en grupos específicos. El agrupamiento se realizó utilizando el programa informático StudyDirector™ (Studylog Systems, Inc. CA, EE. UU.).

El diseño de bloques distribuidos al azar se utilizó para asignar animales experimentales a uno de los cuatro grupos de prueba. En primer lugar, se seleccionaron ratones que portaban tumores izquierdo y derecho dentro del intervalo inicial y se colocaron en bloques homogéneos de acuerdo con el volumen de su tumor derecho. En segundo lugar, dentro de cada bloque, los ratones se colocaron en grupos de prueba al azar. Mediante el uso de un diseño de bloques al azar para asignar ratones a los grupos de prueba, se minimizó el error sistemático. El tratamiento se inició inmediatamente después de la agrupación en el día 0.

Las formulaciones (artículos de prueba) probadas incluyen RAPAMUNE (marca registrada) (solución de sirólimus para administración oral comercializada por Wyeth Pharmaceuticals Inc., Filadelfia, PA), SRL (solución inyectable de sirólimus) y vehículo (sin principios activos). RAPAMUNE (marca registrada) contiene sirólimus 1 mg/ml, así como los principios inactivos fosfatidilcolina, propilenglicol, mono- y diglicéridos, etanol, ácidos grasos de soja, palmitato de ascorbilo, polisorbato 90 y etanol. SRL contiene sirólimus 22 mg/ml, polietilenglicol y etanol (sirólimus al 2 %, etanol al 4 % y PEG 400 al 94 %). El vehículo contiene el disolvente de SRL (etanol y PEG 400 sin sirólimus).

RAPAMUNE (marca registrada) se mantuvo a 4 °C antes de su uso. Para preparar una dosis de carga, se diluyeron 180 µl de RAPAMUNE (marca registrada) mediante la adición de 2,82 ml de agua esterilizada y, para preparar una dosis diaria, se diluyeron 60 µl de RAPAMUNE (marca registrada) mediante la adición de 2,94 ml de agua esterilizada. SRL y el vehículo se almacenaron congelados a -20 °C antes de su uso. Después de la descongelación, SRL y el vehículo se usaron puros (no diluidos).

Como se muestra en la FIG. 2, había cuatro grupos de prueba. Cada grupo de prueba contenía cinco ratones de la siguiente manera: 1) Vehículo - 5 µl/tumor administrados mediante inyección intratumoral el día 0 y 5 µl/tumor QW a partir de entonces; 2) RAPAMUNE (marca registrada) - 30 µl/ratón administrados por vía oral el día 0 (dosis de carga) y 10 µl/ratón QD a partir de entonces (dosis diaria o de prueba); 3) SRL semanalmente - 5 µl/tumor administrados mediante inyección intratumoral el día 0 y 5 µl/tumor QW a partir de entonces; y 4) SRL bisemanalmente - 5 µl/tumor administrados mediante inyección intratumoral el día 0 y 5 µl/tumor BIW a partir de entonces. El régimen de dosificación de RAPAMUNE (marca registrada) dio como resultado la administración de 1,8 µg de rapamicina por vía oral como dosis de carga y la administración de 0,2 µg de rapamicina por vía oral a partir de entonces como dosis diaria a cada ratón. El régimen de dosificación de SRL dio como resultado la administración de una dosis de 110 µg de rapamicina por tumor a cada uno de los tumores derecho e izquierdo como dosis de carga y como dosis semanal o bisemanal a cada ratón.

Una vez inoculadas las células tumorales, se comprobó diariamente la morbilidad y la mortalidad de los ratones. Los pesos corporales y los volúmenes de los tumores se midieron dos veces por semana. Los niveles de PSA en sangre se midieron los días 0, 12 y 22.

Los volúmenes tumorales se midieron en dos dimensiones usando un compás calibrador y el volumen se expresó en milímetros cúbicos (mm³) usando la fórmula:

$$V = 0,5 a \times b^2$$

donde a y b eran los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente. El peso del tumor se midió al finalizar el estudio. El estudio finalizó cuando la carga tumoral media (izquierda + derecha) en cada grupo alcanzó un valor de 2000 mm³ o una semana después de la última dosis (día 27). Como se muestra en la FIG. 3A-B, la administración intratumoral de SRL semanal o bisemanalmente retrasó el crecimiento del xenoinjerto de PC-3 y 22Rv1 en una medida mucho mayor que la observada con la administración oral diaria de RAPAMUNE (marca registrada). Es importante destacar que, la administración intratumoral de SRL bisemanalmente incluso dio como resultado una reducción del volumen de los xenoinjertos de PC-3 (Figura 5).

La inhibición del crecimiento tumoral [ICT], que es una indicación de la eficacia de un régimen de tratamiento, se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$ICT (\%) = 100 \times (1 - T_{RTV} / C_{RTV})$$

donde T_{RTV} y C_{RTV} son el volumen tumoral relativo medio de los grupos tratados y de control, respectivamente, en un día dado.

- 5 El RTV (del inglés *relative tumor volume*, volumen tumoral relativo) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$RTV = V_t / V_0$$

- 10 donde V_t = volumen tumoral del grupo tratado con el fármaco en un día dado del estudio, y V_0 = volumen tumoral del grupo tratado con el fármaco el día inicial de la dosificación (día 0). Como se muestra en la FIG. 4A-B, la administración intratumoral de SRL en forma semanal o bisemanal dio como resultado una mayor inhibición del crecimiento del xenoinjerto de PC-3 y 22Rv1 que la observada con la administración oral de RAPAMUNE (marca registrada) en forma diaria.

- 15 La administración de sirólimus a ratones portadores de xenoinjertos de 22Rv1 dio como resultado en una reducción de los niveles de PSA. La reducción de los niveles de PSA se produjo más rápidamente en los ratones que recibieron SRL semanal o bisemanalmente mediante administración intratumoral en comparación con los ratones que recibieron RAPAMUNE (marca registrada) diariamente (FIG. 6).

- 20 En conclusión, SRL administrado localmente redujo el volumen tumoral en cánceres de próstata humanos xenoinjertados de PC3 y 22RV1 en ratones lampiños. La reducción del volumen tumoral fue significativamente mayor que la lograda con RAPAMUNE administrado por vía oral (marca registrada) en los mismos modelos. Además, SRL administrado localmente redujo significativamente los niveles de PSA en sangre en ratones xenoinjertados con 22RV1 y provocó la regresión de los tumores de PC3.

- 25 Posteriormente se evaluó el fenotipo de los tumores residuales mediante inmunohistoquímica. Específicamente, se recogieron tumores de ratones de tres grupos (vehículo suministrado IT QW, RAPAMUNE (marca registrada) suministrado PO QD y SRL al 2 % suministrado IT BIW) tras el sacrificio al final del estudio y se congelaron en nitrógeno líquido. Los tumores congelados se cortaron y tiñeron con anticuerpos unidos a cromóforos o enzimas para permitir la visualización de la unión de los anticuerpos mediante protocolos de tinción convencionales. Se evaluó la tinción (marrón) en células que contenían núcleos (azul) para descartar la señal de fondo no específica. El análisis estadístico de las diferencias entre diversos grupos se realizó utilizando la prueba de la t para datos independientes. Se calcularon los valores de p para todos los grupos frente al grupo de vehículo, y las diferencias con un valor de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

- 35 Como se esperaba, los niveles de la proteína mTOR dentro de las células tumorales permanecieron sin cambios con el tratamiento con RAPAMUNE (marca registrada) y SRL al 2 %, debido a que la rapamicina inhibe la actividad de cinasa de mTOR pero no provoca su degradación (FIG. 7A-B). Por el contrario, los niveles de las dianas aguas abajo fosforiladas de mTOR se redujeron en los tumores de los grupos tratados con rapamicina. En particular, los niveles de la proteína de unión al factor 4E de iniciación de la traducción eucariótico fosforilada 1 (p-4E-BP1) fueron considerablemente más bajos en los tumores de los ratones tratados con SRL al 2 % que en los tumores de los ratones tratados con RAPAMUNE (marca registrada) y de los tratados con vehículo (FIG. 8A-B). Los niveles de la proteína ribosómica fosforilada S6 cinasa beta-1 (p-S6K1) también fueron más bajos en los tumores de los ratones tratados con SRL al 2 % que en los tumores de los ratones tratados con RAPAMUNE (marca registrada) y de los tratados con vehículo (FIG. 9A-B). De manera interesante, el efecto del tratamiento con SRL al 2 % fue más pronunciado en los ratones que portaban tumores negativos para el receptor de andrógenos (PC-3) que en los ratones que portaban tumores positivos para el receptor de andrógenos (22RV1).

- Además, se evaluó el efecto de la rapamicina sobre los marcadores moleculares de la función de las células tumorales. Se midieron los niveles de Ki-67 para evaluar la proliferación de células tumorales. Ki-67 es una proteína nuclear que se expresa de forma universal entre las células en proliferación (G_1 , S, G_2 y mitosis) pero está ausente en las células en reposo (G_0). Los niveles de Ki-67 fueron más bajos en tumores de ratones tratados con SRL al 2 % que en tumores de ratones tratados con RAPAMUNE (marca registrada) y de los tratados con vehículo (FIG. 10A-B). Es interesante señalar que el efecto del tratamiento con SRL al 2 % sobre la expresión de Ki-67 fue más pronunciado en los tumores negativos para receptores de andrógenos (PC-3) que en los tumores positivos para los receptores de andrógenos (22RV1).

- Se midieron los niveles de caspasa 3 escindida (CASP3) para evaluar la apoptosis de las células tumorales. CASP3 es un miembro de la familia de proteasas de cisteína-ácido aspártico. CASP3 es un zimógeno que se activa en las células apoptóticas tras la escisión mediante una caspasa iniciadora. Los niveles de CASP3 escindida fueron más altos en tumores de ratones tratados con SRL al 2 % que en tumores de ratones tratados con RAPAMUNE (marca registrada) y de los tratados con vehículo (FIG. 11A-B).

- Se midieron los niveles de la cadherina epitelial (cadherina E) para evaluar la metástasis de células tumorales. La cadherina E es una glucoproteína de adhesión célula-célula dependiente de calcio. La regulación a la baja de la cadherina E disminuye la adhesión celular en los tejidos, lo que se asocia con un aumento de la movilidad celular y la

metástasis. Los niveles de la cadherina E fueron más altos en tumores de ratones tratados con SRL al 2 % que en tumores de ratones tratados con RAPAMUNE (marca registrada) y de los tratados con vehículo (FIG. 12A-B). El efecto del tratamiento con SRL al 2 % sobre la expresión de cadherina E fue sorprendente en PC-3, que es una línea celular insensible a hormonas de la etapa tardía de grado IV con alto potencial metastásico. Esto indica que el tratamiento con SRL al 2 % pudo restablecer la citoarquitectura dañada al aumentar la expresión de cadherina E. No se observó tal efecto en la línea celular 22Rv1, que tiene un potencial metastásico mucho menor y, por tanto, una citoarquitectura más intacta.

En conclusión, se observó un nivel reducido de la señalización de mTOR aguas abajo en células de tumores como consecuencia de la administración local de SRL. La reducción de la señalización de mTOR aguas abajo se asoció con niveles de marcadores moleculares indicativos de una proliferación celular disminuida, una apoptosis aumentada y una metástasis disminuida. La reducción beneficiosa en la señalización de mTOR aguas abajo y en la función de las células tumorales fue significativamente mayor que la lograda con RAPAMUNE administrado por vía oral (marca registrada) en los mismos modelos.

Ejemplo 2: Formulaciones de sirólimus

Este ejemplo describe formulaciones adicionales de sirólimus para administración local en tumores sólidos (inyección intratumoral). El ácido poliláctico (PLA) en las formulaciones de la Tabla 2-1 es poli(D,L-lactida) comercializado como RESOMER (marca registrada) R 202 H por Evonik Industries AG (Darmstadt, Alemania).

[Tabla 2]

Tabla 2-1. Formulaciones ilustrativas de sirólimus[^]

N.º	SRL	DMSO	DMA	DOPC	Vitamina E	PLA	Trehalosa	Goma gellan	API
1	8,0	18	-	36,8	36,8	-	-	-	-
2	3,0	-	20	36,8	36,8	-	-	-	-
3	20,0	-	-	-	-	-	8	0,6	c.s.
4	32,7	-	-	-	-	c.s.	-	-	-
5	5,0	50	-	-	-	45	-	-	-
6	10,0	50	-	-	-	40	-	-	-
7	5,0	-	50	-	-	45	-	-	-
8	10,0	-	50	-	-	40	-	-	-

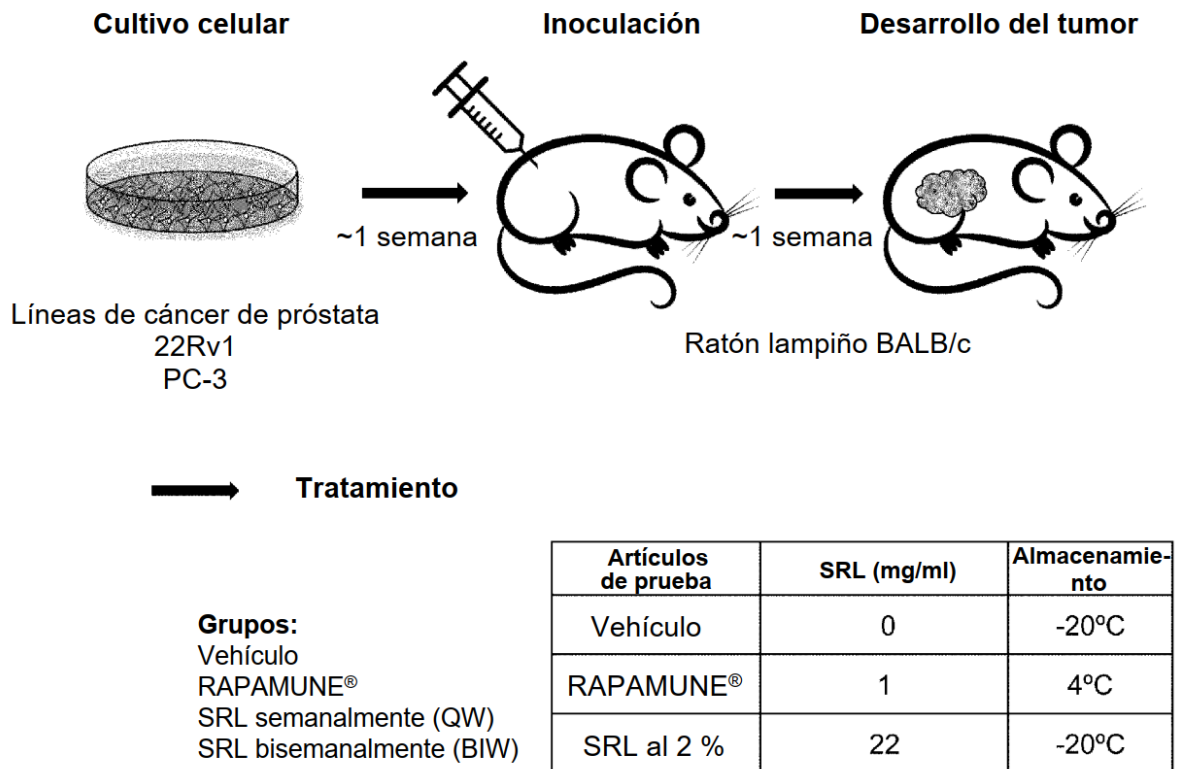
[^] Todos los ingredientes se muestran como porcentaje en peso (% p/p). Abreviaturas: n.º (n.º de formulación); SRL (sirólimus); DMSO (dimetilsulfóxido); DMA (dimetilacetamida); DOPC (dioleoil fosfatidilcolina); PLA (ácido poliláctico); API (agua para inyección); y q.s. (cantidad suficiente).

REIVINDICACIONES

1. Una formulación líquida que comprende sirólimus 5 mg/ml a 500 mg/ml para su uso en un método de tratamiento del cáncer de próstata en un sujeto mamífero, en donde la formulación líquida se administra localmente en la próstata del sujeto mediante inyección intratumoral, y el sujeto mamífero es un ser humano.
2. La formulación líquida para el uso de la reivindicación 1, en donde la administración de sirólimus da como resultado una reducción del volumen del cáncer de próstata en comparación con el volumen antes del tratamiento.
3. La formulación líquida para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el nivel del antígeno prostático sérico (PSA) en la sangre del sujeto es de 4 ng/ml o mayor antes de la administración de sirólimus.
4. La formulación líquida para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se obtiene una biopsia del cáncer de próstata antes de la administración de sirólimus.
5. La formulación líquida para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células del cáncer de próstata expresan mTOR o el cáncer de próstata es cáncer de próstata insensible a hormonas.
6. La formulación líquida para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el cáncer de próstata tiene una puntuación de Gleason de 5 a 10.
7. La formulación líquida para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el cáncer de próstata es un cáncer en estadio local, un cáncer en estadio regional o un cáncer con metástasis.
8. La formulación líquida para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la administración de sirólimus se suma a la radioterapia, la terapia de privación androgénica o la quimioterapia para el cáncer de próstata.
9. La formulación líquida para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la administración de sirólimus se inicia después de que el cáncer de próstata ha (i) recidivado después de la radioterapia o la terapia de privación androgénica o (ii) regresado después de un régimen de quimioterapia que comprende docetaxel.
10. La formulación líquida para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la formulación líquida se administra repetidamente semanal o bisemanalmente.
11. La formulación líquida para el uso de la reivindicación 10, en donde la formulación líquida se administra repetidamente durante de 2 a 52 semanas al año.
12. La formulación líquida para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la formulación líquida comprende sirólimus 10 mg/ml a 25 mg/ml.
13. La formulación líquida para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la formulación líquida comprende del 0,5 % al 35 % en peso de sirólimus.
14. La formulación líquida para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la formulación líquida comprende un polietilenglicol (PEG).
15. La formulación líquida para el uso de la reivindicación 14, en donde la formulación líquida comprende además etanol.
16. La formulación líquida para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la formulación líquida comprende sirólimus al 2,0 % (p/p), polietilenglicol 400 al 94 % (p/p) y etanol al 4 % (p/p).

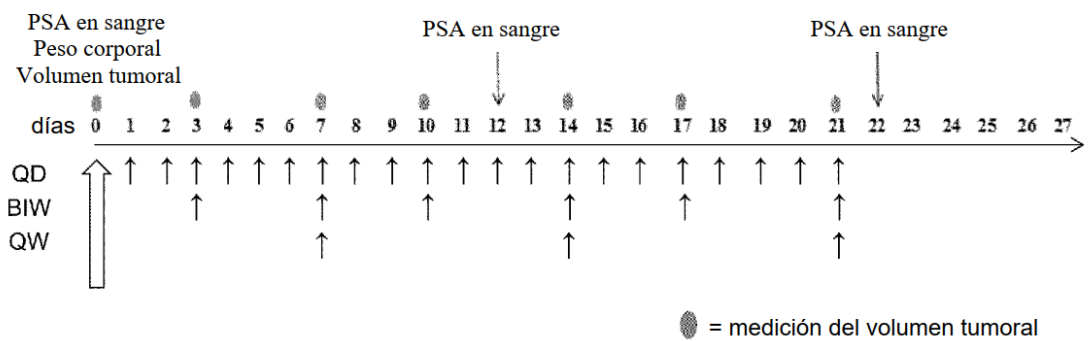
[Fig. 1]

FIG. 1



[Fig. 2]

FIG. 2



Grupo	Tratamiento	Volumen de dosificación	Vía	Frecuencia	Dosis totales
1	Vehículo	5 µl / tumor – dosis de carga 5 µl / tumor – dosis regular	<i>I.T.</i>	QW	4
2	RAPAMUNE®	30 µl / ratón – dosis de carga 10 µl / ratón – dosis regular	<i>P.O.</i>	QD	22
3	SRL al 2 %	5 µl / tumor – dosis de carga 5 µl / tumor – dosis regular	<i>I.T.</i>	QW	4
4	SRL al 2 %	5 µl / tumor – dosis de carga 5 µl / tumor – dosis regular	<i>I.T.</i>	BIW	7

[Fig. 3]

FIG. 3A

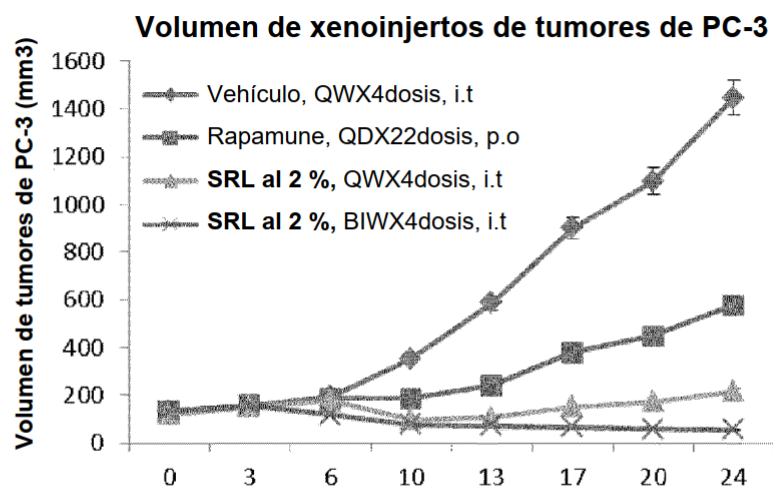
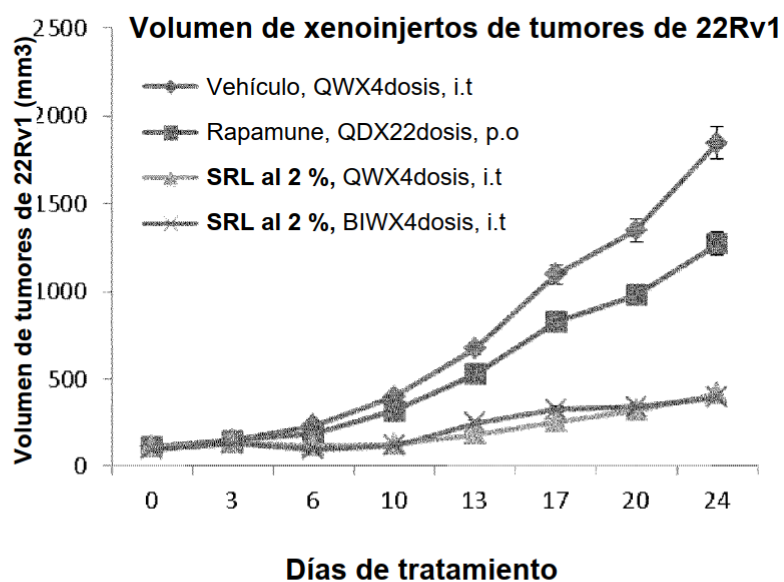


FIG. 3B



[Fig. 4]

FIG. 4A

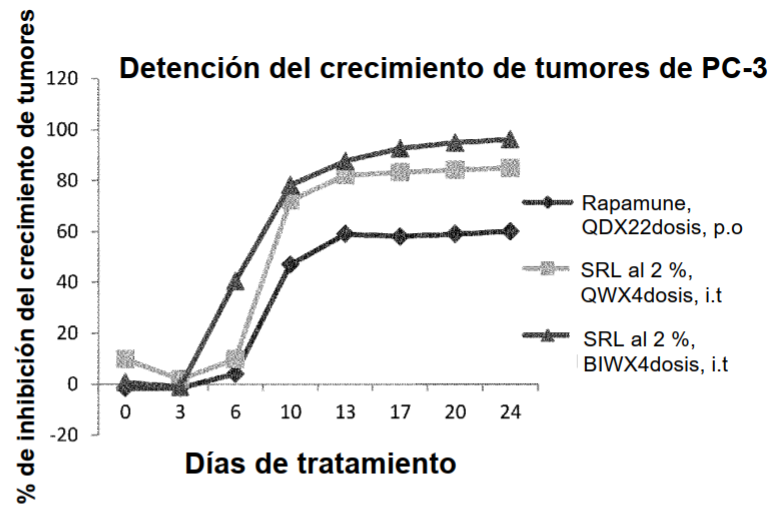
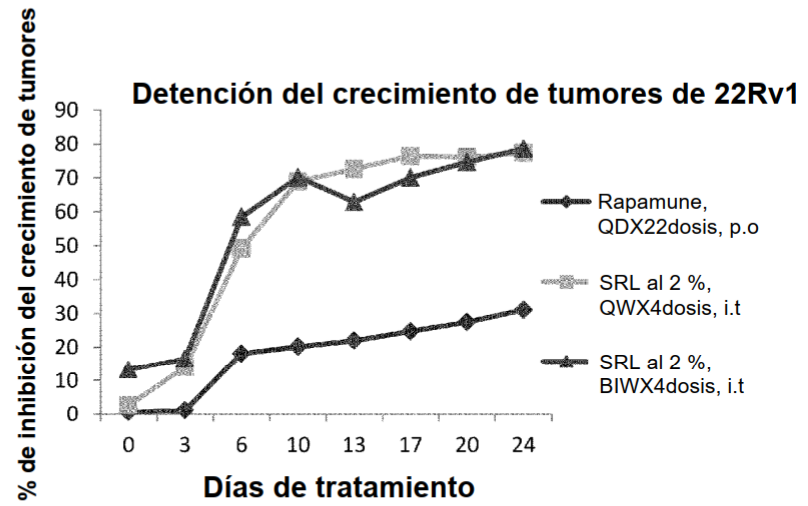
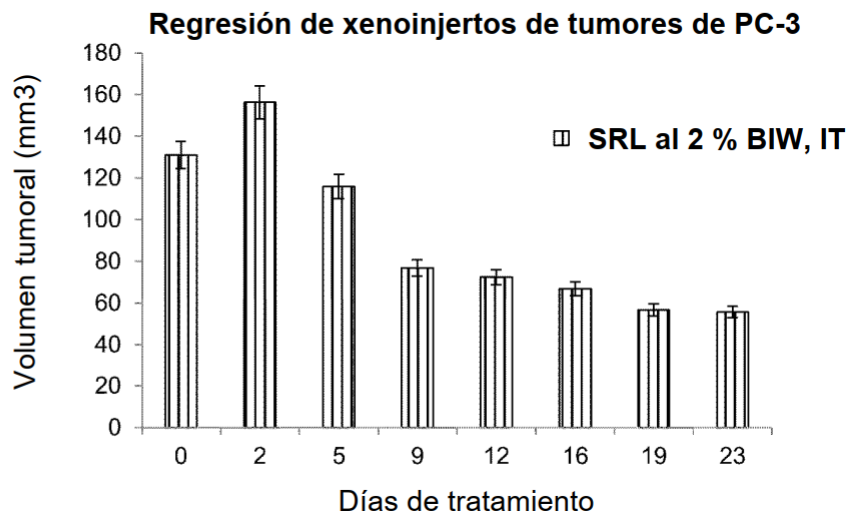


FIG. 4B



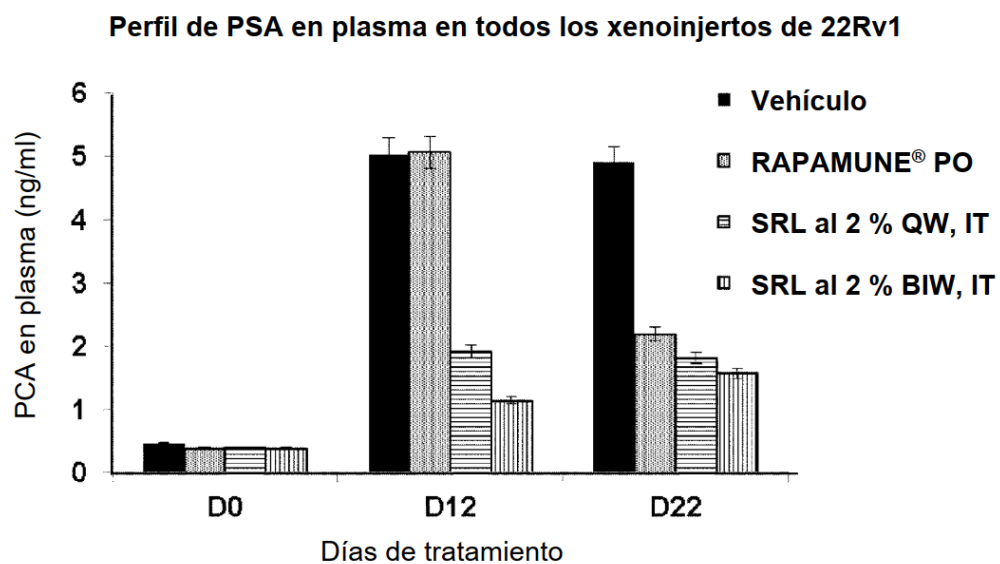
[Fig. 5]

FIG. 5



[Fig. 6]

FIG. 6



[Fig. 7]

FIG. 7A

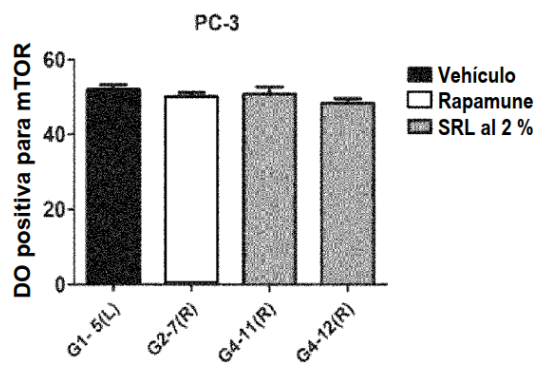
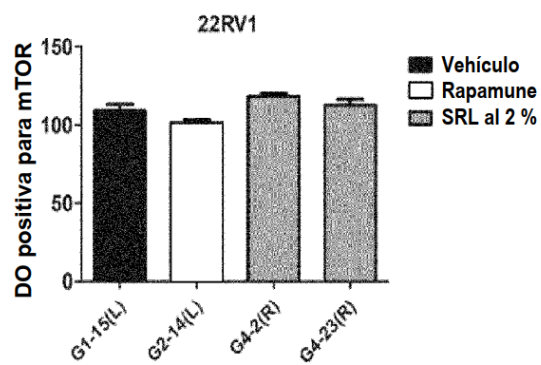


FIG. 7B



[Fig. 8]

FIG. 8A

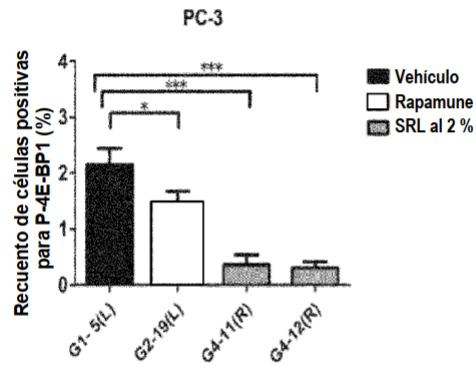
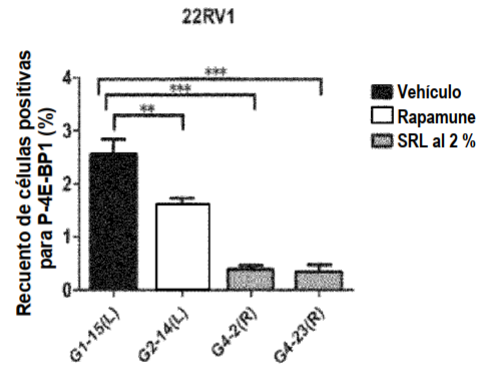


FIG. 8B



[Fig. 9]

FIG. 9A

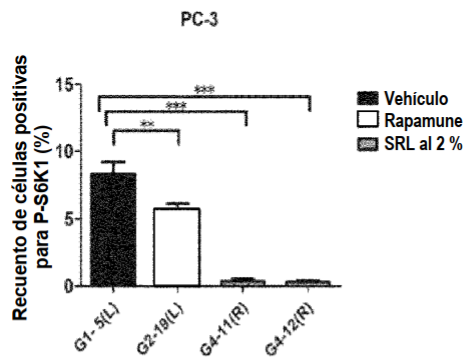
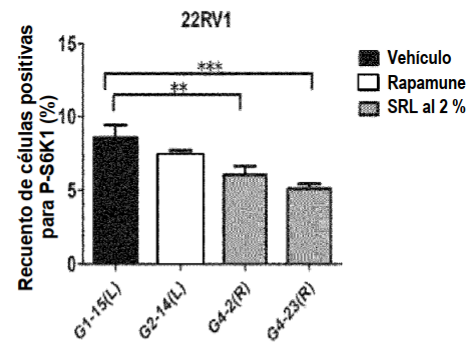


FIG. 9B



[Fig. 10]

FIG. 10A

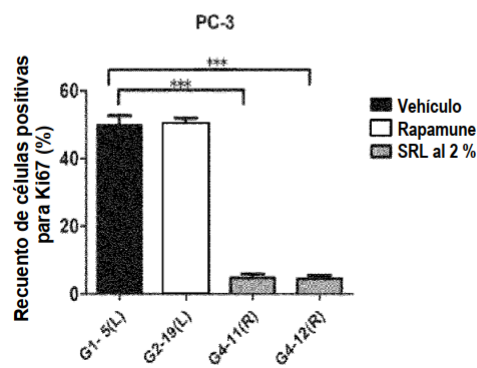
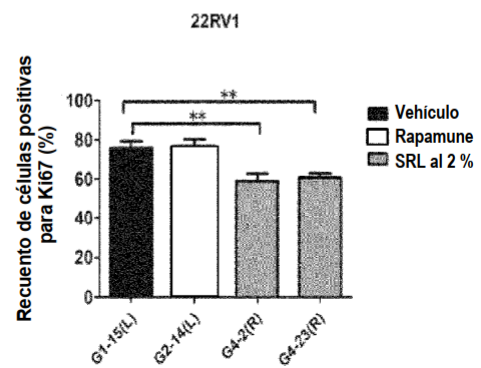
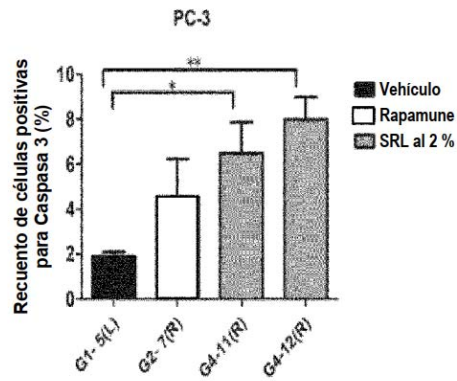


FIG. 10B



[Fig. 11]

FIG. 11A



[Fig. 12]

FIG. 12A

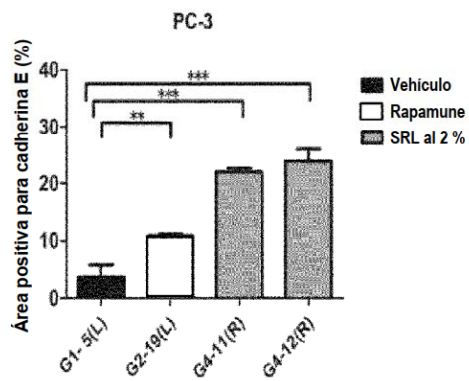


FIG. 11B

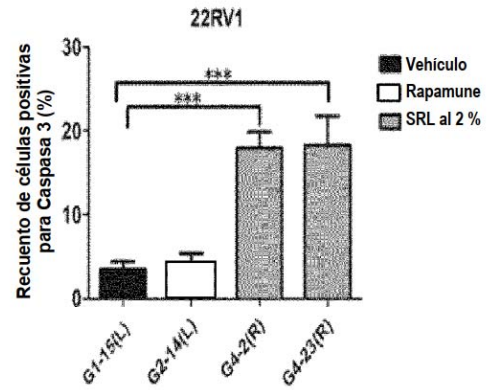


FIG. 12B

