

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 147**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2019** **PCT/JP2019/024499**
87 Fecha y número de publicación internacional: **26.12.2019** **WO19244978**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2019** **E 19821941 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3811949**

54 Título: **Medicamento combinado que comprende una composición liposómica de gemcitabina encapsulada y bloqueo de punto de control inmunitario**

30 Prioridad:

20.06.2018 JP 2018116706
09.11.2018 JP 2018211290
15.05.2019 JP 2019092245

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2024

73 Titular/es:

FUJIFILM CORPORATION (100.0%)
26-30, Nishiazabu 2-chome, Minato-ku
Tokyo 106-8620, JP

72 Inventor/es:

KOMORI TAKASHI;
IOROI TADAAKI;
MATSUMOTO TAKESHI y
IZUMI YASUYUKI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 984 147 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

Medicamento combinado que comprende una composición liposómica de gemcitabina encapsulada y bloqueo de punto de control inmunitario

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una formulación farmacéutica en la que se combinan y administran simultánea o secuencialmente un inhibidor de punto de control inmunitario y una composición liposómica que contiene gemcitabina.

Descripción de la técnica relacionada

En los últimos años, se ha sabido que el cáncer utiliza un sistema que evade la vigilancia inmunitaria. La inmunoterapia contra el cáncer es una terapia que actúa sobre la vigilancia inmunitaria de los pacientes con cáncer para fortalecer la inmunidad contra el cáncer, suprimiendo de este modo la progresión del cáncer o tratando el cáncer. Las moléculas de punto de control inmunitario tales como CTLA-4 y PD-1 o un ligando del mismo, PD-L1, se conocen como moléculas utilizadas en dicho sistema de evasión (Documentos de patente 1 y 2).

Además, se desvela que la coadministración de anti-PD-1 humano o un resto de unión a antígeno del mismo con un agente quimioterápico está dotada de dos agentes antineoplásicos que actúan mediante mecanismos diferentes, que tienen efectos citotóxicos sobre células tumorales humanas (Documentos de patente 1 y 2). Sin embargo, los Documentos de patente 1 y 2 no divulgan un agente antineoplásico que use un liposoma en la coadministración de anti-PD-1 humano o un resto de unión a antígeno del mismo y un agente quimioterápico.

Además, en el sitio de preguntas y respuestas de Opdivo, en respuesta a la pregunta de si Opdivo puede usarse en combinación con agentes quimioterápicos, se ha divulgado que Opdivo no puede usarse en combinación porque no se ha establecido su eficacia y seguridad en combinación con agentes quimioterápicos contra el cáncer (Documento no de patente 1).

Por otra parte, en quimioterapia, al ataque a las células cancerosas se ve muy afectado por el tiempo de exposición del fármaco. Por ejemplo, un fármaco tal como un antimetabolito que inhibe la síntesis de ADN ataca sólo una parte de las células en la fase de síntesis de ADN y, por lo tanto, no puede obtenerse una destrucción celular eficaz en un caso en el que el tiempo de exposición sea corto. En un fármaco de este tipo, en un caso en el que el metabolismo *in vivo* del mismo después de la administración es rápido, no puede obtenerse un tiempo de exposición suficiente en el tumor y, por lo tanto, con frecuencia no se obtiene la eficacia esperada del fármaco (Documentos de patente 3 y 4).

Se sabe que, mediante una configuración de manera que un fármaco se encapsula en un estado disuelto en una fase acuosa interna de un liposoma y una composición liposómica se vuelve hipertónica, puede promoverse la liberación del fármaco de la composición liposómica y, por lo tanto, puede realizarse un suministro del fármaco más adecuado (Documentos de patente 3 y 4).

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: WO2006/121168A
Documento de patente 2: JP2006-340714A
Documento de patente 3: WO2015/166985A
Documento de patente 4: WO2015/166986A

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: ONO ONCOLOGY *Opdivo Q&A, Can Opdivo be used in combination with chemotherapeutic agents?*, [en línea], fecha de publicación desconocida, Ono Pharmaceutical Co., Ltd., [Búsqueda el 2 de mayo de 2018], <URL de Internet: https://www.ono-oncology.jp/contents/patient/opdivo_faq/11.html>

Sumario de la invención

Un objeto de acuerdo con un aspecto de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica combinada obtenida combinando un inhibidor de punto de control inmunitario y una composición liposómica que contiene agente antineoplásico, y un método para administrar la misma. Otro objeto de acuerdo con el aspecto de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica combinada obtenida combinando un inhibidor de punto de control inmunitario y una composición liposómica que contiene agente antineoplásico, y un método terapéutico que use la misma.

Como resultado de estudios intensivos, los presentes inventores han descubierto que los objetos anteriores pueden

conseguirse mediante una formulación farmacéutica que incluye (A) una composición liposómica en combinación con (B) un inhibidor de punto de control inmunitario, en la que la composición liposómica incluye liposomas que tienen cada uno una fase acuosa interna y una solución acuosa que constituye una fase acuosa externa y que tiene los liposomas dispersos en la misma, la gemcitabina se encapsula en un estado disuelto en los liposomas y el inhibidor de punto de control inmunitario incluye al menos uno seleccionado de un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de PD-L2 o un inhibidor de CTLA-4.

La presente invención incluye los siguientes puntos [1] a [7].

[1] Una formulación farmacéutica que comprende:

(A) una composición liposómica en combinación con (B) un inhibidor de punto de control inmunitario, en la que la composición liposómica incluye liposomas que tienen cada uno una fase acuosa interna y una solución acuosa que constituye una fase acuosa externa y que tiene los liposomas dispersos en la misma, la gemcitabina se encapsula en un estado disuelto en los liposomas y el inhibidor de punto de control inmunitario incluye al menos uno seleccionado de un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de PD-L2 o un inhibidor de CTLA-4.

[2] La formulación farmacéutica de acuerdo con [1], en la que la composición liposómica es una composición liposómica en la que la presión osmótica de la fase acuosa interna del liposoma es 2 veces o más y 8 veces o menos la presión osmótica de la fase acuosa externa.

[3] La formulación farmacéutica de acuerdo con [1], en la que la composición liposómica es una composición liposómica en la que un contenido de colesterol es del 10 % en moles o más y del 35 % en moles o menos con respecto a una cantidad total de componentes lipídicos de la composición liposómica, y una presión osmótica de la fase acuosa interna es 2 veces o más y 8 veces o menos la presión osmótica de la fase acuosa externa.

[4] La formulación farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en la que el inhibidor de punto de control inmunitario incluye al menos uno seleccionado de un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1 o un inhibidor de CTLA-4.

[5] La formulación farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en la que el inhibidor de punto de control inmunitario incluye al menos uno seleccionado de un inhibidor de PD-1.

[6] La formulación farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5] para su uso en terapia, en donde la composición liposómica y el inhibidor de punto de control inmunitario se administran simultánea o secuencialmente.

[7] La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con [6], en la que un sujeto de administración tiene resistencia a la gemcitabina.

Se describen con más detalle en el presente documento, pero no están abarcados en el alcance de la presente invención, los siguientes puntos [8] a [13].

[8] Un método para tratar a un sujeto que padece cáncer, comprendiendo el método:

administrar simultánea o secuencialmente (A) una composición liposómica y (B) un inhibidor de punto de control inmunitario en combinación al sujeto en una dosis eficaz y durante un período de dosificación eficaz que presentan un efecto terapéutico sinérgico,

en el que la composición liposómica incluye liposomas que tienen cada uno una fase acuosa interna y una solución acuosa que constituye una fase acuosa externa y que tiene los liposomas dispersos en la misma, y la gemcitabina se encapsula en un estado disuelto en los liposomas.

[9] El método de tratamiento de acuerdo con [8], en el que la composición liposómica es una composición liposómica en la que la presión osmótica de la fase acuosa interna del liposoma es 2 veces o más y 8 veces o menos la presión osmótica de la fase acuosa externa, y una velocidad de liberación de gemcitabina del liposoma es del 10 % en masa/24 h o más y del 70 % en masa/24 h o menos a 37 °C en plasma humano.

[10] El método de tratamiento de acuerdo con [8], en la que la composición liposómica es una composición liposómica en la que un contenido de colesterol es del 10 % en moles o más y del 35 % en moles o menos con respecto a una cantidad total de componentes lipídicos de la composición liposómica, y una presión osmótica de la fase acuosa interna es 2 veces o más y 8 veces o menos la presión osmótica de la fase acuosa externa.

[11] El método de tratamiento de acuerdo con uno cualquiera de [8] a [10], en la que el inhibidor de punto de control inmunitario incluye al menos uno seleccionado de un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de PD-L2 o un inhibidor de CTLA-4.

[12] El método de tratamiento de acuerdo con [11], en la que el inhibidor de punto de control inmunitario incluye al menos uno seleccionado de un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1 o un inhibidor de CTLA-4.

[13] El método de tratamiento de acuerdo con uno cualquiera de [8] a [12], en la que un sujeto de administración tiene resistencia a la gemcitabina.

La presente invención también incluye los siguientes puntos [14] a

[14] Una formulación farmacéutica para su uso en el método de tratamiento de acuerdo con uno cualquiera de [8] a [12], que comprende:

una composición liposómica para la administración en combinación con un inhibidor de punto de control inmunitario, en la que la composición liposómica incluye liposomas que tienen cada uno una fase acuosa interna y una solución acuosa que constituye una fase acuosa externa y que tiene los liposomas dispersos en la misma, y la gemcitabina se encapsula en un estado disuelto en los liposomas, en donde el inhibidor de punto de control inmunitario incluye al menos uno seleccionado de un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de PD-L2 o un inhibidor de CTLA-4.

La formulación farmacéutica de acuerdo con un aspecto de la presente invención es una formulación farmacéutica para su uso en terapia, que incluye una composición liposómica en combinación con un inhibidor de punto de control inmunitario, en la que la gemcitabina se encapsula en un estado disuelto en liposomas, y la composición liposómica y el inhibidor de punto de control inmunitario se administran simultánea o secuencialmente, y tiene al menos un efecto de tratar o prevenir el cáncer.

Además, la formulación farmacéutica de acuerdo con el aspecto de la presente invención tiene una semivida en sangre prolongada de una composición liposómica que incluye gemcitabina en un estado disuelto, mantiene excelentes propiedades de tener una fuerte actividad antitumoral incluso en una cantidad pequeña, y mediante la administración de una composición liposómica y un inhibidor de punto de control inmunitario en combinación simultánea o secuencialmente, tiene un efecto inhibidor del crecimiento tumoral significativo e inesperado, que es superior al efecto en el caso de una composición liposómica que tiene gemcitabina encapsulada en un estado disuelto en liposomas sola o un inhibidor de punto de control inmunitario solo.

Además, la formulación farmacéutica de acuerdo con el aspecto de la presente invención tiene un efecto inhibidor del crecimiento tumoral incluso a una dosis baja, lo que permite un tratamiento deseable que es altamente seguro, tiene una carga física baja y es muy conveniente para los sujetos, incluyendo los pacientes.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra cambios en el peso corporal en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 2 muestra cambios en el volumen tumoral en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 3 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 4 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 5 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 6 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 7 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 8 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 9 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 10 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 11 muestra una tasa de supervivencia (% de supervivencia sin tumor) en un caso en el que se practica la eutanasia a un sujeto de ensayo que tiene un volumen tumoral de más del 10 % del peso corporal, y los resultados de una curva de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier.

La Fig. 12 muestra cambios en el volumen tumoral en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 13 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 14 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 15 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 16 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 17 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 18 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 19 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 20 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 21 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 22 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 23 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 24 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 25 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 26 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 27 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 28 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 29 muestra una tasa de supervivencia (% de supervivencia sin tumor) en un caso en el que se practica la eutanasia a un sujeto de ensayo que tiene un volumen tumoral de más del 10 % del peso corporal, y los resultados de una curva de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier.

La Fig. 30 muestra un valor medio de un porcentaje de linfocitos T positivos para CD8 en cada grupo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 31 muestra un valor medio de un porcentaje de células M1 en cada grupo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 32 muestra un valor medio de un porcentaje de células M2 en cada grupo en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 33 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un grupo de control en un ensayo para verificar un efecto sobre los linfocitos T positivos para CD8 usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 34 muestra cambios en el volumen tumoral por individuo en un grupo al que se le administró anticuerpo anti-CD8 en un ensayo para verificar un efecto sobre los linfocitos T positivos para CD8 usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 35 muestra cambios en el porcentaje de células positivas para Ki67 en linfocitos T positivos para CD8 con respecto a antes de la administración de una sustancia de ensayo en sangre circulante en un ensayo para verificar cambios en la composición de células inmunitarias en sangre circulante y tumores en seres humanos.

La Fig. 36 muestra cambios en el porcentaje de linfocitos Treg positivos para Ki67 en linfocitos Treg con respecto a antes de la administración de una sustancia de ensayo en sangre circulante en un ensayo para verificar cambios en la composición de células inmunitarias en sangre circulante y tumores en seres humanos.

La Fig. 37 muestra cambios en el porcentaje de M-MDSC en MDSC totales con respecto a antes de la administración de una sustancia de ensayo en sangre circulante en un ensayo para verificar cambios en la composición de células inmunitarias en sangre circulante y tumores en seres humanos.

La Fig. 38 muestra un valor obtenido comparando porcentajes de M-MDSC en MDSC totales en tumores entre antes de la administración de una sustancia de ensayo y 15 días después de una segunda administración de la sustancia de ensayo, en un ensayo para verificar cambios en la composición de células inmunitarias en sangre circulante y tumores en seres humanos.

Descripción de las realizaciones preferidas

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá en detalle la presente invención.

En la presente memoria descriptiva, % significa porcentaje en masa a menos que se especifique otra cosa. En la presente memoria descriptiva, en el caso en el que una pluralidad de sustancias correspondientes a componentes estén presentes en una composición, la cantidad de cada componente en la composición significa una cantidad total de la pluralidad de sustancias presentes en la composición, a menos que se especifique otra cosa.

En la presente memoria descriptiva, cada término tiene el siguiente significado a menos que se especifique otra cosa.

La expresión "a" indica un intervalo que incluye los valores numéricos descritos antes y después de "a" como un valor mínimo y un valor máximo, respectivamente.

El sujeto incluye seres humanos y mamíferos distintos de los seres humanos. Los ejemplos de mamíferos distintos de los seres humanos incluyen monos, perros, gatos, vacas, caballos, ratones y ratas.

5 El tratamiento puede ser cualquier tratamiento o terapia que consiga un efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición o el retraso de la progresión de una afección, e incluye ralentizar la velocidad de la progresión, pausar la velocidad de la progresión, mejorar la afección, curar o remitir la afección (ya sea parcial o totalmente), prevenir, retrasar, reducir o detener uno o una pluralidad de síntomas y/o signos de la afección, y prolongar la supervivencia de un sujeto por encima de lo esperado en ausencia de tratamiento.

10 El tratamiento también incluye la prevención. Por ejemplo, tratar a un sujeto que es susceptible o está en riesgo de aparición o reaparición de cáncer puede prevenir o retrasar la aparición o reaparición de cáncer en el sujeto.

15 El tratamiento incluye la inhibición del crecimiento del cáncer, incluyendo la remisión completa del cáncer y/o la inhibición de la metástasis del cáncer. El crecimiento del cáncer se refiere a la transformación del cáncer a una forma más desarrollada. Los ejemplos de un índice para medir la inhibición del crecimiento del cáncer incluyen la disminución de la supervivencia de las células cancerosas, una disminución del volumen o la morfología del tumor (por ejemplo, determinada usando tomografía computarizada (TC), ultrasonografía u otros métodos de diagnóstico por imágenes), un retraso en el crecimiento tumoral, una destrucción de la vasculatura tumoral, puntuaciones mejoradas del ensayo cutáneo de hipersensibilidad retardada, un aumento de la actividad de los linfocitos T citolíticos y una disminución de los niveles de antígenos específicos de tumor.

25 En la presente invención, tumor, tumor maligno, cáncer, neoplasia maligna, carcinoma, sarcoma y similares se denominan colectivamente "tumor" o "cáncer". Además, el término "tumor" o "cáncer" incluye aquellos que han reaparecido después del tratamiento del cáncer. El término "tumor" incluye todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas malignas o benignas, así como células y tejidos precancerosos y cancerosos.

30 La expresión "cantidad eficaz" es una dosis necesaria para conseguir un resultado terapéutico o profiláctico deseado, incluyendo la duración y la cantidad de la administración. La "cantidad eficaz" de la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención puede variar dependiendo de la patología, la edad, el sexo y el peso corporal de un sujeto (o individuo), la capacidad de la formulación farmacéutica para provocar una respuesta deseada en el sujeto (o individuo), y similares.

35 El término "coadministración" se refiere a administrar una primera terapia y una segunda terapia en una terapia de combinación en un intervalo de tiempo de aproximadamente 15 minutos o menos, tal como cualquiera de aproximadamente 10 micrómetros, aproximadamente 5 minutos o aproximadamente 1 minuto o menos. En el caso en el que la primera terapia y la segunda terapia se administren simultáneamente, la primera terapia y la segunda terapia pueden estar contenidas en la misma composición (por ejemplo, una composición que contiene tanto la primera terapia como la segunda terapia), o pueden estar contenidas en composiciones separadas (por ejemplo, la primera terapia está contenida en una composición y la segunda terapia está contenida en otra composición).

45 La expresión "administración secuencial" se refiere a administrar una primera terapia y una segunda terapia en una terapia de combinación en un intervalo de tiempo de más de aproximadamente 15 minutos, tal como cualquiera de aproximadamente 20 micrómetros, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 60 minutos o más (1 día, 2 días, 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o similares). En la presente invención, la administración secuencial también incluye la primera administración de la primera terapia y la primera administración de la segunda terapia. Además, en la presente invención, la administración secuencial también incluye la administración de la segunda terapia después de la administración de la primera terapia (después de un tiempo predeterminado (por ejemplo, después de 1 semana)). La primera terapia y la segunda terapia pueden estar contenidas en composiciones separadas, que pueden estar contenidas en el mismo envase o kit o pueden estar contenidas en envases o kits diferentes.

(Formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención)

55 La formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención es una formulación farmacéutica que incluye (A) una composición liposómica en combinación con (B) un inhibidor de punto de control inmunitario, en la que la composición liposómica incluye liposomas que tienen cada uno una fase acuosa interna y una solución acuosa que constituye una fase acuosa externa y que tiene los liposomas dispersos en la misma, la gemcitabina se encapsula en un estado disuelto en los liposomas y el inhibidor de punto de control inmunitario incluye al menos uno seleccionado de un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de PD-L2 o un inhibidor de CTLA-4.

((A) Composición liposómica)

65 El liposoma es un cuerpo vesicular cerrado formado por una membrana de bicapa lipídica usando lípidos y tiene una fase acuosa (fase acuosa interna) dentro del espacio de la vesícula cerrada. La fase acuosa interna contiene agua y similares. El liposoma por lo general está presente en un estado de dispersión en una solución acuosa (fase acuosa

externa) fuera de un cuerpo vesicular cerrado. En la presente invención, la composición liposómica se refiere a una composición que incluye un liposoma y una solución acuosa, componentes y similares contenidos fuera del liposoma. El liposoma puede ser monolamelar (que también se denomina lamelar monocapa o unilamelar, y es una estructura que tiene una única membrana de bicapa) o puede ser lamelar multicapa (que también se denomina multilaminar y es una estructura similar a una cebolla que tiene múltiples membranas bicapa donde las capas individuales están compartimentadas por capas acuosas). En la presente invención, el liposoma es preferentemente un liposoma laminar único desde el punto de vista de la seguridad y la estabilidad en aplicaciones farmacéuticas. El término "encapsulado" significa adoptar una forma en la que un fármaco está contenido en una fase acuosa interna con respecto al liposoma.

- 10 El tamaño (tamaño de partícula promedio) del liposoma no está particularmente limitado y es de 2 a 200 nm, preferentemente de 5 a 150 nm, más preferentemente de 5 a 120 nm y aún más preferentemente de 5 a 100 nm.

En el caso de esperar un efecto de permeación y retención potenciado (efecto EPR) que se describe a continuación, el tamaño (tamaño de partícula promedio) del liposoma preferentemente sustancialmente de 50 a 200 nm de diámetro, más preferentemente sustancialmente de 50 a 150 nm de diámetro y aún más preferentemente sustancialmente de 50 a 100 nm de diámetro. El término "sustancialmente" significa que al menos el 75 % del número de liposomas está dentro de un intervalo de diámetro especificado. La expresión "al menos el 75 %" es más preferentemente al menos el 80 % y aún más preferentemente al menos el 90 %.

- 20 En la presente invención, el "tamaño de partícula promedio de liposoma" significa un tamaño de partícula promedio (preferentemente un tamaño de partícula promedio acumulativo) medido usando un método de dispersión dinámica de luz a menos que se especifique otra cosa. El "tamaño de partícula promedio" puede medirse usando un aparato capaz de medir el tamaño de partícula promedio mediante un método de dispersión de luz.

- 25 El lípido se incluye como componente (componente de membrana) que constituye la bicapa lipídica del liposoma. Un lípido soluble en un disolvente mixto de un disolvente orgánico hidrosoluble y un disolvente orgánico basado en éster pueden usarse opcionalmente como el lípido. Los ejemplos de los lípidos incluyen un fosfolípido, un lípido distinto del fosfolípido, colesterol y derivados de los mismos. Estos componentes pueden estar constituidos por un único componente o una pluralidad de componentes.

- 30 Los ejemplos del fosfolípido incluyen un fosfolípido natural y sintético tal como fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina o cardiolipina, y un producto hidrogenado de los mismos (por ejemplo, fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC)). Sobre todo, el fosfolípido es preferentemente un fosfolípido hidrogenado tal como fosfatidilcolina de soja hidrogenada, esfingomielina o similares, y más preferentemente fosfatidilcolina de soja hidrogenada. En la presente invención, el término "fosfolípido" también incluye derivados de fosfolípidos obtenidos modificando un fosfolípido.

- 40 El lípido distinto del fosfolípido puede ser, por ejemplo, un lípido sin fosfato, cuyos ejemplos incluyen, pero sin limitación, un glicerolípido que no tiene un resto fosfato en la molécula del mismo y un esfingolípido que no tiene un resto fosfato en la molécula del mismo. En la presente invención, la expresión "lípido distinto del fosfolípido" también incluye derivados de un lípido distinto del fosfolípido obtenido modificando un lípido distinto del fosfolípido.

- 45 En el caso de que el lípido distinto del fosfolípido contenga un grupo funcional básico, por ejemplo, en el caso en el que es una sustancia en la que un compuesto que tiene un grupo funcional básico se une al lípido, el lípido se denomina un lípido cationizado. El lípido cationizado puede modificar, por ejemplo, la membrana del liposoma y puede potenciar la adhesividad a las células que son los sitios diana.

- Los ejemplos de colesterol incluyen colesterol. Es eficaz añadir colesterol o similares con el fin de llenar la deformación de la membrana provocada por el lípido. En relación con la composición liposómica, se espera que la adición de colesterol tenga el efecto de reducir la fluidez de la membrana del liposoma, por ejemplo, llenando los huecos en la membrana del liposoma.

- 50 En la presente invención, se descubrió el efecto inesperado de que la velocidad de liberación del fármaco en un mamífero puede regularse controlando la cantidad de colesterol en un intervalo óptimo en condiciones de alta presión osmótica de la composición liposómica.

- En la presente invención, el contenido de colesterol es del 10 al 35 % en moles, preferentemente del 15 al 25 % en moles y más preferentemente del 17 al 21 % en moles en moles totales de los componentes lipídicos de la composición liposómica (lípidos totales contenidos en la composición liposómica).

- 60 Además de los componentes anteriores, puede añadirse al liposoma un polímero hidrófilo o similar para mejorar la retención en la sangre, ácido graso, fosfato de diacetilo o similar como estabilizador de la estructura de la membrana, o α -tocoferol o similar como antioxidante. En la presente invención, se prefiere no incluir un aditivo tal como un coadyuvante de dispersión que no esté reconocido para su uso en inyección en aplicaciones farmacéuticas, por ejemplo, un tensioactivo.

El liposoma de acuerdo con la realización de la presente invención contiene preferentemente un fosfolípido, un lípido distinto del fosfolípido, colesterol y derivados de los mismos, en el que un fosfolípido, un lípido distinto del fosfolípido y los colesterol se modifican con un polímero hidrófilo.

- 5 El polímero hidrófilo no está particularmente limitado y los ejemplos del mismo incluyen polietilenglicoles, poliglicerinas, polipropilenglicoles, alcoholes polivinílicos, copolímeros alternantes de estireno-anhídrido de ácido maleico, polivinilpirrolidonas y poliaminoácidos sintéticos. Los polímeros hidrófilos pueden usarse solos o en combinación de dos o más de los mismos. Entre estos, desde el punto de vista de la retención en la sangre de una preparación, se prefieren los polietilenglicoles, las poliglicerinas y los polipropilenglicoles, y se prefieren más el polietilenglicol (PEG),
10 la poliglicerina (PG) y el polipropilenglicol (PPG). El polietilenglicol (PEG) es de uso general y se prefiere puesto que tiene el efecto de mejorar la retención en la sangre.

El peso molecular del PEG no está particularmente limitado, pero el peso molecular del PEG es de 500 a 10.000 Dalton, preferentemente de 1.000 a 7.000 Dalton y más preferentemente de 2.000 a 5.000 Dalton.

15 En el liposoma de acuerdo con la realización de la presente invención, se prefiere usar un lípido modificado con PEG (lípido modificado con PEG) junto con el lípido principal incluido en el liposoma.

Los ejemplos del lípido modificado con PEG incluyen 1,2-distearoil-3-fosfatidiletanolamina-polietilenglicoles tales como 1,2-distearoil-3-fosfatidiletanolamina-PEG2000 (fabricada por Nippon Oil & Fats Co., Ltd.), 1,2-distearoil-3-fosfatidiletanolamina-PEG5000 (fabricado por Nippon Oil & Fats Co., Ltd.) y diestearoil glicerol-PEG2000 (fabricado por Nippon Oil & Fats Co., Ltd.).

25 Estos lípidos modificados con PEG pueden añadirse de manera que estén contenidos en una cantidad del 0,3 % al 50 % en masa, preferentemente del 0,5 % al 30 % en masa y más preferentemente del 1 % al 20 % en masa con respecto a la cantidad total de lípidos.

En el liposoma de acuerdo con la realización de la presente invención, se prefiere una combinación lipídica de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (un lípido principal incluido en el liposoma), 1,2-distearoil-3-fosfatidiletanolamina-polietilenglicol (un lípido utilizado en combinación con el lípido principal) y colesterol.

30 La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención preferentemente no contiene polímero aniónico (polianión).

35 Se describirá la gemcitabina aplicada a la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención. La gemcitabina tiene el nombre químico de (+)-2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina y es un agente antineoplásico que tiene una acción antimetabólica. En la presente invención, la gemcitabina puede ser la propia gemcitabina, una sal farmacéuticamente aceptable o un profármaco que libera gemcitabina *in vivo*. En la presente invención, se prefiere usar clorhidrato de gemcitabina.

40 La gemcitabina encapsulada en el liposoma de acuerdo con la realización de la presente invención existe en un estado disuelto en la fase acuosa interna del liposoma. En el presente documento, la expresión "estado disuelto" significa que, en un caso en el que la cantidad del fármaco cargado con respecto al volumen del liposoma es igual o inferior a la solubilidad saturada del fármaco en el líquido de composición de la fase acuosa interna, se considera que el fármaco
45 está encapsulado en un estado disuelto.

Además, incluso en el caso en el que la cantidad de fármaco cargado sea igual o superior a la solubilidad saturada, se considera que la gemcitabina está encapsulada en un estado disuelto en el caso en el que no se observan cristales del fármaco mediante Cryo-TEM y no se observa un patrón de difracción debido a una red cristalina mediante medición por XRD.

50 (Método para producir la composición liposómica)

El método para producir el liposoma de acuerdo con la realización de la presente invención no está particularmente limitado siempre que sea un método capaz de producir una composición liposómica que tenga gemcitabina encapsulada en un estado disuelto en liposomas. Cada etapa del método para producir una composición liposómica descrita en detalle a continuación puede realizarse con referencia a, por ejemplo, los documentos WO2015/166985A y WO2015/166986A.

60 En la presente invención, se prefiere un método para producir una composición liposómica que incluye una etapa de emulsificación de un lípido disuelto en un disolvente orgánico para formar un liposoma sin someterse a una etapa de secado-solidificación, una etapa de carga de fármaco de encapsulación de un fármaco soluble en agua en el liposoma obtenido en la etapa de emulsificación, y una etapa de ajuste de la presión osmótica para ajustar la presión osmótica de la fase acuosa interna del liposoma a 2 veces o más y 8 veces o menos la presión osmótica de la fase acuosa externa.
65

El método para producir una composición liposómica puede incluir otras etapas tales como una etapa de evaporación para evaporar el disolvente orgánico utilizado en la etapa de emulsificación, si fuera necesario.

En la etapa de emulsificación de un lípido disuelto en un disolvente orgánico para formar un liposoma sin someterse a una etapa de secado-solidificación, no hay limitación siempre que sea una etapa de emulsificación. Preferentemente, es una etapa de aplicar alta cizalla y hacer que las partículas sean finas mediante una etapa de emulsificación que incluye un disolvente orgánico. En caso necesario, puede realizarse la evaporación (desolvatación) del disolvente orgánico utilizado en la etapa de emulsificación para formar liposomas.

(Etapa de emulsificación)

En la etapa de emulsificación, una fase oleosa en la que al menos un lípido está disuelto en un disolvente orgánico se mezcla con una fase acuosa para preparar una solución acuosa que contiene lípidos, que después se emulsiona con agitación. Se mezclan una fase oleosa en donde los lípidos se han disuelto en un disolvente orgánico y una fase acuosa, se agitan y emulsionan para preparar de este modo una emulsión donde se emulsionan la fase oleosa y la fase acuosa en un tipo O/W. Después de la mezcla, los liposomas se forman eliminando una porción o la totalidad del disolvente orgánico derivado de la fase oleosa mediante una etapa de evaporación que se describirá a continuación. Como alternativa, una porción o la totalidad del disolvente orgánico en la fase oleosa se evapora en el transcurso de la emulsificación con agitación para formar liposomas.

Como método de agitación, se usan ondas ultrasónicas o fuerza de cizalla mecánica para la miniaturización de partículas. Además, puede realizarse un procesamiento con extrusora o un procesamiento con microfluidificador para permitir el paso a través de un filtro que tiene un tamaño de poro determinado para lograr uniformidad de los tamaños de partículas. El uso de una extrusora o similar puede dar como resultado la descomposición de liposomas multivesiculares formados de forma secundaria en liposomas univesiculares.

En la presente invención, desde el punto de vista de la simplificación del proceso de fabricación, se prefiere usar el liposoma en un estado en el que no se carga un fármaco en la siguiente etapa sin el tratamiento de extrusión.

(Fase oleosa)

Como disolvente orgánico para su uso como la fase oleosa, se usa una mezcla de disolvente orgánico soluble en agua y un disolvente orgánico a base de éster. En la presente invención, se prefiere no usar sustancialmente ningún disolvente orgánico tal como cloroforno, cloruro de metileno, hexano o ciclohexano como el disolvente orgánico, y se prefiere más no usar ninguno de estos disolventes orgánicos.

El disolvente orgánico soluble en agua no está particularmente limitado, pero es preferentemente un disolvente orgánico que tiene una propiedad de mezclarse libremente con agua. Los ejemplos específicos del disolvente orgánico hidrosoluble incluyen alcoholes tales como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol y t-butanol; glicoles tales como glicerina, etilenglicol y propilenglicol; y polialquilenglicoles tales como polietilenglicol. Entre estos, se prefieren los alcoholes.

El disolvente orgánico a base de éster no está particularmente limitado, pero es preferentemente un éster obtenido por la reacción de un ácido orgánico y un alcohol. Específicamente, el disolvente orgánico a base de éster es preferentemente al menos uno seleccionado de acetato de etilo, acetato de metilo, acetato de isopropilo, acetato de t-butilo o propionato de metilo.

La concentración del lípido no está particularmente limitada y puede ajustarse apropiadamente. En el caso de una solución usando como disolvente un líquido mixto de un disolvente orgánico soluble en agua y un disolvente orgánico a base de éster, la concentración del lípido puede ser de 40 g/l a 250 g/l y preferentemente de 100 g/l a 200 g/l.

(Fase acuosa)

La fase acuosa se refiere a una fase acuosa externa y una fase acuosa interna. La fase acuosa externa en la presente invención significa una solución acuosa en que se dispersan los liposomas. Por ejemplo, en el caso de una inyección, una solución que ocupa la parte externa del liposoma de un líquido de dispersión de liposomas envasados y almacenados en un vial o jeringa precargada se convierte en una fase acuosa externa. Además, de forma similar para un líquido que se va a dispersar en el momento de usarlo en caso de ser administrado mediante un líquido adjunto para dispersión u otro líquido de disolución, una solución que ocupa la parte externa del liposoma de un líquido de dispersión de liposomas se convierte en una fase acuosa externa.

La fase acuosa interna en la presente invención se refiere a una fase acuosa en la vesícula cerrada a través de la membrana de bicapa lipídica. En el caso de producción de liposomas, se usan preferentemente agua (agua destilada, agua para inyección o similares), solución salina fisiológica, diversas soluciones tampón, soluciones acuosas de azúcar y mezclas de los mismos (disolventes acuosos) como la solución acuosa (fase acuosa externa) en la que se dispersan los liposomas.

La solución tampón no se limita a soluciones tampón orgánicas e inorgánicas y se usa preferentemente una solución tampón que tenga una acción tamponante en las proximidades de la concentración de iones de hidrógeno cercano al del fluido corporal y los ejemplos del mismo incluyen solución tampón fosfato, una solución tampón de Tris, una solución tampón de citrato, una solución tampón de acetato y una solución tampón de Good. El pH de la fase acuosa no está particularmente limitado, pero puede ser de 5 a 9 y preferentemente de 7 a 8. Por ejemplo, se prefiere usar una solución tampón de fosfato (por ejemplo, pH = 7,4). La fase acuosa interna del liposoma puede ser una solución acuosa en la que se dispersan los liposomas en el caso de producir liposomas, o puede ser agua, solución salina fisiológica, diversas soluciones tampón, soluciones acuosas de azúcar y mezclas de las mismas que se acaban de añadir. El agua utilizada como fase acuosa externa o fase acuosa interna está preferentemente exenta de impurezas (polvo, productos químicos o similares). La solución salina fisiológica se refiere a una solución de sal inorgánica ajustada para ser isotónica con el fluido corporal humano, y además puede tener una función tampón. Los ejemplos de solución salina fisiológica incluyen solución salina que contiene el 0,9 % p/v de cloruro de sodio, solución salina tamponada con fosfato (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada PBS) y solución salina tamponada con Tris.

(Etapa de evaporación)

En la presente invención, puede proporcionarse una etapa de evaporación si es necesario. En la etapa de evaporación, el disolvente orgánico se evapora en la solución acuosa que contiene liposomas obtenida en la etapa de emulsificación. La etapa de evaporación incluye al menos una de una etapa de evaporación y eliminación forzada de una porción o la totalidad del disolvente orgánico derivado de la fase oleosa, o una etapa en la que una porción o la totalidad del disolvente orgánico de la fase oleosa se evapora espontáneamente durante el curso de la agitación/emulsificación.

La solución acuosa que contiene liposomas preparada mediante la etapa de emulsificación puede someterse a un tratamiento posterior mediante un método tal como centrifugación, ultrafiltración, diálisis, filtración en gel o liofilización, con el fin de eliminar componentes no contenidos en los liposomas o ajustar la concentración y la presión osmótica. Los liposomas obtenidos pueden uniformarse en tamaño de partícula usando diálisis, filtración, extrusión o similares. En el método para producir la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, se prefiere preparar liposomas vacíos en un estado en el que no se carga ningún fármaco sin extrusión.

(Extrusión)

La extrusión se refiere a una etapa en la que se hacen pasar liposomas a través de un filtro que tiene un poro fino para aplicar una fuerza de cizalla física, realizando de este modo la microparticulación de los liposomas. En el caso en el que los liposomas pasen a través, se puede conseguir una microparticulación rápida de los liposomas manteniendo el líquido de dispersión de liposomas y el filtro a una temperatura superior o igual a la temperatura de transición de fase de la membrana que constituye el liposoma.

(Etapa de carga de fármaco)

En la etapa de carga de fármaco de acuerdo con la realización de la presente invención, en el caso de encapsular un fármaco hidrosoluble en liposomas, el fármaco puede encapsularse en los liposomas de manera que el fármaco se disuelva en un medio acuoso que esté hidratado e hinchado, y la solución de fármaco resultante se calienta a una temperatura superior o igual a la temperatura de transición de fase, seguido de tratamiento por ultrasonido, extrusión o similar para encapsular el fármaco en la fase acuosa interna del liposoma. Como alternativa, el fármaco puede disolverse en la fase acuosa en el momento de la emulsificación de lípidos para encapsular el fármaco en la fase acuosa interna.

(Etapa de ajuste de la presión osmótica)

En la presente invención, la etapa de ajuste de la presión osmótica hace que la fase acuosa interna del liposoma sea hipertónica (diferencia de presión), por lo que el fármaco se libera fácilmente. La velocidad de liberación puede controlarse ajustando la presión osmótica. La etapa de ajuste de la presión osmótica no está particularmente limitada, pero puede adoptarse un método tal como la diálisis después de la etapa de carga del fármaco. Para la etapa de ajuste de la presión osmótica, puede hacerse referencia a los documentos WO2015/166985A o WO2015/166986A.

En la presente invención, por ejemplo, en el caso en el que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se use como sistema de suministro de fármacos, la cantidad requerida del fármaco requerido puede liberarse en un área afectada diana controlando la liberación. Por otro lado, los liposomas hipertónicos liberan un fármaco fácilmente, mientras que el fármaco también se fuga fácilmente de los liposomas durante el almacenamiento de los mismos, lo que dificulta conseguir tanto la capacidad de liberación del fármaco como la estabilidad durante el almacenamiento. La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención tiene el efecto inesperado de que pueden conseguirse al mismo tiempo tanto la capacidad de liberación del fármaco como la estabilidad durante el almacenamiento, estableciendo que el liposoma tiene una fase acuosa interna, que se obtiene del lípido emulsionado, de manera que la presión osmótica de la fase acuosa interna sea 2 veces o

más y 8 veces o menos la presión osmótica de la fase acuosa externa.

En la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, la presión osmótica de la fase acuosa interna es 2 veces o más y 8 veces o menos, preferentemente de 2,5 veces a 6 veces y más preferentemente de 3 veces a 5 veces la presión osmótica de la fase acuosa externa. Generalmente se sabe que, haciendo que la presión osmótica de la fase acuosa interna sea 2 veces o más la presión osmótica de la fase acuosa externa, la membrana de bicapa lipídica del liposoma presenta una estructura tal como una estructura de membrana de bicapa o una estructura similar a dedos entrelazados. En el caso en el que la presión osmótica de la fase acuosa interna sea 2 veces o más que la de la fase acuosa externa, los liposomas comienzan a cambiar de una estructura de membrana de bicapa a una estructura en forma de dedos entrelazados. En la presente invención, pueden establecerse diversas condiciones lipídicas con el fin de obtener una estructura adecuada en forma de dedos entrelazados, pero se prefiere controlar ajustando la relación de colesterol. Como resultado, es posible obtener una composición liposómica capaz de conseguir tanto la liberación del fármaco como la estabilidad durante el almacenamiento.

En el líquido obtenido después de la etapa de carga de fármaco final, los solutos de la fase acuosa externa y la fase acuosa interna se homogeneizan y, por lo tanto, la presión osmótica en ese momento puede definirse como la presión osmótica de la fase acuosa interna de la composición liposómica completa. Sin embargo, en la etapa posterior de ajuste de la presión de reemplazo/osmótica mediante diálisis de la fase acuosa externa, la operación de calentamiento se limita a un caso en el que el soluto de la fase acuosa interna queda retenido suficientemente, tal como mantener la temperatura igual o inferior a la temperatura de transición de fase del lípido. Además, la presión osmótica de la fase acuosa externa puede definirse por la presión osmótica de un líquido de diálisis utilizado en la etapa de diálisis final. Sin embargo, se limita a un caso en el que la fase acuosa externa puede reemplazarse suficientemente con un líquido de diálisis. Como alternativa, la presión osmótica de la fase acuosa interna y la fase acuosa externa también pueden obtenerse de manera que la solución completa de la composición liposómica se someta a centrifugación o ultrafiltración para cuantificar la concentración de composición del soluto de la fase acuosa externa y la concentración de composición del soluto de la fase acuosa interna y medir la presión osmótica del líquido de composición.

La presión osmótica puede medirse de acuerdo con el método de medición de la presión osmótica descrito en la 16.^a Farmacopea Japonesa revisada. Específicamente, la osmolalidad puede determinarse midiendo el grado de depresión del punto de congelación (punto de hielo) del agua. Además, el grado de depresión del punto de congelación del agua se define mediante la concentración molar de soluto y la osmolalidad también puede determinarse a partir de la concentración molar de soluto.

La presión osmótica de la fase acuosa externa en la presente invención tiene un efecto importante sobre el cuerpo vivo durante la administración. En el caso de que la presión osmótica de la fase acuosa externa se desvíe mucho de la presión osmótica de un fluido corporal, la hemólisis y el dolor ocurren debido al movimiento del agua en cada tejido. Por lo tanto, la presión osmótica de la fase acuosa externa en la presente invención es preferentemente de 200 a 400 mOsmol/l, más preferentemente de 250 a 350 mOsmol/l y mucho más preferentemente isotónica con el fluido corporal.

(Esterilización por filtración)

La solución acuosa que contiene liposomas obtenida mediante el método para producir una composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se somete preferentemente a esterilización por filtración. Con respecto al método de filtración, es posible eliminar materiales no deseados de una solución acuosa que contiene liposomas usando una membrana de fibra hueca, una membrana de ósmosis inversa, un filtro de membrana (preferentemente un filtro de esterilización por filtración de 0,2 μm) o similar.

(Aditivos y similares para la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención)

La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención puede prepararse añadiendo aditivos que incluyen un medio tal como una solución acuosa, una sal, un conservante, un tampón y similares que sean farmacéuticamente aceptables, para la administración a un sujeto. Los ejemplos de un vehículo acuoso incluyen agua, una solución de alcohol/agua, solución salina fisiológica y un medio parenteral tal como cloruro de sodio o glucosa. Los ejemplos de un medio intravenoso incluyen agua y un suplemento nutricional. Los ejemplos del conservante incluyen un agente antibacteriano, un antioxidante, un agente quelante y un gas inerte. El pH de la composición liposómica y las concentraciones de los diversos componentes pueden ajustarse a los valores deseados.

El método de administración de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención es preferentemente la administración parenteral. Por ejemplo, puede seleccionarse una inyección intravenosa tal como goteo intravenoso, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, inyección intraocular e inyección intratecal. Un método de administración específico de la composición liposómica puede ser, por ejemplo, administración mediante jeringa o goteo intravenoso. En el caso en el que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se administre simultánea o secuencialmente en combinación con el inhibidor de punto de control inmunitario de acuerdo con la realización de la presente invención, la dosis eficaz y el período de dosificación de la composición liposómica pueden seleccionarse para que presenten un efecto terapéutico sinérgico.

Sin embargo, la presente invención no está limitada por estas dosis.

(Recipiente para la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención)

- 5 El recipiente para la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención no está particularmente limitado y está hecho preferentemente de un material que tiene una baja permeabilidad al oxígeno. Los ejemplos del recipiente incluyen un recipiente de plástico, un recipiente de vidrio y una bolsa de film laminado con papel de aluminio, una película de aluminio depositada por vapor, una película de óxido de aluminio depositada por vapor, una película de óxido de silicio depositada por vapor, un alcohol polivinílico, un copolímero de etileno-alcohol
- 10 vinílico, un tereftalato de polietileno, un naftalato de polietileno, un cloruro de polivinilideno o similares como una capa de barrera de gases. El recipiente puede protegerse de la luz empleando, por ejemplo, una bolsa usando un vaso coloreado, una hoja de aluminio, una película de deposición de vapor de aluminio o similar, si fuera necesario. Para evitar la oxidación debida al oxígeno existente en el espacio interior del recipiente, se prefiere reemplazar el gas en el espacio del recipiente y la solución de fármaco con un gas inerte tal como nitrógeno. Por ejemplo, una solución de
- 15 inyección se burbujea con nitrógeno, de modo que el llenado de la solución de inyección en un recipiente puede realizarse en atmósfera de nitrógeno.

(Velocidad de liberación)

- 20 La velocidad de liberación significa una cantidad de fármaco (en este caso, gemcitabina) que sale del liposoma por unidad de tiempo. En la presente invención, la velocidad de liberación en plasma a 37 °C es preferentemente del 10 % en masa/24 h o más y del 70 % en masa/24 h o menos, más preferentemente del 20 % en masa/24 h o más y del 60 % en masa/24 h o menos y aún más preferentemente del 20 % en masa/24 h o más y del 50 % en masa/24 h o menos.

- 25 Puesto que la velocidad de liberación depende de la temperatura, se prefiere medir la velocidad de liberación en condiciones de temperatura constante. Por ejemplo, en el caso de un ser humano, la temperatura no está particularmente limitada, pero se prefiere medir la velocidad de liberación dentro del intervalo de temperatura corporal (35 °C o más y 38 °C o menos).

- 30 En el caso en el que la velocidad de liberación es inferior al 10 % en masa/24 h, es posible que no se obtenga suficiente tiempo de exposición *in vivo* como agente antineoplásico y, por lo tanto, en muchos casos es posible que no se obtenga la eficacia esperada del fármaco; y en algunos casos puede manifestarse una toxicidad inesperada debido a la retención *in vivo* innecesaria a largo plazo de los liposomas que contienen un agente antineoplásico, y a la acumulación de los liposomas en tejidos como la piel, donde los liposomas no se distribuyen fácilmente. Además, en el caso en el que la velocidad de liberación es superior al 70 % en masa/24 h, la cantidad de fármaco expuesta por unidad de tiempo aumenta y la concentración en sangre máxima del fármaco aumenta, dando como resultado una mayor toxicidad; y el fármaco fugado se distribuye a tejidos distintos del sitio del tumor o se metaboliza rápidamente para reducir su retención en la sangre, lo que, por lo tanto, no se prefiere.

- 40 (Volumen tumoral)

- En la presente invención, se puede trasplantar un tumor a un animal modelo (preferentemente un ratón o una rata) para medir el volumen tumoral. La inhibición del crecimiento del volumen tumoral depende del fármaco utilizado, la combinación de lípidos o similares que constituyen el liposoma, y la cantidad eficaz. La inhibición del crecimiento del volumen tumoral se refiere a al menos uno de entre la inhibición del crecimiento tumoral, lograr estasis tumoral o lograr una regresión tumoral sustancial o completa.

- 50 En el caso en el que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se administre a un sujeto tal como un mamífero, la administración puede iniciarse después de la asignación de animales modelo a un grupo de tratamiento y un grupo de control, y después el trasplante de células tumorales a los animales sujetos, por ejemplo, crecimiento de las células tumorales de 100 a 1.000 mm de manera que las células tumorales se asienten.

- 55 Por ejemplo, en el caso en el que el animal modelo sea un ratón, los ratones de cada grupo pueden pesarse en su conjunto a diario hasta que los animales alcancen un peso corporal mínimo, como una evaluación de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención. Los tumores pueden medirse con calibres o similares hasta el sacrificio final de los animales para el muestreo, hasta que los tumores alcancen los 2.000 mm³ o hasta que los animales mueran. El volumen tumoral en un sujeto mamífero puede medirse usando cualquier método reconocido en la técnica relacionada. Por ejemplo, puede usarse medición con calibre para evaluar el volumen tumoral usando la expresión: $(a \times b^2) \times 0,5$, donde "a" es un diámetro máximo y "b" es la longitud del eje menor. Además, en el caso de los seres humanos, el volumen tumoral puede medirse mediante una técnica de diagnóstico por imágenes tal como la tomografía computarizada (TC) o la resonancia magnética (RM).

- 65 Los tumores a los que puede aplicarse la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención no están particularmente limitados, y la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención puede aplicarse ampliamente a tratamientos de cánceres comunes tales como cáncer de mama,

cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal, linfoma no Hodgkin (LNH), carcinoma de células renales, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, carcinoma carcinoide, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de las vías biliares, mesotelioma y mieloma múltiple. La formulación farmacéutica de acuerdo con la

realización de la presente invención se usa preferentemente para tratar una enfermedad tumoral para la que una terapia que usa gemcitabina es eficaz, y más preferentemente para tratar una enfermedad tumoral resistente a la gemcitabina.

La resistencia significa que las células cancerosas muestran resistencia a un agente antineoplásico e incluye la resistencia natural ante la que el agente antineoplásico no actúa desde el comienzo del tratamiento y una afección en la que un agente antineoplásico inicialmente eficaz es ineficaz o su efecto disminuye a medida que continúa el tratamiento. Específicamente, la resistencia se refiere a una propiedad por la que las células no mostraron una respuesta adecuada a un agente antineoplásico en el sentido de que las células respondieron al agente antineoplásico en la etapa temprana, pero después mostraron una disminución en la capacidad de respuesta durante el tratamiento, o en el sentido de que las células continuaron proliferando durante el tratamiento con el agente antineoplásico.

((B) Inhibidor de punto de control inmunitario)

La expresión "inhibidor de punto de control inmunitario" se refiere a un fármaco que inhibe la unión de un punto de control inmunitario a un ligando de la misma para inhibir la transducción de señales por el punto de control inmunitario. Los ejemplos del inhibidor de punto de control inmunitario incluyen puntos de control inmunitario y ligandos de los mismos que se presentan en la superficie de los linfocitos T, específicamente, moléculas tales como PD-1, CTLA-4, TIM3, LAG3, PD-L1, PD-L2, BTLN2, B7-H3, B7-H4, CD48, CD80, 2B4, BTLA, CD160, CD60, CD86 y VISTA, pero la presente invención no se limita a ello. En la presente invención, el inhibidor de punto de control inmunitario es un agente que inhibe al menos una proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) o un ligando de la misma PD-L1 o PD-L2, o antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4). PD-1 (Muerte programada-1, CD279) es una proteína de membrana de tipo I de 50-55 kDa perteneciente a la familia CD28/CTLA-4 que actúa para potenciar y/o suprimir las señales de activación de linfocitos. Además, PD-L1 (también conocido como B7-H1 o CD274) y PD-L2 (también conocido como B7-DC o CD273) son ligandos de PD-1 expresados en la superficie de células presentadoras de antígenos.

El inhibidor de punto de control inmunitario puede ser cualquier sustancia que sea capaz de unirse a un punto de control inmunitario y a un ligando del mismo, que se presente en la superficie de los linfocitos T e incluye al menos uno seleccionado de un inhibidor de PD-1, un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de PD-L2 o un inhibidor de CTLA-4. Por ejemplo, puede usarse al menos uno de entre un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD-L2 o un anticuerpo anti-CTLA-4 conocido en la técnica relacionada. Un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD-L2, un anticuerpo anti-CTLA-4 y similares, están disponibles en el mercado en, por ejemplo, Bio X Cell. Los ejemplos específicos del inhibidor de punto de control inmunitario incluyen, pero sin limitación, nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab, atezolizumab, durvalumab, avelumab, tremelimumab y abatacept. Además, también es posible usar al menos uno de entre un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-L2 en combinación con un anticuerpo anti-CTLA-4, como el inhibidor de punto de control inmunitario.

El inhibidor de punto de control inmunitario de acuerdo con la realización de la presente invención puede administrarse a un sujeto mediante administración oral o parenteral y preferentemente administración parenteral. El método de administración incluye específicamente la administración por inyección, administración nasal, administración pulmonar, administración transdérmica y similares. Los ejemplos de la administración por inyección incluyen inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal e inyección subcutánea. Además, el método de administración puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la edad y los síntomas del sujeto. La dosis puede seleccionarse, por ejemplo, en el intervalo de 0,0001 mg a 1000 mg por kg de peso corporal del sujeto por administración. Como alternativa, la dosis puede seleccionarse dentro del intervalo de 0,001 mg/cuerpo a 100.000 mg/cuerpo por paciente. En el caso en el que el inhibidor de punto de control inmunitario de acuerdo con la realización de la presente invención se administre simultánea o secuencialmente en combinación con la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, la dosis eficaz y el período de dosificación del inhibidor de punto de control inmunitario pueden seleccionarse para que presente un efecto terapéutico sinérgico. Sin embargo, la presente invención no está limitada por estas dosis.

(Aditivos y similares para inhibidor de punto de control inmunitario)

El inhibidor de punto de control inmunitario de acuerdo con la realización de la presente invención puede prepararse añadiendo aditivos que incluyen un medio tal como una solución acuosa farmacéuticamente aceptable, una sal, un conservante, un tampón y similares para la administración del mismo a un sujeto, además de un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD-L2, un anticuerpo anti-CTLA-4 y similares. Específicamente, los aditivos mencionados anteriormente y similares de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención pueden aplicarse de manera similar.

La formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención puede usarse para tratar a un

sujeto que tiene un cáncer que es refractario al tratamiento con un inhibidor de punto de control inmunitario. Por ejemplo, un sujeto para quien no se observó la eficacia deseada del fármaco mediante la administración del inhibidor de punto de control inmunitario puede tratarse con la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención.

Aunque se desconoce el mecanismo de acción de la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención, se presume que es el siguiente, pero la presente invención no se limita a ello. Se supone que la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención tiene un excelente efecto inhibidor del crecimiento de las células tumorales, debido a un efecto de permeación y retención potenciado (efecto EPR) en el que los liposomas que encapsulan gemcitabina en un estado disuelto penetran a través de los espacios intersticiales de las células endoteliales que forman los vasos neovasculares que existen alrededor de los tumores y se acumulan y quedan retenidos en los tejidos tumorales.

Además, se supone que el inhibidor de punto de control inmunitario potencia la inmunidad contra el cáncer al inhibir la interacción con una molécula de punto de control inmunitario tal como PD-1 o un ligando del mismo PD-L1 o CTLA-4, mediante lo cual puede suprimirse la progresión del cáncer o puede tratarse el cáncer.

Además, la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención tiene una fuerte actividad antitumoral incluso con una pequeña cantidad de gemcitabina mediante la administración simultánea o secuencial de una composición liposómica que contiene gemcitabina en un estado disuelto y un inhibidor de punto de control inmunitario en combinación. Además, la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención tiene un efecto inhibidor del crecimiento tumoral superior al del tratamiento con una composición liposómica sola o un inhibidor de punto de control inmunitario solo; o como se muestra en los Ejemplos, la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención tiene el efecto notable e inesperado de que se consigue la remisión completa en 2 de 8 casos de aplicación a ratones.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá de manera específica haciendo referencia a los Ejemplos, pero la presente invención no se limita a ello. Se entiende que los expertos en la materia pueden cambiar y modificar la presente invención de diversas formas. A menos que dichos cambios y modificaciones se aparten del alcance de la presente invención, esos cambios y modificaciones están incluidos en la presente invención. Diversos reactivos utilizados en los Ejemplos están disponibles en el mercado a menos que se especifique otra cosa.

(Composición de una composición liposómica que contiene gemcitabina (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención o Lipo))

Clorhidrato de gemcitabina: 0,57 mg/ml
 HSPC (Nota 1): 11,3 mg/ml
 MPEG-DSPE (Nota 2): 2,91 mg/ml
 Colesterol: 1,39 mg/ml
 Sacarosa: 94 mg/ml
 L-histidina: 1,55 mg/ml
 Cloruro de sodio: 0,188 mg/ml
 Agente de ajuste del pH: c.s.

(Nota 1) fosfatidilcolina de soja hidrogenada

(Nota 2) Sal de sodio de N-(carbonil-metoxipolietilenglicol 2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

El clorhidrato de gemcitabina se obtuvo en Teva API, Inc. HSPC y MPEG-DSPE se obtuvieron en NOF Corporation. Para otros reactivos, se usaron productos disponibles en el mercado que cumplen con la Farmacopea de los Estados Unidos.

(Propiedades físicas de la composición liposómica que contiene gemcitabina)

La presión osmótica de la fase acuosa interna del liposoma fue 3,8 veces la presión osmótica de la fase acuosa externa.

La velocidad de liberación de gemcitabina de los liposomas fue del 25 %/24 h a 37 °C en plasma humano, el contenido de colesterol fue del 18,9 % molar con respecto a la cantidad total de componentes lipídicos de la composición liposómica y el tamaño de partícula promedio del liposoma fue de 77 nm.

Como el anticuerpo anti-PD-1 se usó (Bio X Cell, BE0146). Como el anticuerpo anti-PD-L1 se usó (Bio X Cell, BE0101). Como anticuerpo de control de isotipo se usó (Bio X Cell, BE0090). La solución de glucosa al 5 % para inyección (Glu

al 5 %) es una solución acuosa de glucosa 5 g/100 ml. Las células tumorales EMT6 (ATCC, CRL-2755) derivan de la glándula mamaria de ratón y son células tumorales resistentes a la gemcitabina.

(Ejemplo 1)

5 Ensayo de eficacia del fármaco con el uso combinado de PD-L1 en un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6

10 Un anticuerpo anti-PD-L1 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado PD-L1), gemcitabina (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada Gem) y una composición liposómica que contiene gemcitabina (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención) se usaron como sustancias de ensayo. Como Gem se usó clorhidrato de gemcitabina (fabricado por Teva Pharmaceutical Industries Ltd.) disuelto en solución salina fisiológica. La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se diluyó con una solución inyectable de glucosa al 5 % (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada Glu al 5 %; 0,05 g/ml) antes de su uso.

20 Se trasplantaron por vía subcutánea 3×10^6 células EMT6, que son una estirpe celular de cáncer de mama de ratón, en el flanco de ratones hembra Balb para formar tumores subcutáneos. Usando el volumen tumoral como índice, se evaluaron los efectos inhibidores de la administración combinada de PD-L1 y Gem y la administración combinada de PD-L1 y la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención sobre tumores subcutáneos.

25 Se administraron por vía intraperitoneal PD-L1 y un anticuerpo de control de isotipo del mismo (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado anticuerpo Iso) dos veces por semana durante un total de 3 semanas, y Gem, la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención y un disolvente para las mismas (Glu al 5 %) se administraron una vez por semana mediante administración en la vena de la cola durante un total de 3 semanas.

30 Después de completar la administración de 3 semanas, el fármaco se suspendió y la medición del volumen tumoral continuó durante 2 semanas. Los sujetos de ensayo con un volumen tumoral superior al 10 % del peso corporal se sacrificaron durante el ensayo y se realizó un análisis de eficacia del fármaco basándose en la tasa de supervivencia (% de supervivencia sin tumor).

35 La configuración del grupo se estableció en una combinación de Glu al 5 % y anticuerpo Iso (10 mg/kg) para el Grupo 1, una combinación de Glu al 5 % y PD-L1 (10 mg/kg) para el grupo 2, una combinación de Gem (240 mg/kg) y anticuerpo Iso (10 mg/kg) para el Grupo 3, una combinación de Gem (240 mg/kg) y PD-L1 (10 mg/kg) para el Grupo 4, una combinación de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención (1 mg/kg) y anticuerpo Iso (10 mg/kg) para el Grupo 5, una combinación de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención (1 mg/kg) y PD-L1 (10 mg/kg) para el Grupo 6, una combinación de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención (4 mg/kg) y anticuerpo Iso (10 mg/kg) para el Grupo 7, y una combinación de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención (4 mg/kg) y PD-L1 (10 mg/kg) para el Grupo 8.

45 Los Grupos 1 a 5 y 7 son Ejemplos comparativos, y los Grupos 6 y 8 son Ejemplos. El límite superior de la dosis de cada fármaco se estableció como una dosis que no alcanza el peso corporal mínimo, asumiendo que la cantidad a la que la velocidad de pérdida de peso no supera el 20 % es una dosis máxima tolerable (MTD, por sus siglas en inglés). La configuración del grupo y la dosis se muestran en la Tabla 1. En la Tabla 1, "Dosis" representa una cantidad como forma activa de gemcitabina, "Dos veces/3S" representa la administración dos veces por semana durante un total de 3 semanas, "Once/3S" representa la administración una vez por semana durante un total de 3 semanas, "Abdomen" representa la administración intraperitoneal, "Cola" representa la administración en la vena de la cola y "Lipo" representa la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención. Además, Lipo (1) y Lipo (4) significan que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se administró a un sujeto a una dosis de 1 mg/kg y una dosis de 4 mg/kg, respectivamente.

[Tabla 1]

Grupo	Sustancia de ensayo	Dosis (mg/kg/administración)		PD-L1 y anticuerpo Iso		Gem, Composición liposómica y Glu al 5 %		Dosificación (ml/kg)
		PD-L1	Gemcitabina	Vía de administración	Pauta de administración	Vía de administración	Pauta de administración	
1	Glu al 5 % + Anticuerpo Iso	0	0	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
2	Glu al 5 % + PD-L1	10	0	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
3	Gem + Anticuerpo Iso	0	240	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
4	Gema + PD-L1	10	240	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
5	Lipo (1) + Anticuerpo Iso	0	1	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
6	Lipo (1) + PD-L1	10	1	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
7	Lipo (4) + Anticuerpo Iso	0	4	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
8	Lipo (4) + PD-L1	10	4	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10

Los cambios en el peso corporal se muestran en la Fig. 1. Los cambios en el volumen tumoral se muestran en la Fig. 2 (valor medio) y las Fig. 3 a 10 (sobre la base de un individuo). La Tabla 2 muestra el número de sujetos de ensayo en remisión completa (sujetos de ensayo con volumen tumoral cero) el día 41 posterior al trasplante, el número de

5

[Tabla 2]

Grupo	Número de sujetos de ensayo en remisión completa	Número de individuos en el grupo	Tasa de Remisión Completa (%)
1	0	8	0
2	0	8	0
3	0	8	0
4	0	8	0
5	0	8	0
6	0	8	0
7	0	8	0
8	2	8	25

En el Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4, Grupo 5 y Grupo 6, el crecimiento tumoral no pudo detenerse durante el período de dosificación, y todos los sujetos de ensayo fueron sometidos a eutanasia el día de la finalización del ensayo, que es el día 41 después del trasplante. En el Grupo 7, se observó un efecto inhibitor del crecimiento excelente, pero todos los sujetos de ensayo fueron sometidos a eutanasia debido al nuevo crecimiento tumoral después de suspender el fármaco. En el Grupo 8, se observó un efecto inhibitor del crecimiento excelente, se confirmó un efecto inhibitor del crecimiento tumoral incluso después de suspender el fármaco y 2 de 8 casos estaban en remisión completa.

10

15

Se calculó la tasa de supervivencia (% de supervivencia sin tumor) en un caso en el que se practicó la eutanasia a un sujeto de ensayo con un volumen tumoral superior al 10 % del peso corporal, y los resultados de una curva de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier se muestran en Fig. 11. En la Fig. 11, los números representan del Grupo 1 al Grupo 8. Como análisis estadístico de un efecto de prolongar el tiempo de supervivencia, se realizó un ensayo de rangos logarítmicos y se determinó que un valor de p inferior al 5 % entre los grupos tenía una diferencia estadísticamente significativa. Se usó Graphpad Prism versión 5.03 para el cálculo de la mediana de supervivencia calculada a partir de la curva de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier y el análisis estadístico. La Tabla 3 muestra los resultados del análisis de la curva de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier.

20

25

En el ensayo de rango logarítmico de la Tabla 3, "a" indica $p < 0,05$, "b" indica $p < 0,01$, "c" indica $p < 0,0001$ y "ns" indica que no hay diferencias significativas. "Sin definir" indica que la tasa de supervivencia no cayó por debajo del 50 % en el análisis de mediana de la supervivencia y no pudo analizarse.

[Tabla 3]

Grupo de control		2	3	5	7	4	6	8
Grupo comparativo		1				3	5	7
Ensayo de rango logarítmico	valor de p	0,1255	0,1562	0,0346	< 0,0001	0,2223	0,0109	0,0074
	Determinación	ns	ns	a	c	ns	a	b
Mediana de la supervivencia	Grupo de control	20	20	20	34	21,5	23	Sin definir
	Grupo comparativo	16	16	16	16	20	20	34
	Porcentaje (%)	1,25	1,25	1,25	2,125	1,075	1,15	-

30

No se observó una prolongación significativa del tiempo de supervivencia en el Grupo 2 o el Grupo 3 en comparación con el Grupo 1, y PD-L1 o Gem no pudieron presentar ningún efecto. Por otra parte, se observó un efecto estadísticamente significativo de prolongación del tiempo de supervivencia en el Grupo 5 o el Grupo 7 en comparación con el Grupo 1. En la verificación del efecto combinatorio, no se confirmó ningún cambio significativo en el efecto de prolongar el tiempo de supervivencia en el Grupo 4 en comparación con el Grupo 3, y el efecto de prolongar el tiempo de supervivencia se potenció significativamente en el Grupo 6 en comparación con el Grupo 5. Además, el Grupo 8 presentó una potenciación significativa del efecto de prolongar el tiempo de supervivencia en comparación con el Grupo 7, y 7 de 8 casos sobrevivieron hasta el día de la finalización del ensayo, que es el día 41 después del trasplante.

35

40

A partir de los resultados anteriores, se demostró que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, en el caso de ser utilizada en combinación con PD-L1, tuvo un efecto inhibitor del crecimiento

excelente en las células tumorales EMT6 que son resistentes a los efectos de Gem o PD-L1, y el efecto inhibidor del crecimiento fue superior al de la combinación de Gem y PD-L1.

(Ejemplo 2)

5 Ensayo de eficacia del fármaco con el uso combinado de PD-1 en un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6

10 Como sustancia de ensayo, se usó la misma sustancia que en el Ejemplo 1. Se trasplantaron por vía subcutánea 3×10^6 células EMT6, que son una estirpe celular de cáncer de mama de ratón, en el flanco de ratones hembra Balb para formar tumores subcutáneos. Usando el volumen tumoral como índice, se evaluaron los efectos inhibidores de la administración combinada de PD-1 y Gem y la administración combinada de PD-1 y Lipo sobre tumores subcutáneos. Las sustancias de ensayo PD-1 y un disolvente para las mismas (PBS; solución salina tamponada con fosfato) se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante un total de 3 semanas, y las sustancias de ensayo Gem, la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención y un disolvente para las mismas (Glu al 5 %) se administraron una vez por semana mediante administración en la vena de la cola durante un total de 3 semanas. Después de completar la administración de 3 semanas, el fármaco se suspendió y la medición del volumen tumoral continuó durante 2 semanas.

20 La configuración del grupo se estableció en una combinación de Glu al 5 % y PBS para el Grupo 1, una combinación de Glu al 5 % y PD-L1 (10 mg/kg) para el grupo 2, una combinación de Gem (240 mg/kg) y anticuerpo Iso (10 mg/kg) para el Grupo 3, una combinación de Gem (240 mg/kg) y PD-1 (10 mg/kg) para el Grupo 4, una combinación de Lipo (2 mg/kg) y PBS para el Grupo 5, una combinación de Lipo (2 mg/kg) y PD-1 (10 mg/kg) para el Grupo 6, una combinación de Lipo (4 mg/kg) y PBS para el Grupo 7, y una combinación de Lipo (4 mg/kg) y PD-1 (10 mg/kg) para el Grupo 8. Los Grupos 1 a 5 y 7 son Ejemplos comparativos, y los Grupos 6 y 8 son Ejemplos. El límite superior de la dosis de cada fármaco se estableció como una dosis que no alcanza el peso corporal mínimo, asumiendo que la cantidad a la que la velocidad de pérdida de peso no supera el 20 % es una dosis máxima tolerable (MTD, por sus siglas en inglés). La configuración del grupo y la dosis se muestran en la Tabla 4. En la Tabla 4, "Dosis" representa una cantidad como forma activa de gemcitabina, "Dos veces/3S" representa la administración dos veces por semana durante un total de 3 semanas, "Once/3S" representa la administración una vez por semana durante un total de 3 semanas, "Abdomen" representa la administración intraperitoneal, "Cola" representa la administración en la vena de la cola y "Lipo" representa la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención. Además, Lipo (2) y Lipo (4) significan que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se administró a un sujeto a una dosis de 2 mg/kg y una dosis de 4 mg/kg, respectivamente

30

{Tabla 4}

Grupo	Sustancia de ensayo	Dosis (mg/kg/administración)		PD-L1 y PBS		Gem, Lipo y Glu al 5 %		Dosificación (ml/kg)
		PD-1	Gemcitabina	Vía de administración	Pauta de administración	Vía de administración	Pauta de administración	
1	Glu al 5 % + PBS	0	0	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
2	Glu al 5 % + PD-1	10	0	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
3	Gem + PBS	0	240	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
4	Gema + PD-1	10	240	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
5	Lipo (2) + PBS	0	2	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
6	Lipo (2) + PD-1	10	2	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
7	Lipo (4) + PBS	0	4	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
8	Lipo (4) + PDI	10	4	Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10

Los cambios en el volumen tumoral se muestran en la Fig. 12 (valor medio) y las Fig. 13 a 20 (sobre la base de un individuo). La Tabla 5 muestra el número de sujetos de ensayo en remisión completa (sujetos de ensayo con volumen tumoral cero) el día 41 posterior al trasplante, el número de sujetos de ensayo en el grupo, la tasa de remisión completa (%) y el volumen tumoral medio cada día después del trasplante, y la Tabla 6 muestra el error típico del volumen tumoral cada día después del trasplante. En la Tabla 5 y en la Tabla 6, "Número de sujetos de ensayo en remisión completa" significa que el volumen tumoral era cero. Como análisis estadístico del efecto combinatorio, se realizó un ensayo de comparaciones múltiples de Bonferroni y se determinó que un valor de p inferior al 5 % entre los grupos con respecto al número de días después del trasplante tenía una diferencia estadísticamente significativa. Se usó Graphpad Prism versión 5.03 para el procesamiento de datos.

[Tabla 5]

Grupo	Número de sujetos de ensayo en remisión completa	Número de individuos en el grupo	Tasa de Remisión Completa (%)	Valor medio de volumen tumoral (mm ³)					
				Días después del trasplante					
				6	9	13	16	20	23
1	0	8	0	445	1095	1798	2781	-	-
2	0	8	0	446	1040	1784	2514	-	-
3	0	8	0	432	473	1129	1228	2265	3521
4	0	8	0	375	432	1227	1395	2305	3112
5	0	8	0	365	644	991	1117	1743	2271
6	1	8	12,5	524	739	946	849	1212	1327
7	0	8	0	486	672	969	1074	1590	1728
8	1	8	12,5	504	582	753	684	1000	963

[Tabla 6]

Grupo	Número de sujetos de ensayo en remisión completa	Número de individuos en el grupo	Tasa de Remisión Completa (%)	Error típico del volumen tumoral ($\pm$ mm ³)					
				Días después del trasplante					
				6	9	13	16	20	23
1	0	8	0	67	121	143	206	-	-
2	0	8	0	61	85	147	327	-	-
3	0	8	0	60	63	110	119	210	299
4	0	8	0	38	58	139	157	258	393
5	0	8	0	56	107	134	151	215	243
6	1	8	12,5	92	85	102	143	278	365
7	0	8	0	51	85	130	149	235	302
8	1	8	12,5	44	59	93	106	211	230

En la Tabla 7, "a" indica $p < 0,05$, "b" indica $p < 0,0001$ y "ns" indica que no hay diferencias significativas.

[Tabla 7]

Grupo de control	4		6		8	
Grupo comparativo	3		5		7	
Días después del trasplante	intervalo de valores p	Determinación	intervalo de valores p	Determinación	intervalo de valores p	Determinación
6	$p > 0,05$	ns	$p > 0,05$	ns	$p > 0,05$	ns
9	$p > 0,05$	ns	$p > 0,05$	ns	$p > 0,05$	ns
13	$p > 0,05$	ns	$p > 0,05$	ns	$p > 0,05$	ns
16	$p > 0,05$	ns	$p > 0,05$	ns	$p > 0,05$	ns
20	$p > 0,05$	ns	$p < 0,05$	a	$p > 0,05$	ns

(continuación)

Grupo de control	4		6		8	
Grupo comparativo	3		5		7	
Días después del trasplante	intervalo de valores p	Determinación	intervalo de valores p	Determinación	intervalo de valores p	Determinación
23	p > 0,05	ns	p < 0.0001	b	p < 0,05	a

En el Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4 y Grupo 5, el crecimiento tumoral no pudo detenerse durante el período de dosificación, y todos los animales fueron sometidos a eutanasia el día de la finalización del ensayo, que es el día 41 después del trasplante. En el Grupo 7, se observó un efecto inhibidor del crecimiento excelente, pero todos los animales fueron sometidos a eutanasia debido al nuevo crecimiento tumoral después de suspender el fármaco. En el Grupo 6 o el Grupo 8, no sólo se observó un efecto inhibidor del crecimiento excelente, sino que también se confirmó un efecto inhibidor del crecimiento tumoral incluso después de suspender el fármaco y 1 de 8 casos estaba en remisión completa.

En la verificación del efecto combinatorio, no fue posible mostrar una potenciación del efecto del uso combinado de PD-1 en el Grupo 4 en comparación con el Grupo 3. Por otra parte, en el Grupo 6 o el Grupo 8, fue posible mostrar una potenciación significativa del efecto del uso combinado de PD-1 el día 23 después del trasplante.

A partir de los resultados anteriores, se descubrió que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, en el caso de ser utilizada en combinación con PD-1, tuvo un efecto inhibidor del crecimiento excelente en las células tumorales EMT6 que son resistentes a los efectos de Gem o PD-1, y presentó un efecto inhibidor del crecimiento notable e inesperado que es superior al de la combinación de Gem y PD-1.

(Ejemplo 3)

Ensayo de eficacia del fármaco con el uso combinado de anticuerpo anti-CTLA-4 en un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6

El anticuerpo anti-CTLA-4 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado CTLA-4), Gem y la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se usaron como sustancias de ensayo. Como Gem se usó clorhidrato de gemcitabina (fabricado por Teva Pharmaceutical Industries Ltd.) disuelto en solución salina fisiológica. La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se diluyó con Glu al 5 % antes de su uso.

Se trasplantaron por vía subcutánea $1,7 \times 10^6$ células EMT6, que son una estirpe celular de cáncer de mama de ratón, en el flanco de ratones hembra Balb/c para formar tumores subcutáneos. Usando el volumen tumoral como índice, se evaluaron los efectos inhibidores de la administración combinada de CTLA-4 y Gem y la administración combinada de CTLA-4 y la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención sobre tumores subcutáneos.

Se administraron por vía intraperitoneal CTLA-4 y un disolvente para el mismo (PBS) dos veces por semana durante un total de 3 semanas, y Gem, la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención y un disolvente para las mismas (Glu al 5 %) se administraron una vez por semana mediante administración en la vena de la cola durante un total de 3 semanas.

Después de completar la administración de 3 semanas, el fármaco se suspendió y la medición del volumen tumoral continuó durante 4 semanas. Los sujetos de ensayo con un volumen tumoral superior al 10 % del peso corporal se sacrificaron durante el ensayo y se realizó un análisis de eficacia del fármaco basándose en la tasa de supervivencia (% de supervivencia sin tumor).

La configuración del grupo se estableció en una combinación de Glu al 5 % y PBS para el Grupo 1, una combinación de Glu al 5 % y CTLA-4 (10 mg/kg) para el grupo 2, una combinación de Gem (240 mg/kg) y PBS para el Grupo 3, una combinación de Gem (240 mg/kg) y CTLA-4 (10 mg/kg) para el Grupo 4, una combinación de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención (1 mg/kg) y PBS para el Grupo 5, una combinación de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención (1 mg/kg) y CTLA-4 (10 mg/kg) para el Grupo 6, una combinación de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención (4 mg/kg) y PBS para el Grupo 7, y una combinación de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención (4 mg/kg) y CTLA-4 (10 mg/kg) para el Grupo 8.

Los Grupos 1 a 5 y 7 son Ejemplos comparativos, y los Grupos 6 y 8 son Ejemplos. La configuración del grupo y la

5 dosis se muestran en la Tabla 8. En la Tabla 1, "Dosis" representa una cantidad como forma activa de gemcitabina, "Dos veces/3S" representa la administración dos veces por semana durante un total de 3 semanas, "Once/3S" representa la administración una vez por semana durante un total de 3 semanas, "Abdomen" representa la administración intraperitoneal, "Cola" representa la administración en la vena de la cola y "Lipo" representa la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención. Además, Lipo (1) y Lipo (4) significan que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se administró a un sujeto a una dosis de 1 mg/kg y una dosis de 4 mg/kg, respectivamente.

[Tabla 8]

Grupo	Sustancia de ensayo	Dosis (mg/kg/administración)			CTLA-4 y PBS		Gem, Composición liposómica y Glu al 5 %		Dosificación (ml/kg)
		CTLA-4	Gem y Lipo		Vía de administración	Pauta de administración	Vía de administración	Pauta de administración	
1	Glu al 5 % + PBS	0	0		Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
2	Glu al 5 % + CTLA-4	10	0		Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
3	Gem + PBS	0	240		Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
4	Gema + CTLA-4	10	240		Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
5	Lipo (1) + PBS	0	1		Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
6	Lipo (1) + CTLA-4	10	1		Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
7	Lipo (4) + PBS	0	4		Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10
8	Lipo (4) + CTLA-4	10	4		Abdomen	Dos veces/3S	Cola	Una vez/3S	10

Los cambios en el volumen tumoral para cada individuo en cada grupo se muestran en las Fig. 21 a 28. La Tabla 9 muestra el número de sujetos de ensayo en remisión completa (sujetos de ensayo con volumen tumoral cero) el día 52 posterior al trasplante, el número de sujetos de ensayo en el grupo y la tasa de remisión completa (%).

5 [Tabla 9]

Grupo	Número de sujetos de ensayo en remisión completa	Número de individuos en el grupo	Tasa de remisión completa (%)
1	0	8	0
2	1	8	12,5
3	0	8	0
4	1	8	12,5
5	0	8	0
6	1	8	12,5
7	0	8	0
8	7	8	87,5

10 En el Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4, Grupo 5 y Grupo 6, el crecimiento tumoral no pudo detenerse durante el período de dosificación. Todos los sujetos de ensayo en el Grupo 1, el Grupo 3 y el Grupo 5, y 7 de 8 sujetos de ensayo en el Grupo 2, el Grupo 4 y el Grupo 6 fueron sometidos a eutanasia el día de la finalización del ensayo, que es el día 52 después del trasplante. En el Grupo 7, se observó un efecto inhibitor del crecimiento excelente, pero los tumores aumentaron después del período de dosificación y, por lo tanto, todos los sujetos de ensayo fueron sometidos a eutanasia. En el Grupo 8, se observó un efecto inhibitor del crecimiento excelente, se confirmó un efecto inhibitor del crecimiento tumoral incluso después del período de dosificación, y 7 de 8 casos estaban en remisión completa.

15 Se calculó la tasa de supervivencia (% de supervivencia sin tumor) en un caso en el que se practicó la eutanasia a un sujeto de ensayo con un volumen tumoral superior al 10 % del peso corporal, y los resultados de una curva de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier se muestran en Fig. 29. En la Fig. 29, del Grupo 1 al Grupo 8 significa del Grupo 1 al Grupo 8. Como análisis estadístico de un efecto de prolongar el tiempo de supervivencia, se realizó un ensayo de rangos logarítmicos y se determinó que un valor de p inferior al 5 % entre los grupos tenía una diferencia estadísticamente significativa. Se usó Graphpad Prism versión 5.03 para el cálculo de la mediana de supervivencia calculada a partir de la curva de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier y el análisis estadístico. La Tabla 10 muestra los resultados del análisis de la curva de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier.

25 En el ensayo de rango logarítmico de la Tabla 10, "a" indica $p < 0,05$, "b" indica $p < 0,001$, "c" indica $p < 0,0001$ y "ns" indica que no hay diferencias significativas. "Sin definir" indica que la tasa de supervivencia no cayó por debajo del 50 % en el análisis de mediana de la supervivencia y no pudo analizarse.

[Tabla 10]

Grupo de control		2	3	5	7	4	6	8
Grupo comparativo		1				3	5	7
Ensayo de rango logarítmico	valor de p	0,7161	0,001	0,0773	< 0,0001	0,1089	0,0134	< 0,0001
	Determinación	ns	b	ns	c	ns	a	c
Mediana de la supervivencia	Grupo de control	21	29,5	22,5	33	35	29,5	Sin definir
	Grupo comparativo	21	21	21	21	29,5	22,5	33
	Porcentaje	1,00	1,40	1,07	1,57	1,19	1,31	-

30 No se observó una prolongación significativa del tiempo de supervivencia en el Grupo 2 o el Grupo 5 en comparación con el Grupo 1, y se observó un efecto estadísticamente significativo de prolongación del tiempo de supervivencia en el Grupo 3 o el Grupo 7 en comparación con el Grupo 1. En la verificación del efecto combinatorio, no se confirmó ningún cambio significativo en el efecto de prolongar el tiempo de supervivencia en el Grupo 4 en comparación con el Grupo 3, y el efecto de prolongar el tiempo de supervivencia se potenció significativamente en el Grupo 6 en comparación con el Grupo 5. Además, el Grupo 8 presentó una potenciación significativa del efecto de prolongar el tiempo de supervivencia en comparación con el Grupo 7, y 7 de 8 casos sobrevivieron hasta el día de la finalización del ensayo, que es el día 52 después del trasplante.

A partir de los resultados anteriores, se demostró que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, en el caso de ser utilizada en combinación con CTLA-4, tuvo un efecto inhibitor del crecimiento excelente en las células tumorales EMT6 que son resistentes a los efectos de Gem o CTLA-4, y el efecto inhibitor del crecimiento fue superior al de la combinación de Gem y CTLA-4.

(Ejemplo 4)

Cambios en la composición de células inmunitarias en tumores en ratones modelo portadores de tumores con trasplante subcutáneo de EMT6

Diversas células inmunitarias infiltran el tumor y afectan a su crecimiento. Las células inmunitarias coexisten en una mezcla de linfocitos T citotóxicos positivos para CD8 que desempeñan una función fundamental en la actividad antitumoral, células inmunitarias antitumorales centradas en linfocitos NK y macrófagos M1, y células inmunitarias promotoras de tumores centradas en linfocitos T reguladores (Treg) y macrófagos M2 que suprimen estas células inmunitarias.

Hay dos tipos de subconjuntos (M1 y M2) en los macrófagos. Los macrófagos M1 presentan actividad antibacteriana o antivírica y actividad antitumoral. Los macrófagos M2 presentan acciones de reparación de tejidos, neoangiogénesis, promoción del crecimiento tumoral e inmunosupresión. Se considera que los macrófagos que infiltran los tejidos tumorales en asociación con la progresión del tumor (macrófagos asociados a tumores: TAM) cambian de macrófagos M1 a macrófagos M2. A partir de esto, se considera que el predominio de los macrófagos M1 es importante para la acción antitumoral, y cambiar el equilibrio de los macrófagos M1 y los macrófagos M2 puede ser un nuevo enfoque terapéutico.

Los linfocitos T citotóxicos positivos para CD8, que desempeñan una función importante en la inmunidad tumoral, son células que se han diferenciado y proliferado sensibilizando linfocitos T positivos para CD8 sin sensibilizar mediante estimulación antigénica o similar, y desempeñan una función de eliminación de células infectadas por virus, células cancerosas y similares. Las células cancerosas consideradas no propias por los linfocitos T positivos para CD8 son inducidas a la muerte celular. Por otra parte, se sabe que las células cancerosas atraen células inmunosupresoras tales como Treg y macrófagos M2 para suprimir de este modo el ataque de los linfocitos T positivos para CD8 y escapar de la vigilancia inmunitaria (referencia: *Immunology*. 2013; 138(2): 105-115).

Se dice que un alto porcentaje de linfocitos T positivos para CD8 en el tumor y una alta relación de macrófagos M1 en comparación con macrófagos M2 dan como resultado un entorno antitumoral (referencia: *J Clin Invest*. 2012; 122(3): 787-95). Por lo tanto, se evaluó si el estado de las células inmunitarias intratumorales en la administración combinada del anticuerpo anti-CTLA-4 y Gem, y la administración combinada del anticuerpo anti-CTLA-4 y la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención estaba en un entorno antitumoral o en un entorno de crecimiento tumoral, basándose en el porcentaje de linfocitos T positivos para CD8 y el porcentaje de macrófagos M1 que muestran una actividad antitumoral y macrófagos M2 que muestran una actividad promotora del crecimiento tumoral como índices.

Se trasplantaron por vía subcutánea $3,0 \times 10^6$ células EMT6, que son una estirpe celular de cáncer de mama de ratón, en el flanco de ratones hembra Balb/c para formar tumores subcutáneos.

El anticuerpo anti-CTLA-4 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado CTLA-4), Gem y la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se usaron como sustancias de ensayo. Como Gem se usó clorhidrato de gemcitabina (fabricado por Teva Pharmaceutical Industries Ltd.) disuelto en solución salina fisiológica. La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se diluyó con Glu al 5 % antes de su uso. Se usaron individuos a quienes se les administró por vía intraperitoneal CTLA-4 y un disolvente para el mismo (PBS) dos veces por semana durante un total de 5 veces, y Gem, la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención y un disolvente para la misma (Glu al 5 %) se administraron una vez por semana mediante administración en la vena de la cola durante un total de 3 veces. Los tumores se extirparon los Días 16 y 17 después del inicio de la administración y se usaron para el análisis de células inmunitarias intratumorales.

El tumor extirpado se convirtió en un estado de células dispersas usando el kit de disociación de tumores Tumor Dissociation Kit, ratón (número de catálogo 130-096-730, fabricado por Miltenyi Biotec GmbH) y las células inmunitarias intratumorales se aislaron usando MicroBeads CD45 (TIL) (número de catálogo 130-110-618, fabricadas por Miltenyi Biotec GmbH). Las células muertas se tiñeron usando el kit de tinción de células muertas de color amarillo fijable LIVE/DEAD (marca registrada) (número de catálogo L34968, fabricado por Invitrogen Corporation), y se tiñeron diversos marcadores de células inmunitarias usando los siguientes anticuerpos marcados con fluorescencia. El CD3 utilizado fue el anticuerpo contra CD3, Alexa Fluor (marca registrada) 700 (número de catálogo 56-0032-82, fabricado por eBioscience, Inc.), el CD8 utilizado fue CD8a-PE-Vio 770, ratón (número de catálogo 130-102-358, fabricado por Miltenyi Biotec GmbH), el CD11b utilizado fue el anticuerpo monoclonal contra CD11b (M1/70), eFluor 450 (número de catálogo 48-0112-82, fabricado por eBioscience, Inc.), el F4/80 utilizado fue F4/80-APC, ratón (número de catálogo 130-102-379, fabricado por Miltenyi Biotec GmbH), el MHC de Clase II utilizado fue el MHC de Clase II-APC-Vio 770, ratón (número de catálogo 130-112-233, fabricado por Miltenyi Biotec GmbH) y el CD206 utilizado fue el anticuerpo

anti-CD206 de ratón (MMR) PE/Cy7 (número de catálogo 141720, fabricado por BioLegend, Inc.). Las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo (Attune NxT, fabricado por Invitrogen Corporation). Se identificaron linfocitos T positivos para CD8 (positivos para CD3, positivos para CD8), macrófagos M1 (positivos para CD11b, positivos para F4/80, positivos para MHC de Clase II, negativos para CD206) y macrófagos M2 (positivos para CD11b, positivos para F4/80, negativos para MHC de Clase II, positivos para CD206), y se calculó el porcentaje de cada grupo celular.

La configuración del grupo se estableció en una combinación de Glu al 5 % y PBS para el Grupo 1, una combinación de Gem (240 mg/kg) y PBS para el Grupo 2, una combinación de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención (4 mg/kg) y PBS para el Grupo 3, una combinación de Gem (240 mg/kg) y CTLA-4 (10 mg/kg) para el Grupo 4, y una combinación de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención (4 mg/kg) y CTLA-4 (10 mg/kg) para el Grupo 5.

Los Grupos 1, 2 y 4 son Ejemplos comparativos, y los Grupos 3 y 5 son Ejemplos. La configuración del grupo y la dosis se muestran en la Tabla 11.

En la Tabla 11, "Dosis" representa una cantidad como forma activa de gemcitabina, "5 veces" representa la administración dos veces por semana durante un total de 5 veces, "3 veces" representa la administración una vez por semana durante un total de 3 veces, "Abdomen" representa la administración intraperitoneal, "Cola" representa la administración en la vena de la cola y "Lipo" representa la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención. Además, Lipo (4) significa que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se administró a un sujeto a una dosis de 4 mg/kg.

[Tabla 11]

Grupo	Sustancia de ensayo	Dosis (mg/kg/administración)		CTLA-4 y PBS		Gem, Composición liposómica y Glu al 5 %			Dosificación (ml/kg)
		CTLA-4	Gem y Lipo	Vía de administración	Pauta de administración	Vía de administración	Pauta de administración		
1	Glu al 5 % + PBS	0	0	Abdomen	5 veces	Cola	3 veces	10	
2	Gem + PBS	0	240	Abdomen	5 veces	Cola	3 veces	10	
3	Lipo (4) + PBS	0	4	Abdomen	5 veces	Cola	3 veces	10	
4	Gema + CTLA-4	10	240	Abdomen	5 veces	Cola	3 veces	10	
5	Lipo (4) + CTLA-4	10	4	Abdomen	5 veces	Cola	3 veces	10	

El porcentaje de cada individuo en cada grupo y el valor medio de cada grupo se muestran en la Fig. 30 (linfocitos T positivos para CD8), la Fig. 31 (macrófagos M1) y la Fig. 32 (macrófagos M2).

El porcentaje de linfocitos T positivos para CD8 en el tumor no cambió en el Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3 y Grupo 4, pero la infiltración de linfocitos T positivos para CD8 aumentó significativamente en el Grupo 5. Además, en el caso en el que se compararon el porcentaje de macrófagos M1 y el porcentaje de macrófagos M2, los macrófagos M1 aumentaron significativamente y los macrófagos M2 disminuyeron en el Grupo 5.

A partir de los resultados anteriores, se sugirió que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, en el caso de ser utilizada en combinación con CTLA-4, cambia el equilibrio de los macrófagos M1 y los macrófagos M2 en un tumor a un estado inflamatorio e induce la infiltración de linfocitos T positivos para CD8, conduciendo de este modo a un efecto antitumoral.

(Ejemplo 5)

Verificación del efecto combinatorio del anticuerpo anti-CTLA-4 sobre linfocitos T positivos para CD8 en un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6

Como sustancias de ensayo se usaron el anticuerpo anti-CTLA-4 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado CTLA-4), el anticuerpo anti-CD8 y la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención. La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se diluyó con Glu al 5 % antes de su uso.

Se trasplantaron por vía subcutánea $0,5 \times 10^6$ células EMT6, que son una estirpe celular de cáncer de mama de ratón, en el flanco de ratones hembra Balb/c para formar tumores subcutáneos. Usando el volumen tumoral como índice, los linfocitos T positivos para CD8 se eliminaron mediante anticuerpos anti-CD8 para evaluar el efecto de la administración combinada de CTLA-4 y la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención sobre un efecto antitumoral.

El anticuerpo anti-CD8, CTLA-4 y un disolvente para el mismo (PBS) se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante un total de 6 veces, y la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención y un disolvente para la misma (Glu al 5 %) se administraron una vez a la semana mediante administración en la vena de la cola durante un total de 3 veces.

La configuración de grupos se estableció en una combinación de CTLA-4 y la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención para el Grupo 1, y una combinación de anticuerpo anti-CD8, CTLA-4 y la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención para el Grupo 2.

El volumen tumoral de cada individuo en cada grupo se muestra en la Fig. 33 (Grupo 1) y la Fig. 34 (Grupo 2).

El efecto antitumoral observado en el Grupo 1 se anuló totalmente en el Grupo 2 mediante la eliminación de los linfocitos T positivos para CD8.

A partir de los resultados anteriores, se sugirió que, en el efecto combinatorio de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención y CTLA-4, la infiltración de linfocitos T positivos para CD8 en el tumor actúa como el aspecto esencial del efecto antitumoral.

(Ejemplo de referencia)

Cambios en la composición de células inmunitarias en la sangre circulante y tumores en seres humanos

Se ha publicado que los linfocitos Treg y las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) inmunosupresoras aumentan en la sangre periférica de pacientes con cáncer, lo que por lo tanto se asocia a la malignidad del cáncer. Los linfocitos T reguladores (Treg) desempeñan un papel importante en la "tolerancia inmunitaria" que evita una respuesta autoinmunitaria, pero también participan en la "evasión inmunitaria" de las células cancerosas y, por lo tanto, suprimen una respuesta inmunitaria antitumoral (referencia: *J Transl Med.* 2016; 14; 282). Las MDSC son células progenitoras de granulocitos, células dendríticas, macrófagos o similares, y son poblaciones celulares muy diversas que se inducen en respuesta a factores oncogénicos tales como citocinas y tienen diferentes grados de diferenciación. Se sabe que la función más importante de las MDSC es la supresión de la respuesta inmunitaria, y su mecanismo de supresión también es extremadamente diverso. Basándose en estos hallazgos, las MDSC, junto con los linfocitos T reguladores, son células que desempeñan un papel importante en la condición inmunosupresora de los pacientes con cáncer y recientemente han atraído la atención como células que interfieren con la inmunoterapia contra el cáncer (referencia: *Journal of Japan Society of Immunology & Allergology in Otolaryngology* (JJIAO) 2013; 30(4): 271-278).

Por lo tanto, en un ensayo de fase 1 de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, los cambios en los linfocitos T positivos para CD8 y los Treg y las MDSC inmunosupresores en la sangre

circulante, así como las MDSC en tumores se evaluaron para pacientes con cáncer a los que se les administró la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención.

La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se usó como sustancia de ensayo. La dosis y la pauta de dosificación se muestran en la Tabla 12.

[Tabla 12]

Cohorte	Sustancia de ensayo	Número de pacientes	Dosis (mg/m ²)	Pauta de administración
1	Composición liposómica	3	1,2 mg/m ²	Una vez durante 2 semanas
2	Composición liposómica	4	2,4 mg/m ²	Una vez durante 2 semanas
3	Composición liposómica	3	4,8 mg/m ²	Una vez durante 2 semanas

Antes de la administración de la sustancia de ensayo (C1D1), se realizó un análisis de células inmunitarias en sangre periférica, 7 días después de la primera administración (C1D8), 14 días después de la primera administración (C1D15) y 14 días después de la segunda administración (C2D1), y se realizó un análisis unicelular antes de la administración de la sustancia de ensayo (antes de la dosis) y 15 días después de la segunda administración (C2D2).

La Fig. 35 muestra los cambios desde C1D1 en el porcentaje de linfocitos T positivos para CD8 positivos para Ki67, lo que es un índice de crecimiento, con respecto a los linfocitos T positivos para CD8 totales (positivos para CD3, positivos para CD8) en la sangre circulante de los pacientes. La Fig. 36 muestra los cambios desde C1D1 en Treg positivos para Ki67 con respecto a los Treg totales (positivos para CD3, positivos para CD25, negativos para CD127, positivos para foxp3) en la sangre circulante. La Fig. 37 muestra los cambios desde C1D1 en M-MDSC (NMSC negativas para CD15, positivas para CD14) con respecto a las MDSC totales (negativas para CD3, negativas para CD19, negativas para CD56, negativas para HLA-DR, positivas para CD11b, positivas para CD33) en la sangre circulante. La Fig. 38 muestra los valores obtenidos comparando M-MDSC entre antes de la administración de la sustancia de ensayo y C2D2, con respecto a las MDSC totales en tumores en 5 pacientes con muestras de tumores de las Cohortes 1 a 3.

En la Fig. 35, se observó un aumento en los linfocitos T positivos para CD8 positivos para Ki67 en el grupo de la Cohorte 3.

En la Fig. 36, se observó una disminución en los Treg positivos para Ki67 en el grupo de la Cohorte 3.

En la Fig. 37, se observó una disminución en el porcentaje de M-MDSC en el grupo de la Cohorte 3.

En la Fig. 38, se observó una disminución en el porcentaje de M-MDSC en el grupo de la Cohorte 3.

A partir de los resultados anteriores, se sugirió que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención tiene un efecto de disminuir las M-MDSC y los Treg positivos para Ki67 inmunosupresores y un efecto de aumentar los linfocitos T positivos para CD8 positivos para Ki67 que tienen un efecto antitumoral. Debido a estos efectos, la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención sola y una combinación de la misma con un inhibidor de punto de control inmunitario puede ser un enfoque terapéutico novedoso a través de un efecto de activación inmunitaria.

La formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención es útil como formulación farmacéutica para prevenir o tratar el cáncer.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende:

- 5 (A) una composición liposómica en combinación con (B) un inhibidor de punto de control inmunitario, en donde
la composición liposómica incluye liposomas que tienen cada uno una fase acuosa interna y una solución
acuosa que constituye una fase acuosa externa y que tiene los liposomas dispersos en la misma,
la gemcitabina se encapsula en un estado disuelto en los liposomas y el inhibidor de punto de control inmunitario
10 incluye al menos uno seleccionado de un inhibidor de PD-1,
un inhibidor de PD-L1, un inhibidor de PD-L2 o un inhibidor de CTLA-4.

2. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1,
15 en donde la composición liposómica es una composición liposómica en la que la presión osmótica de la fase acuosa
interna del liposoma es 2 veces o más y 8 veces o menos la presión osmótica de la fase acuosa externa.

3. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1,
en donde la composición liposómica es una composición liposómica en la que un contenido de colesterol es del
10 10 % en moles o más y del 35 % en moles o menos con respecto a una cantidad total de componentes lipídicos de la
composición liposómica, y una presión osmótica de la fase acuosa interna es 2 veces o más y 8 veces o menos la
presión osmótica de la fase acuosa externa.

4. La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,
25 en donde el inhibidor de punto de control inmunitario incluye al menos uno seleccionado de un inhibidor de PD-1, un
inhibidor de PD-L1 o un inhibidor de CTLA-4.

5. La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,
en donde el inhibidor de punto de control inmunitario incluye al menos uno seleccionado de un inhibidor de PD-1.

30 6. La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en terapia,
en donde la composición liposómica y el inhibidor de punto de control inmunitario se administran simultáneamente

7. La formulación farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 6,
en donde un sujeto de administración tiene resistencia a la gemcitabina.

FIG. 1

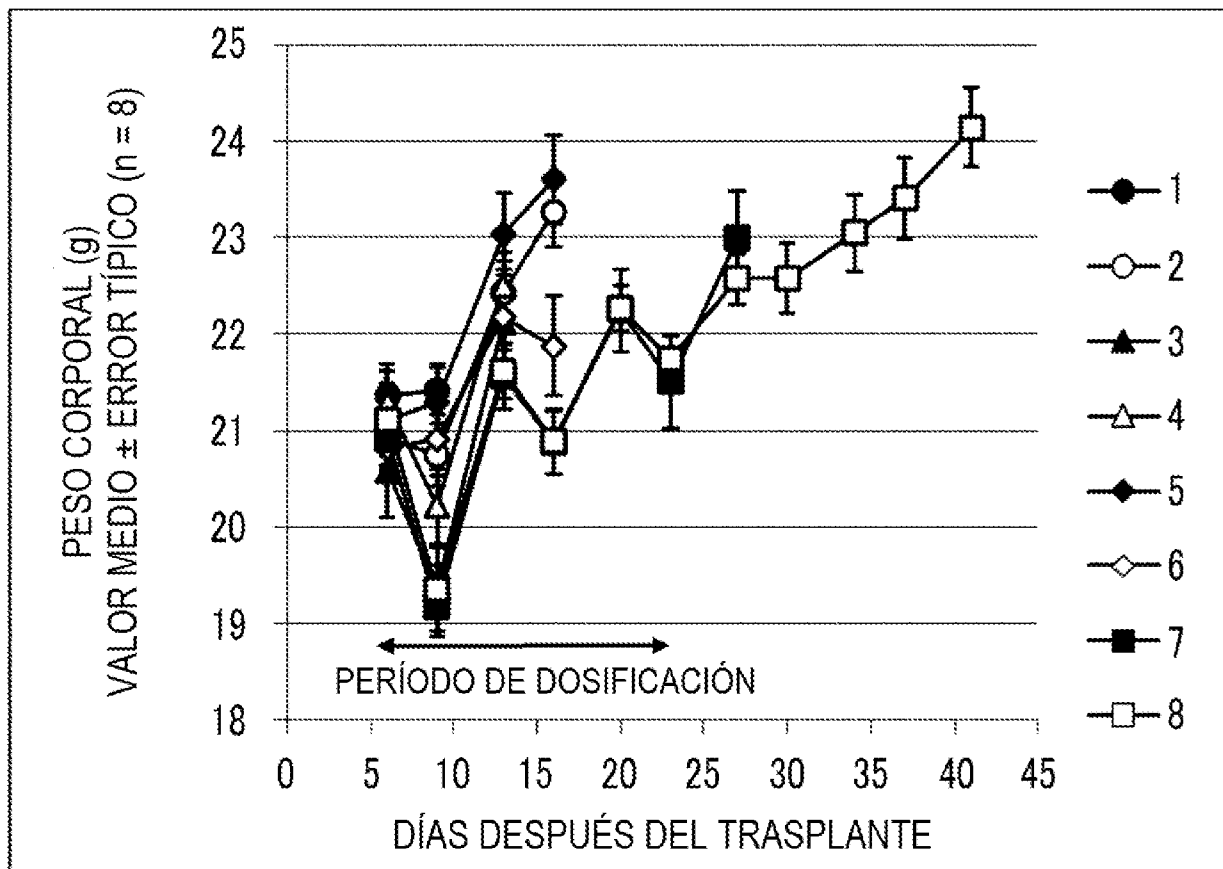


FIG. 2

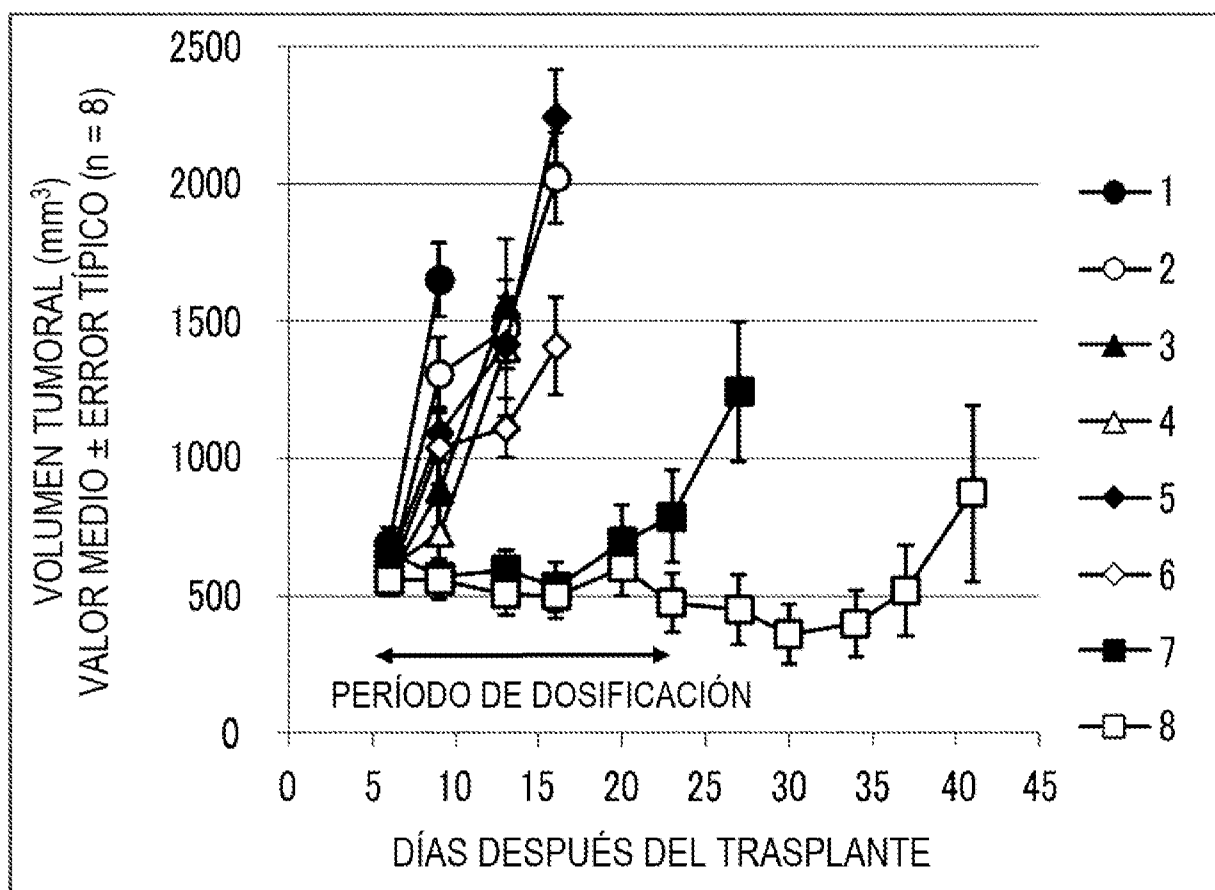


FIG. 3

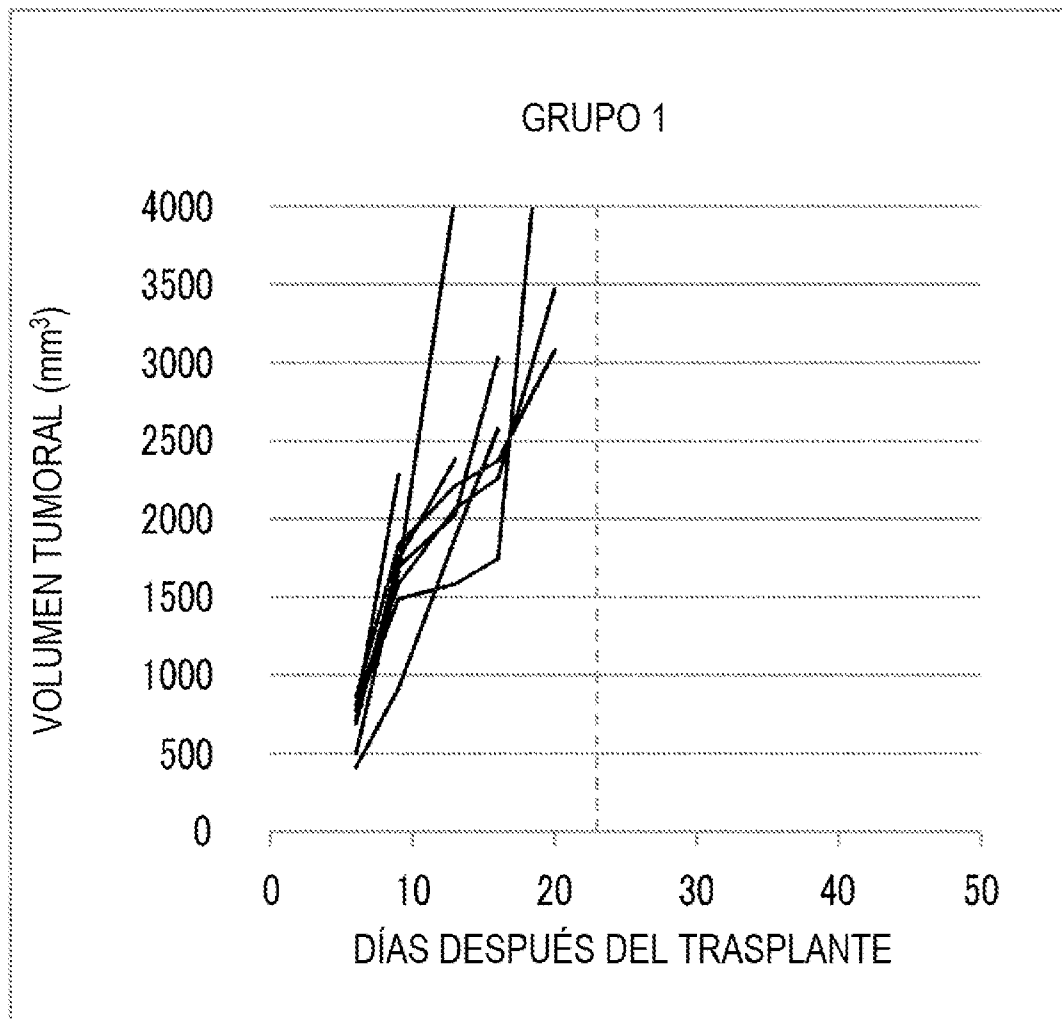


FIG. 4

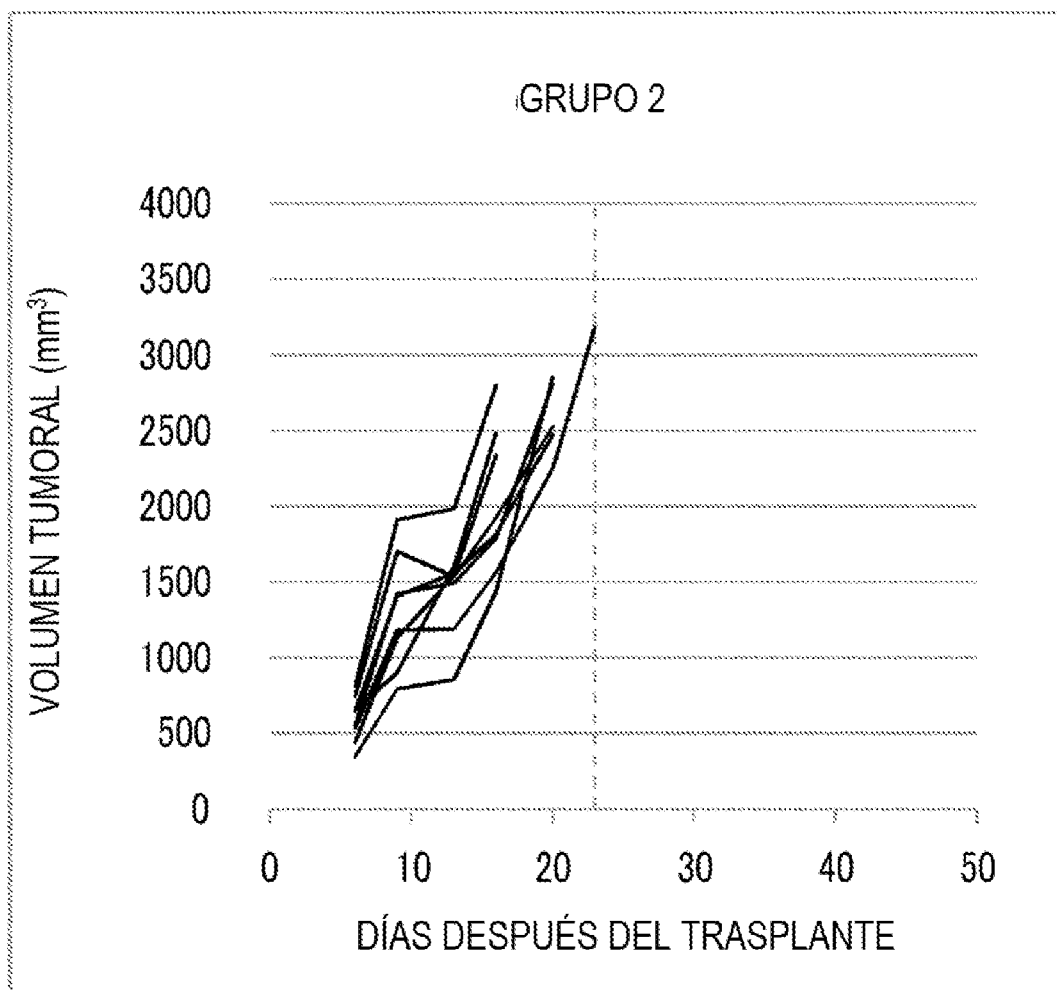


FIG. 5

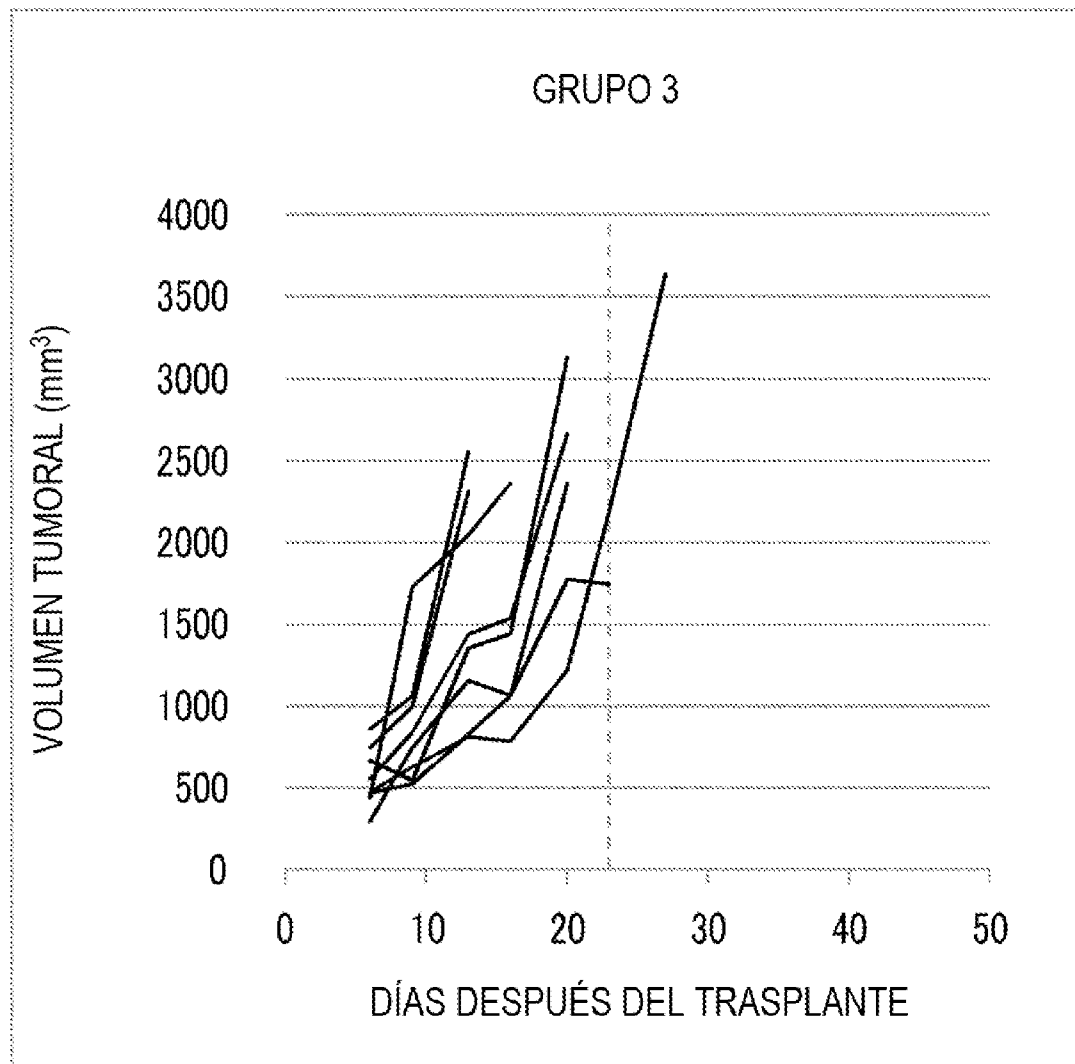


FIG. 6

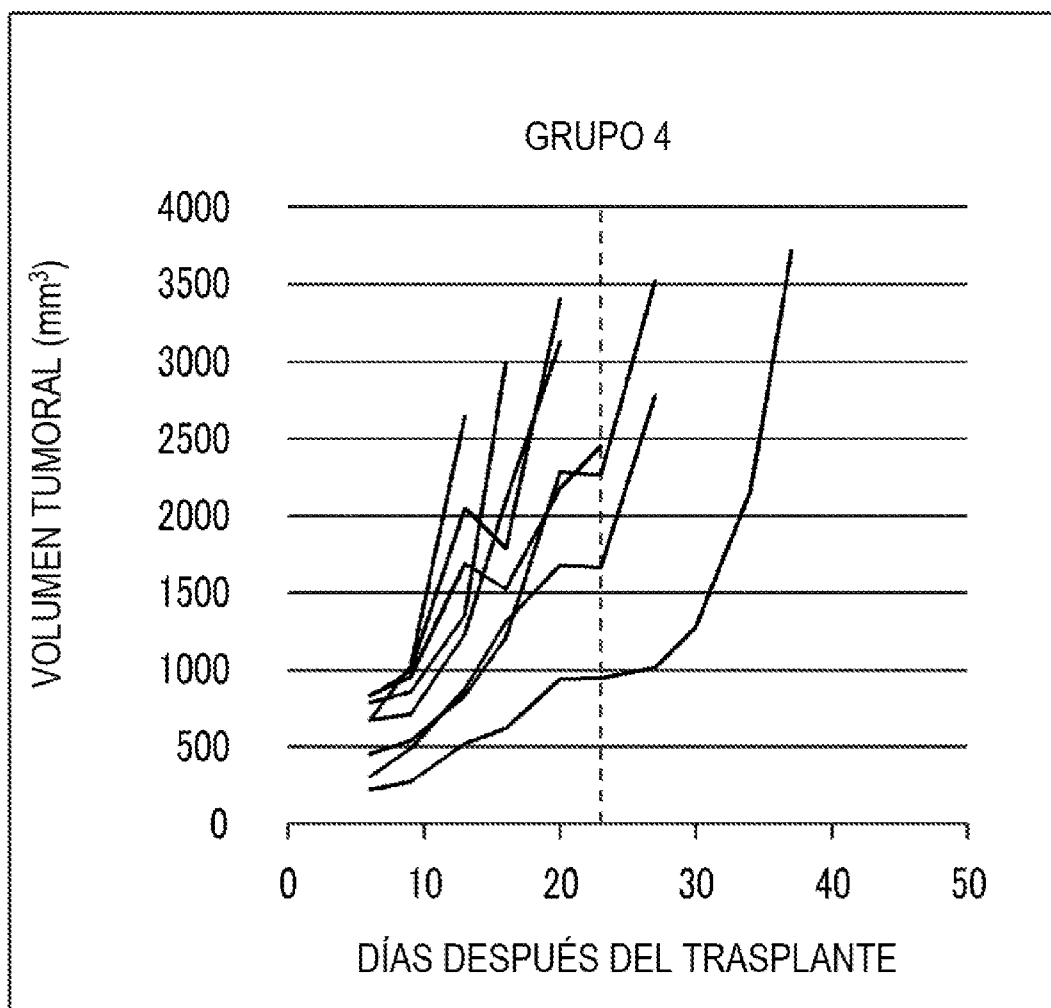


FIG. 7

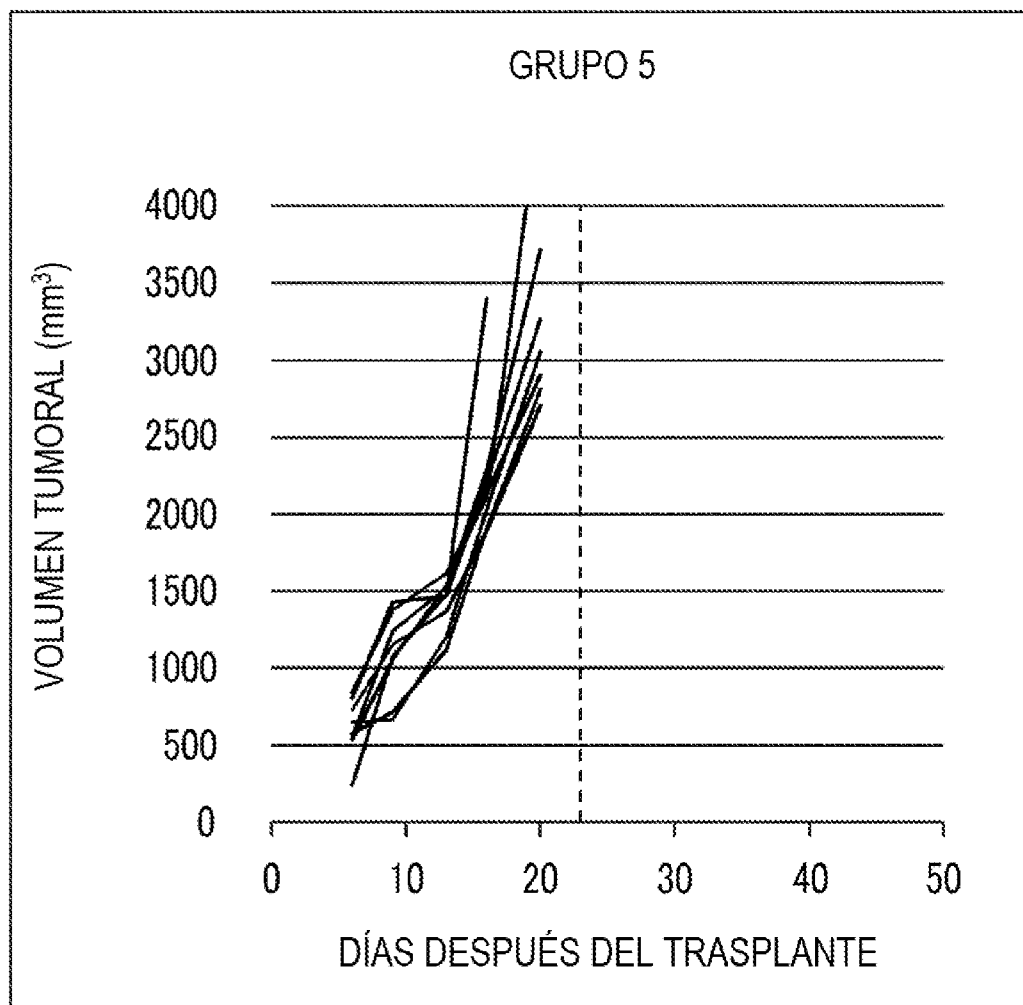


FIG. 8

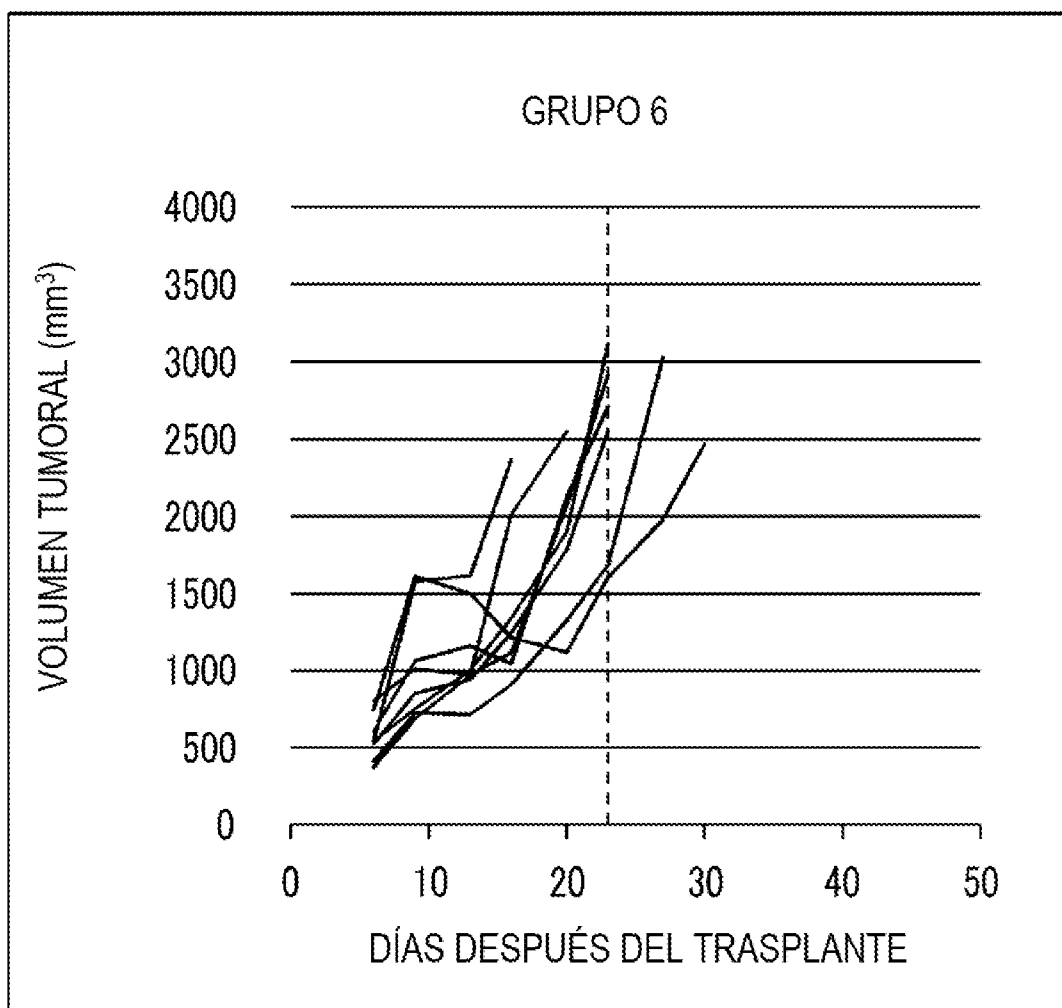


FIG. 9

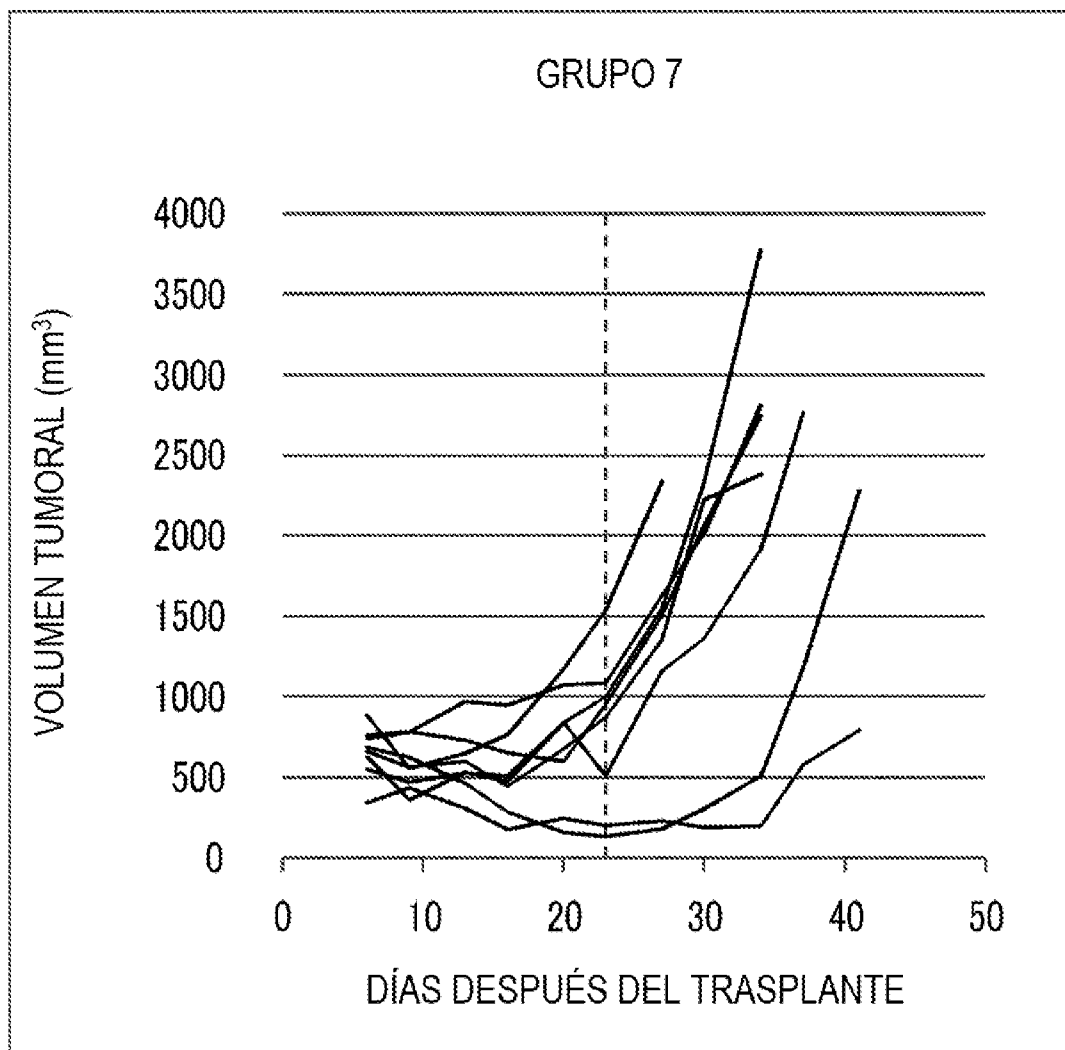


FIG. 10

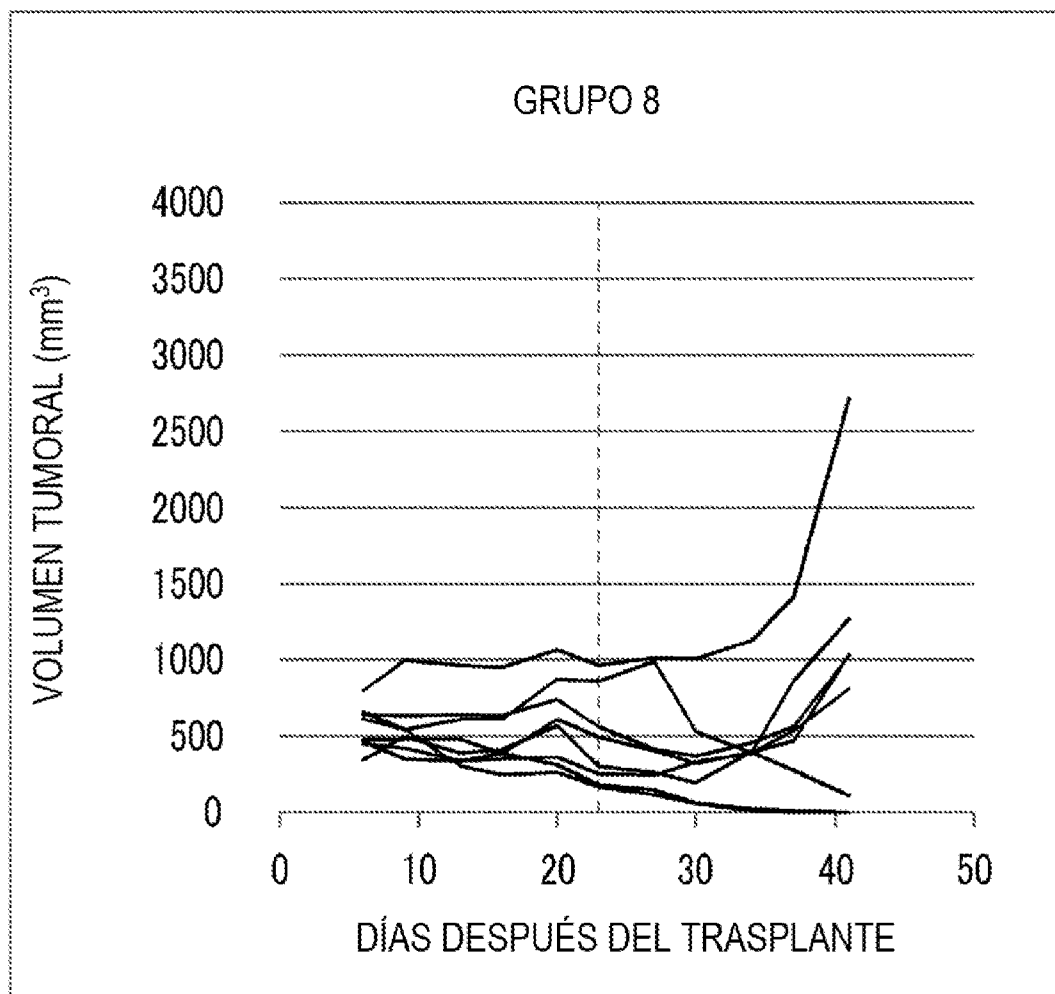


FIG. 11

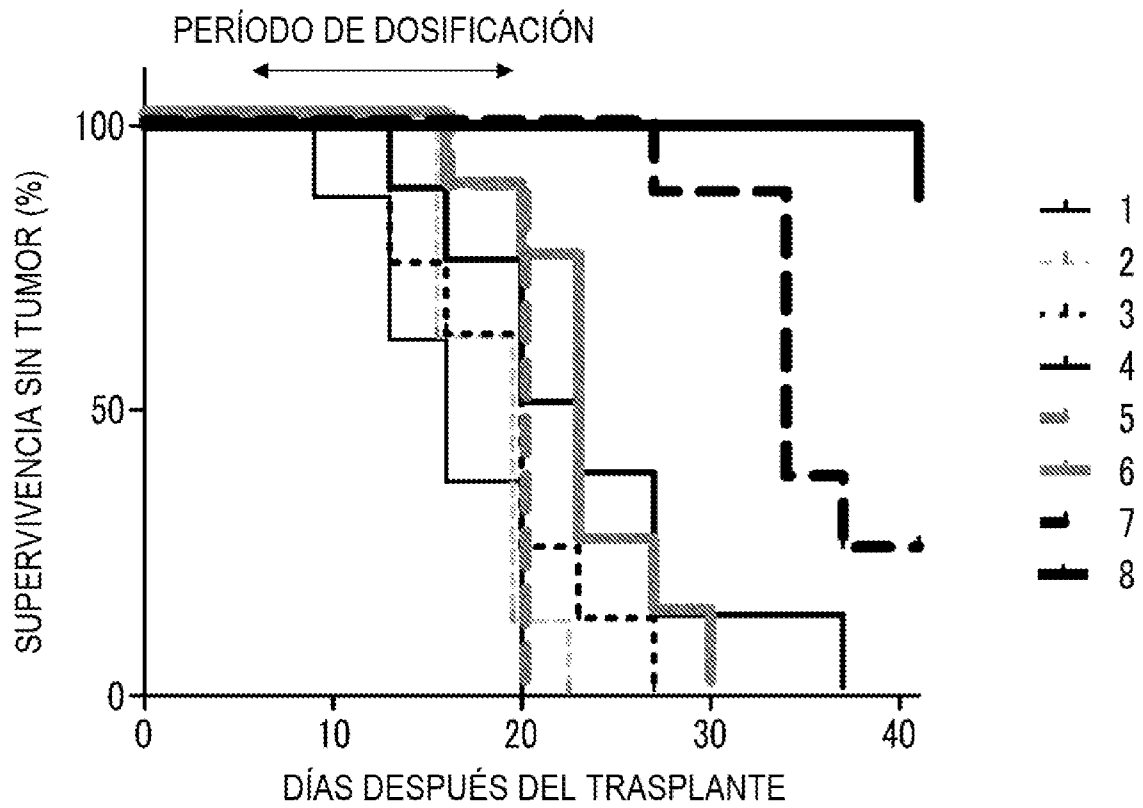


FIG. 12

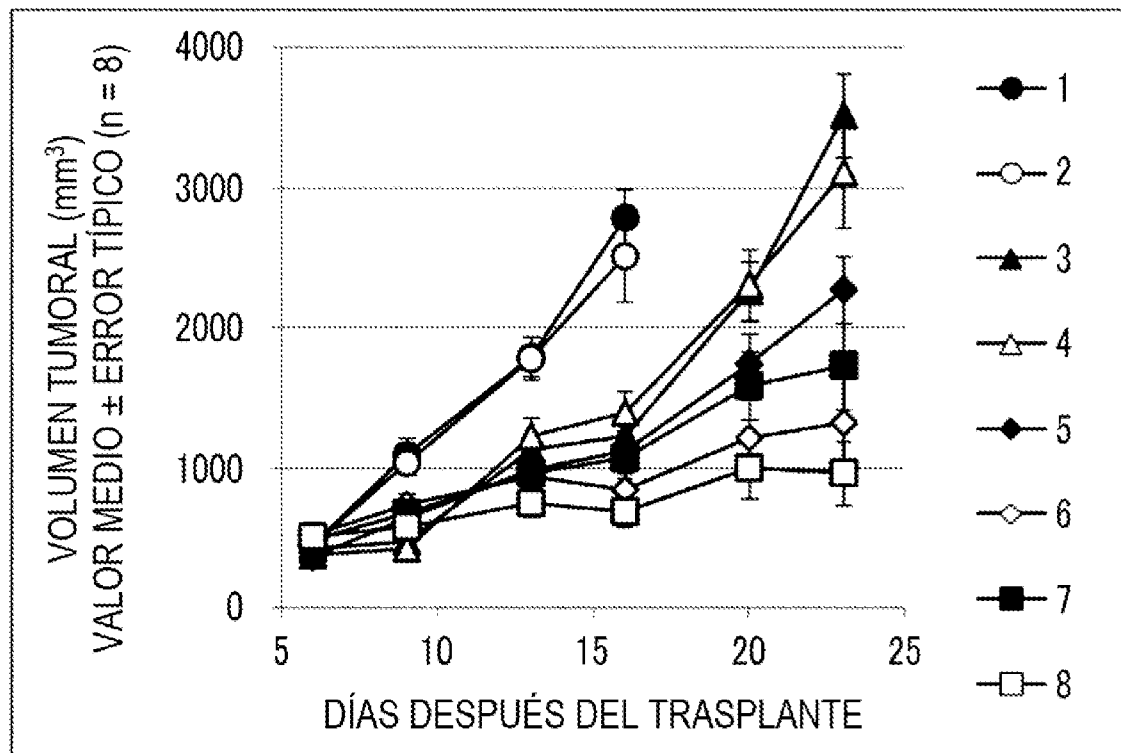


FIG. 13

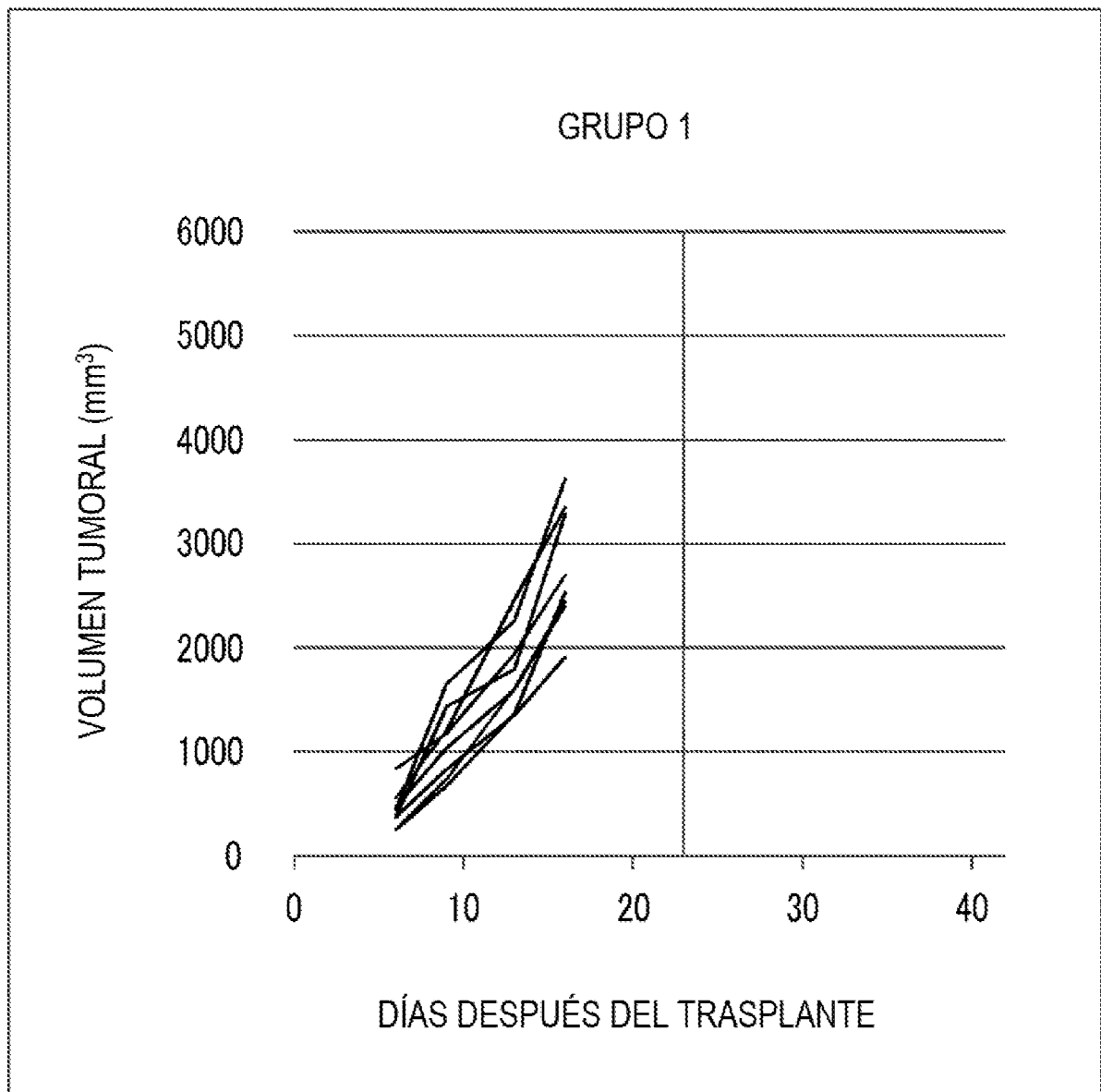


FIG. 14

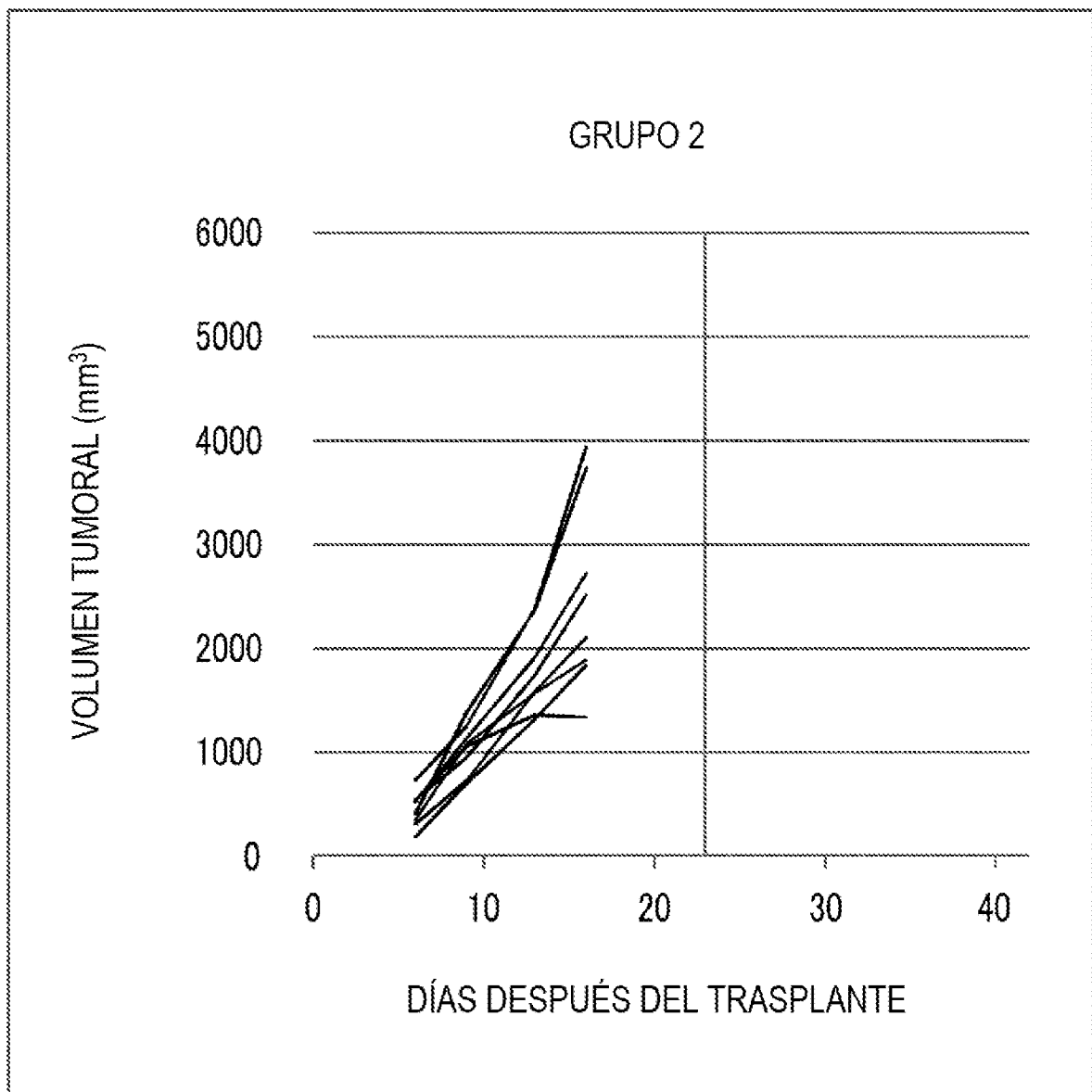


FIG. 15

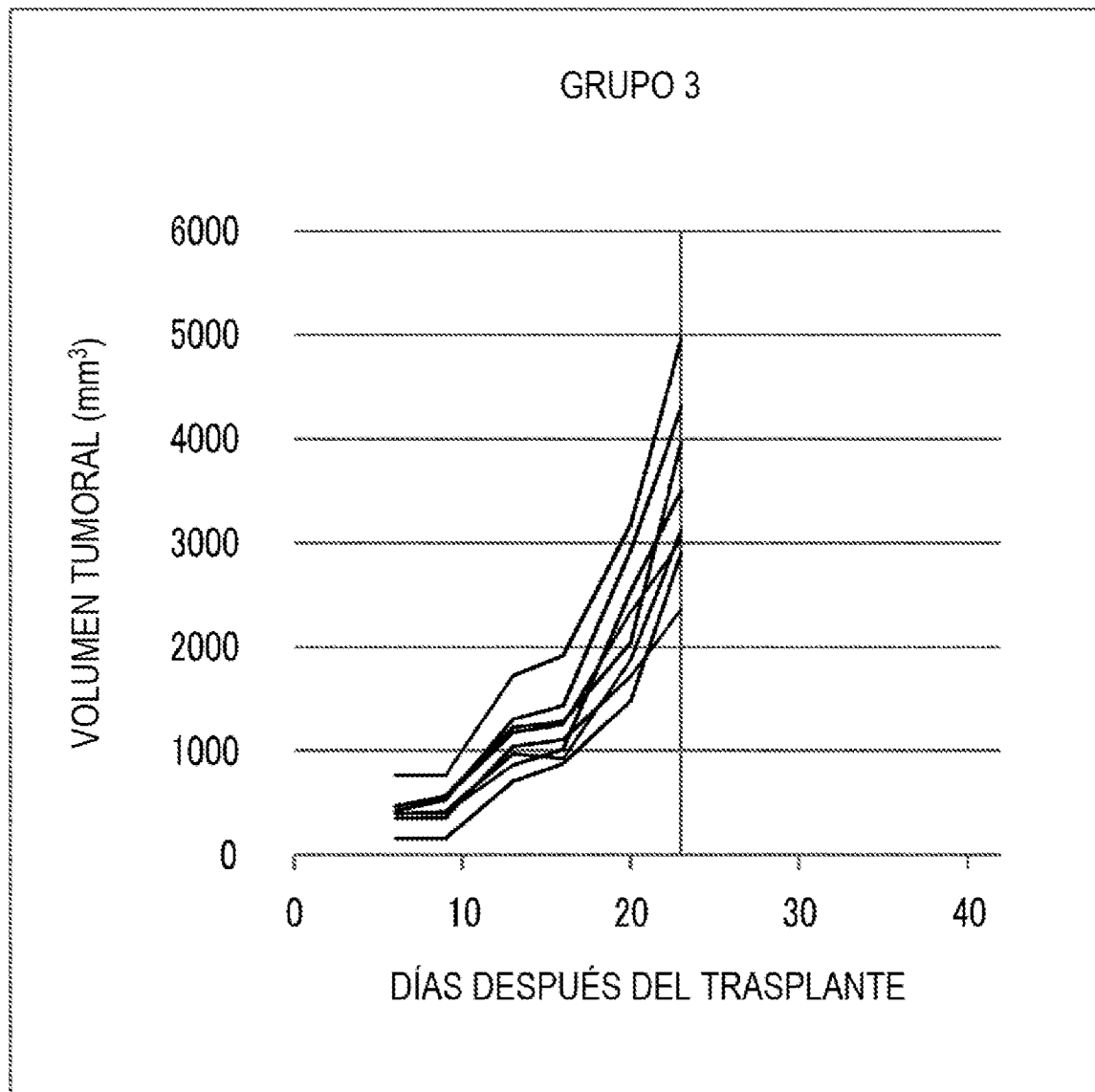


FIG. 16

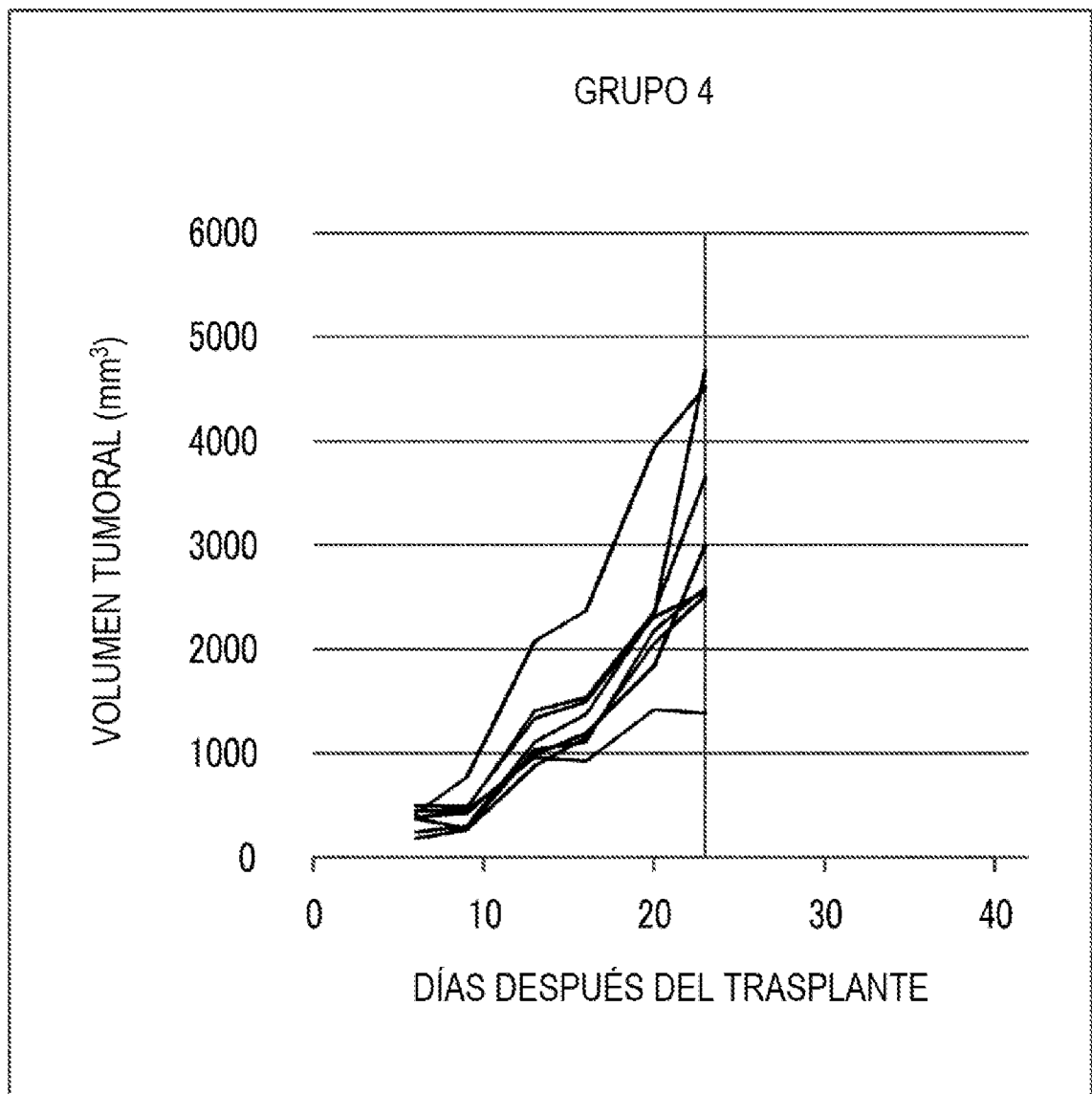


FIG. 17

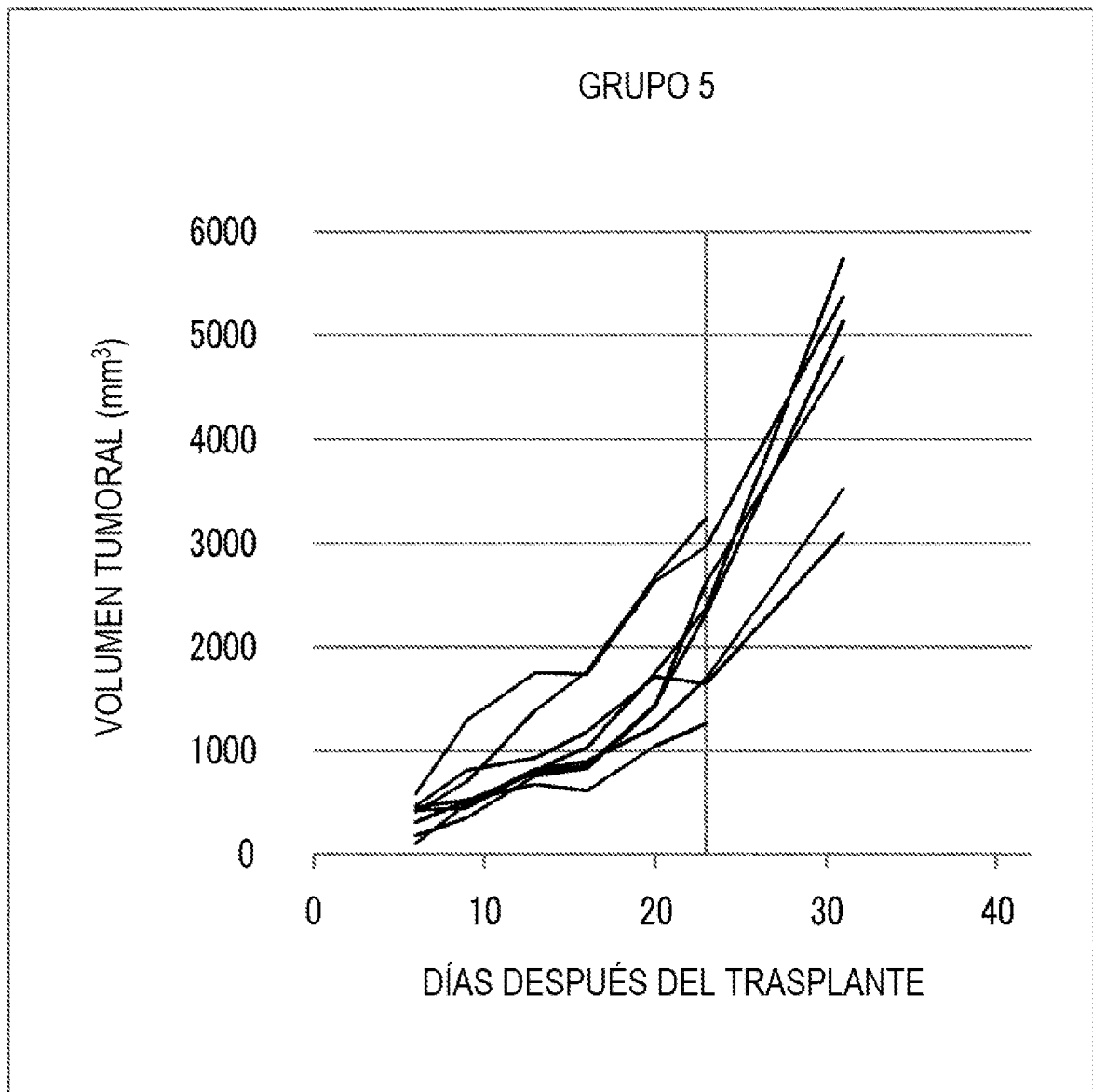


FIG. 18

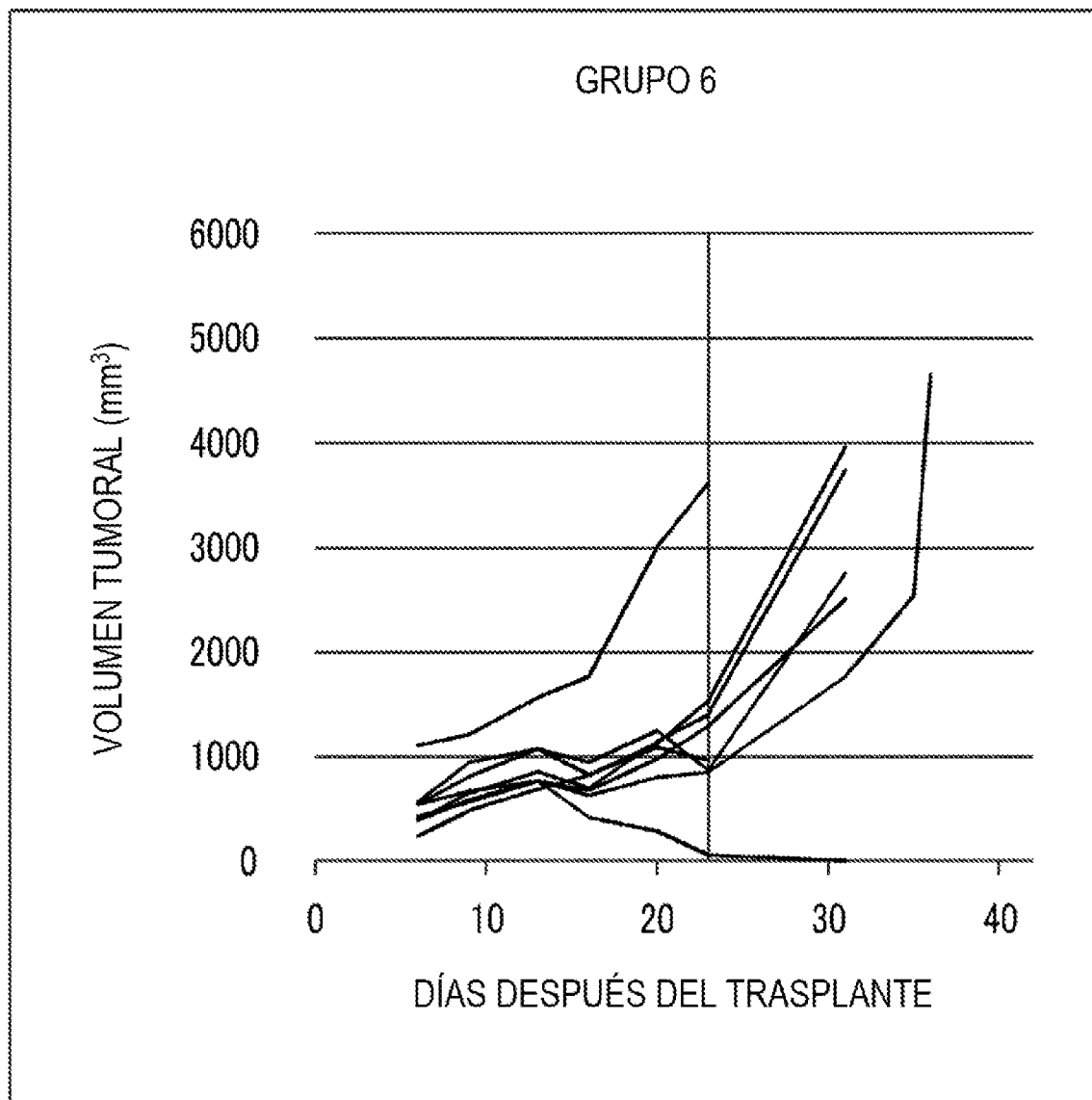


FIG. 19

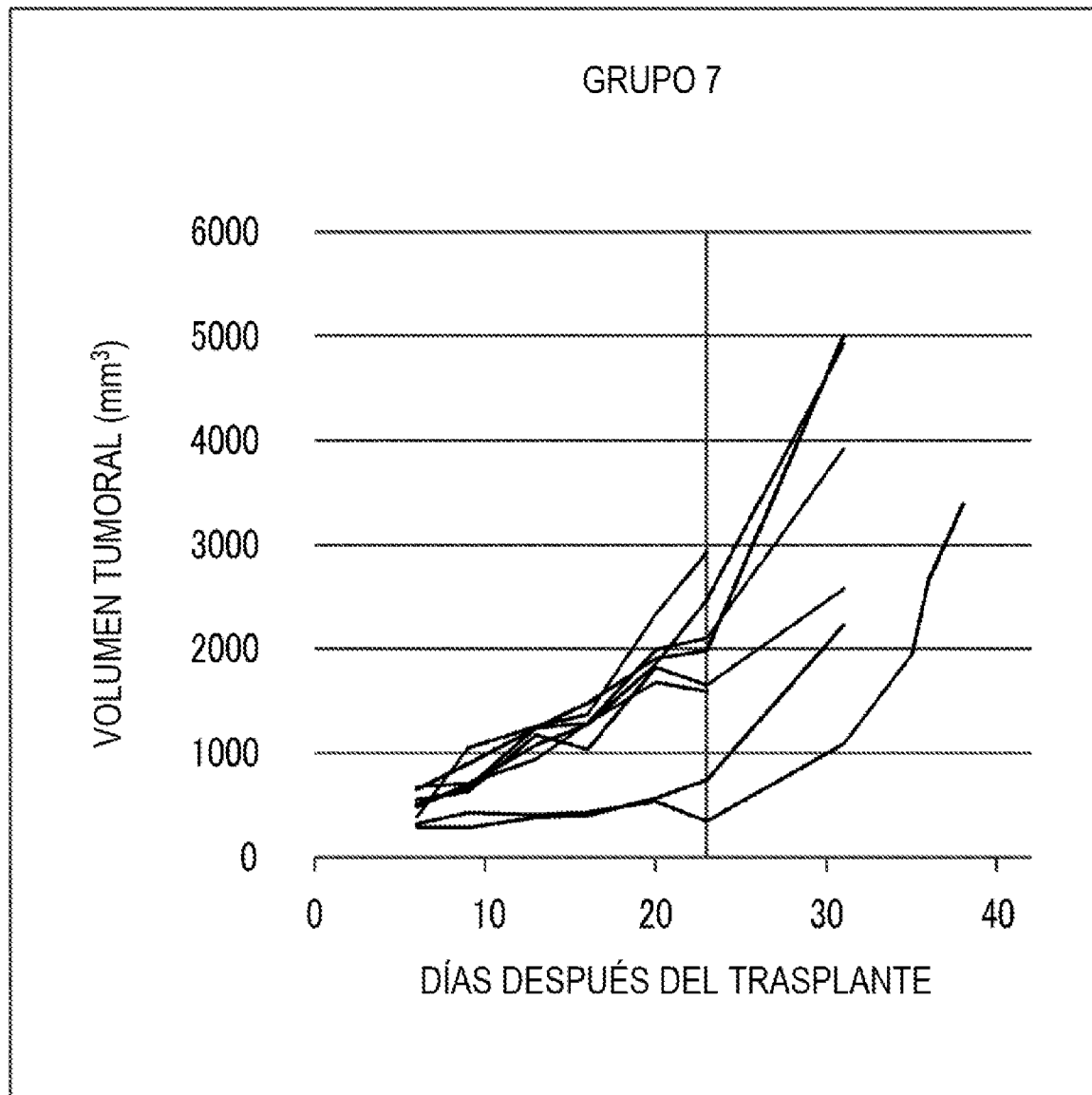


FIG. 20

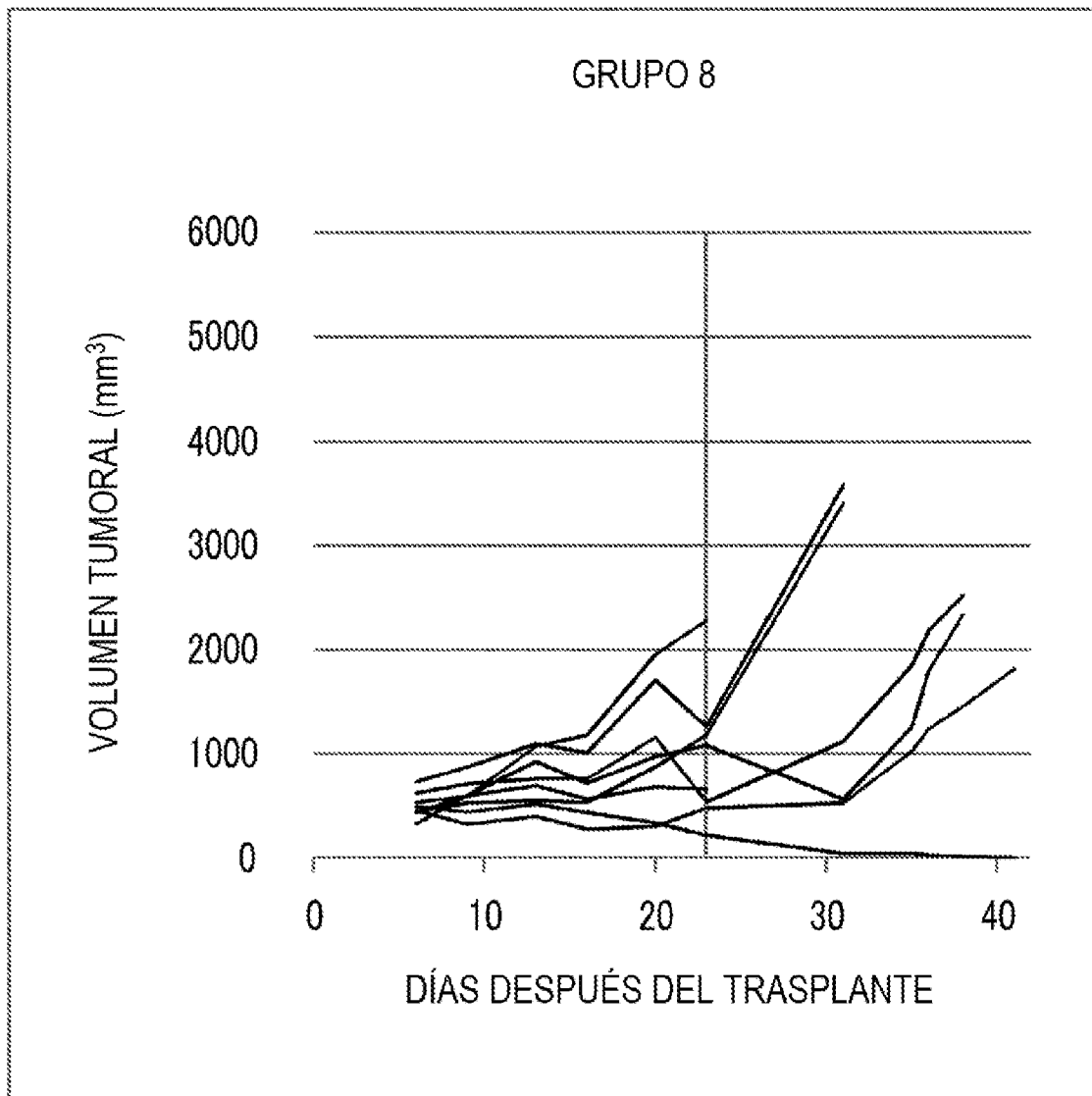


FIG. 21

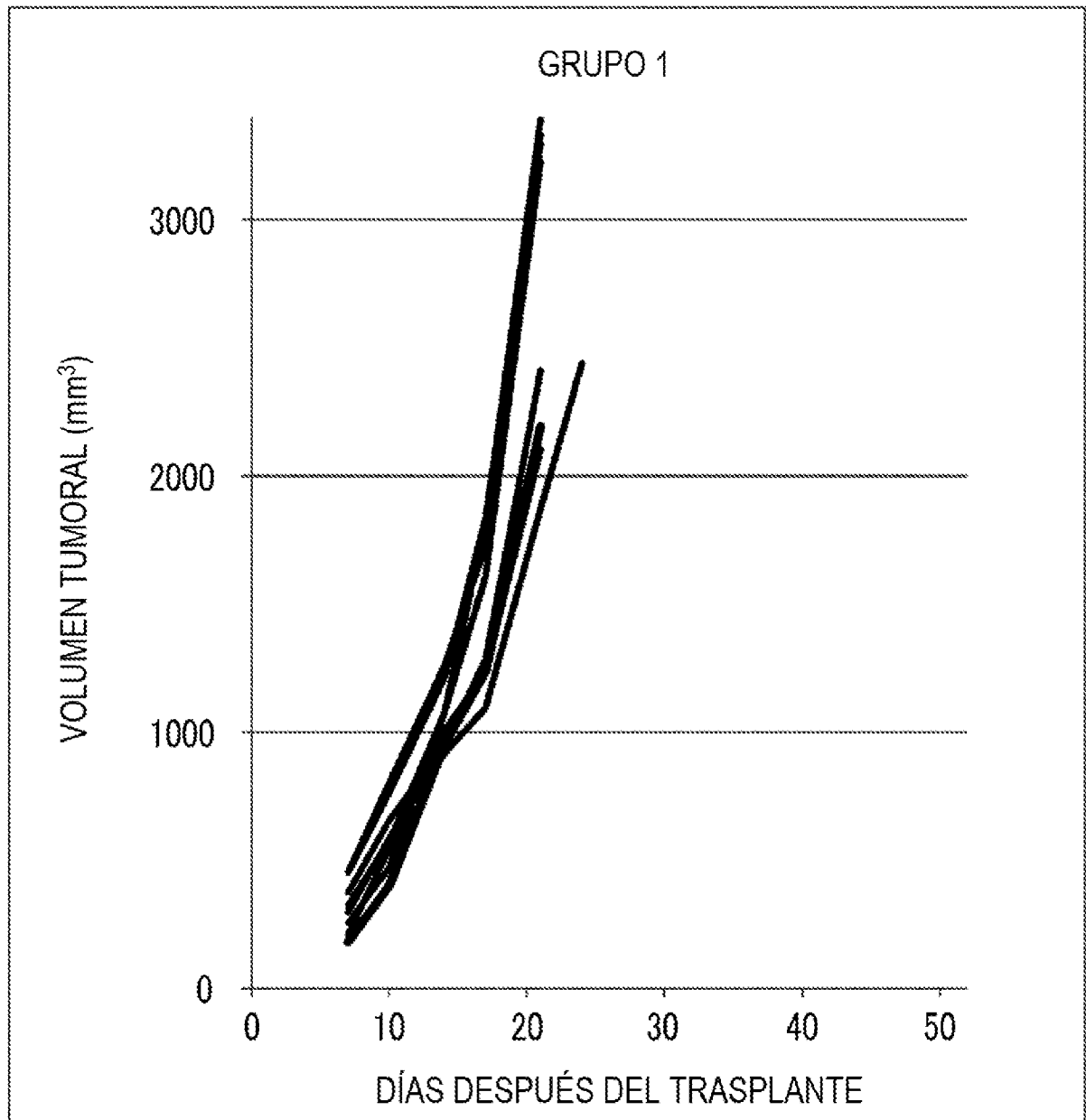


FIG. 22

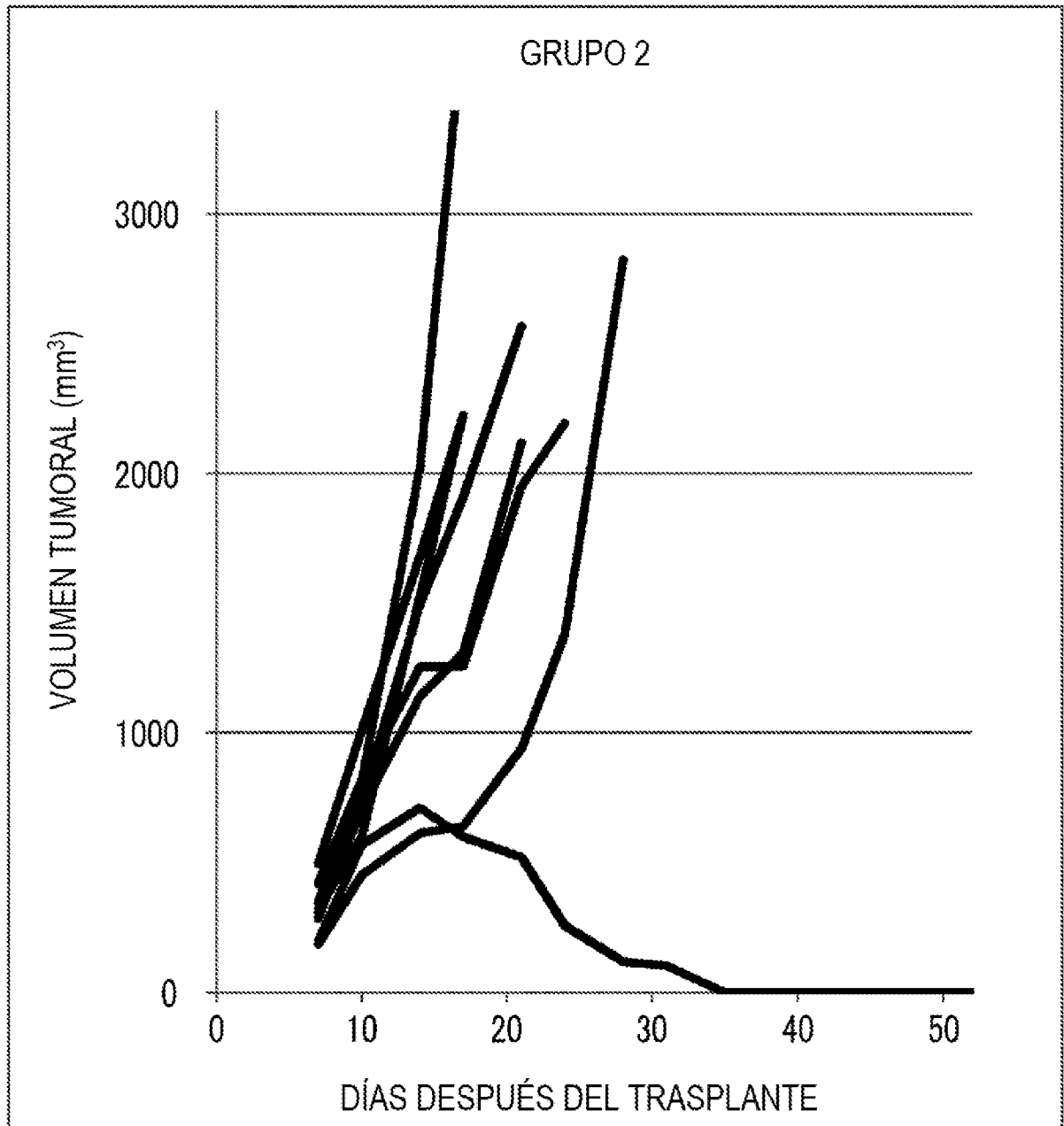


FIG. 23

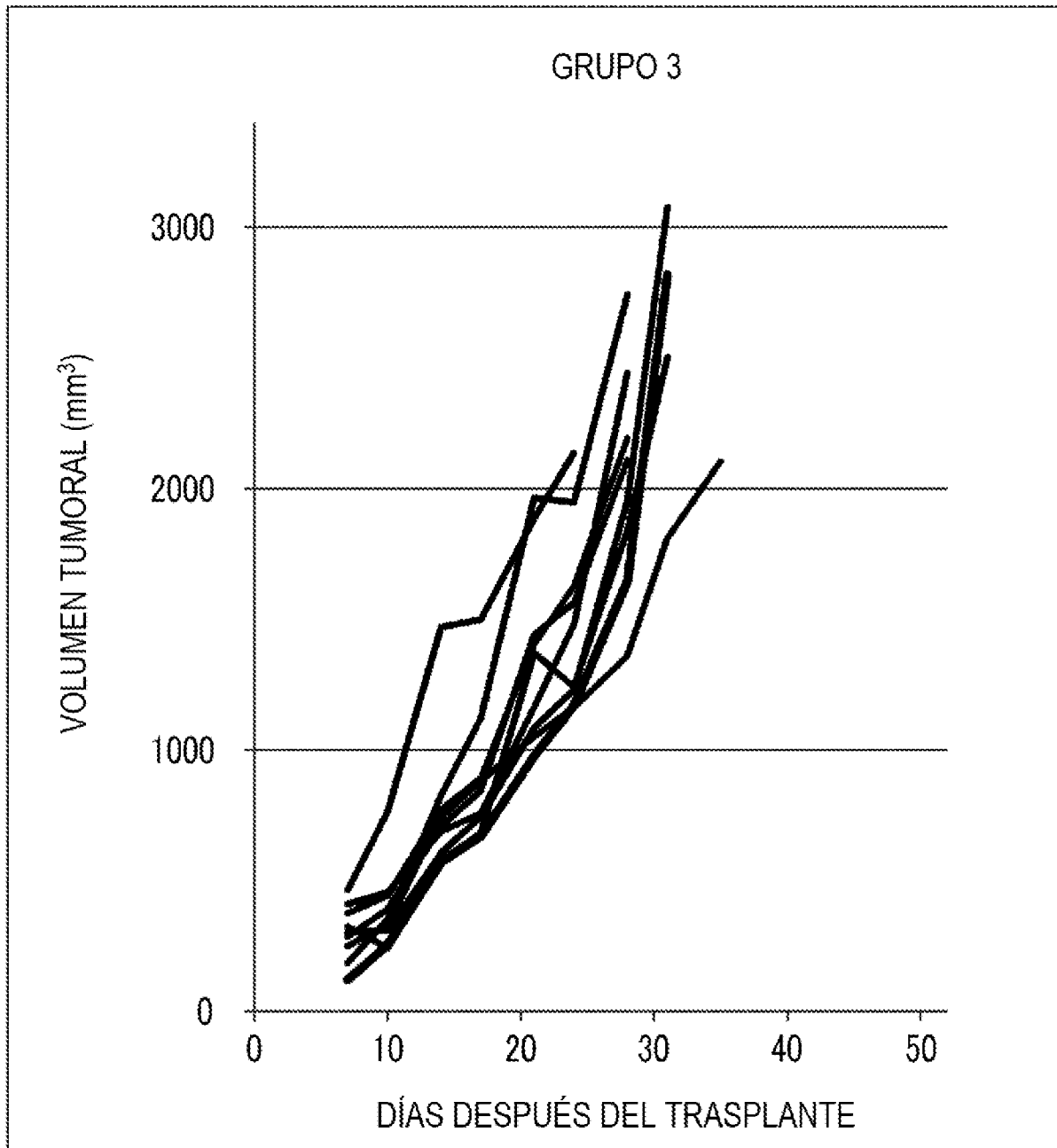


FIG. 24

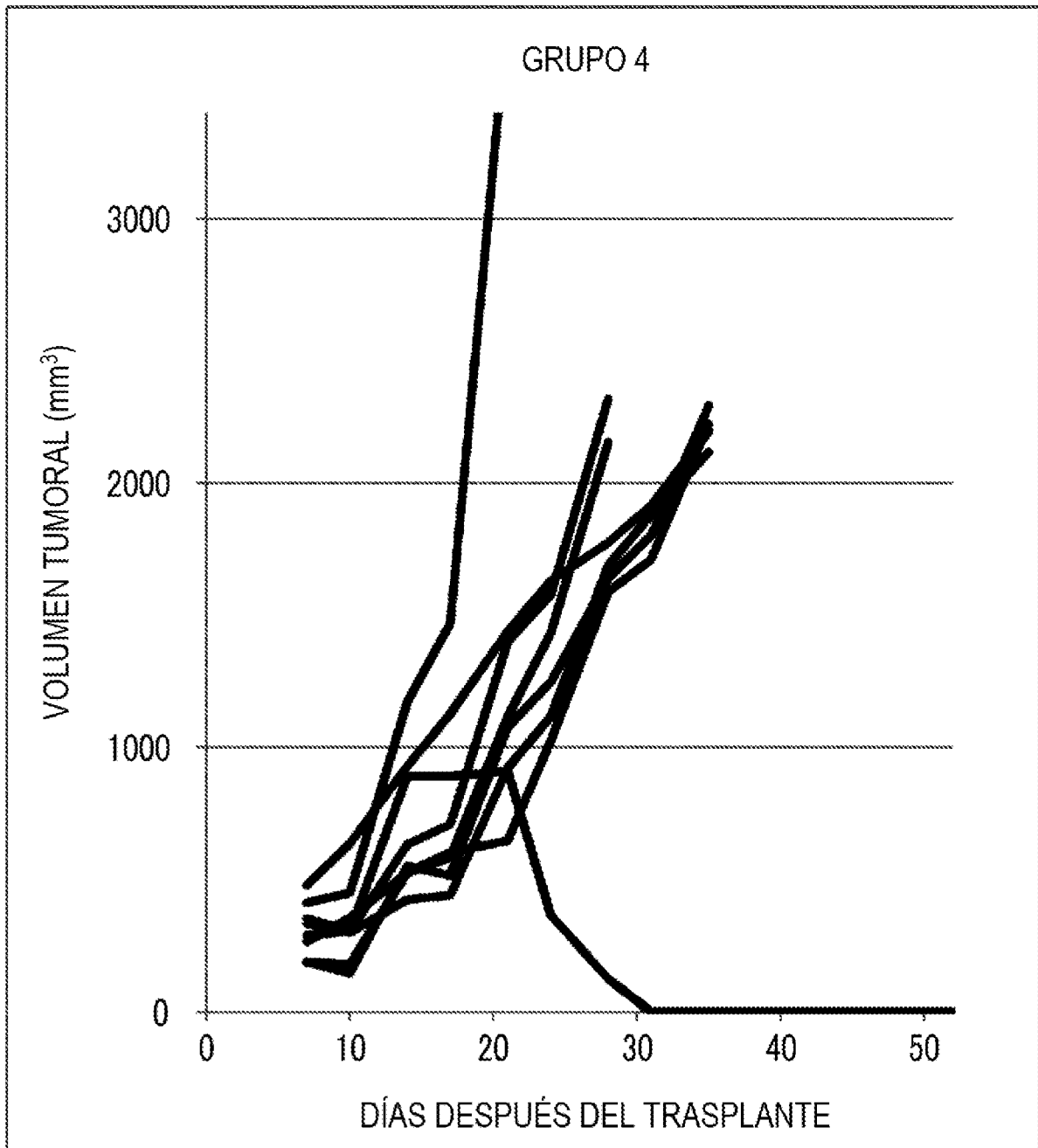


FIG. 25

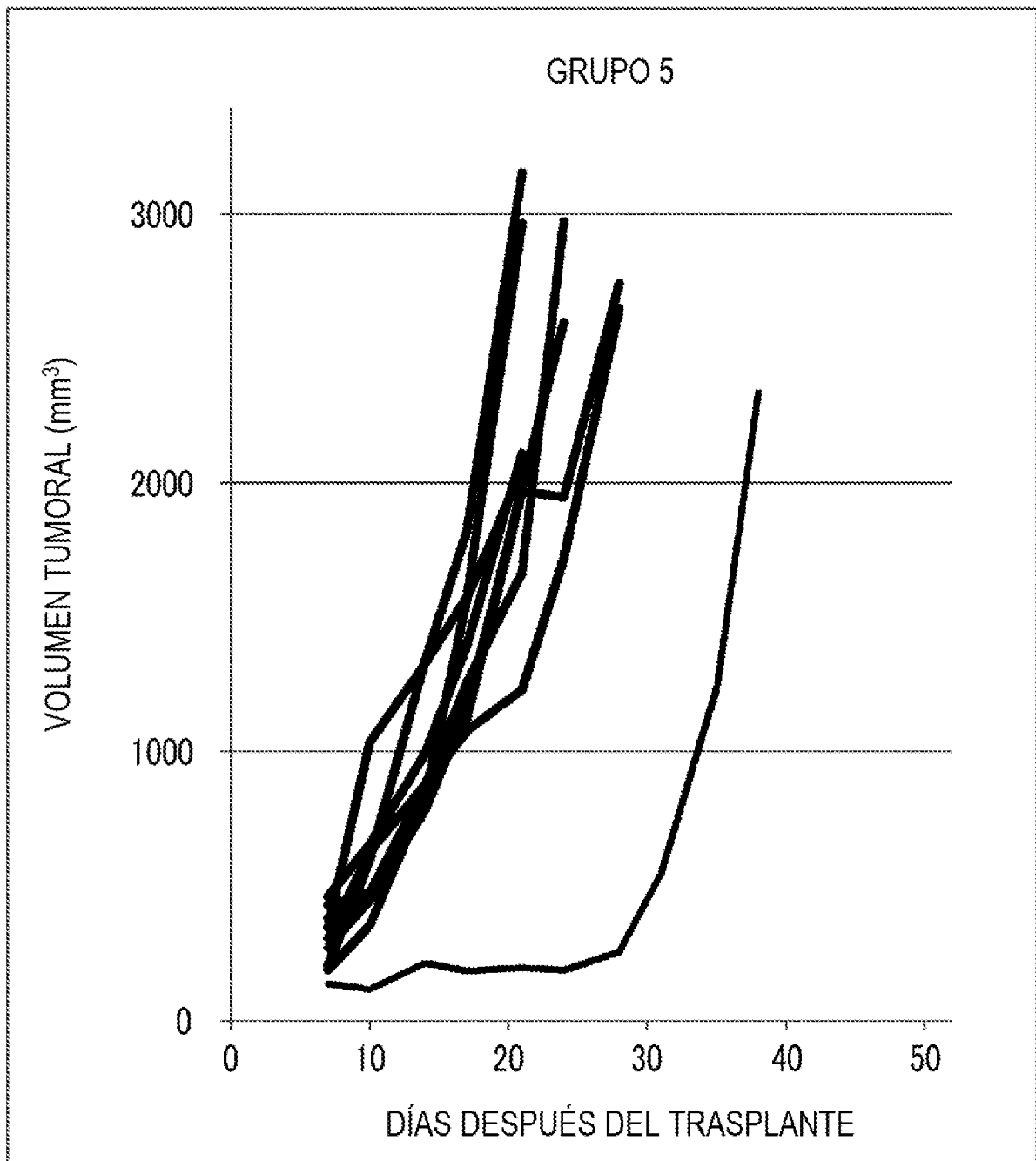


FIG. 26

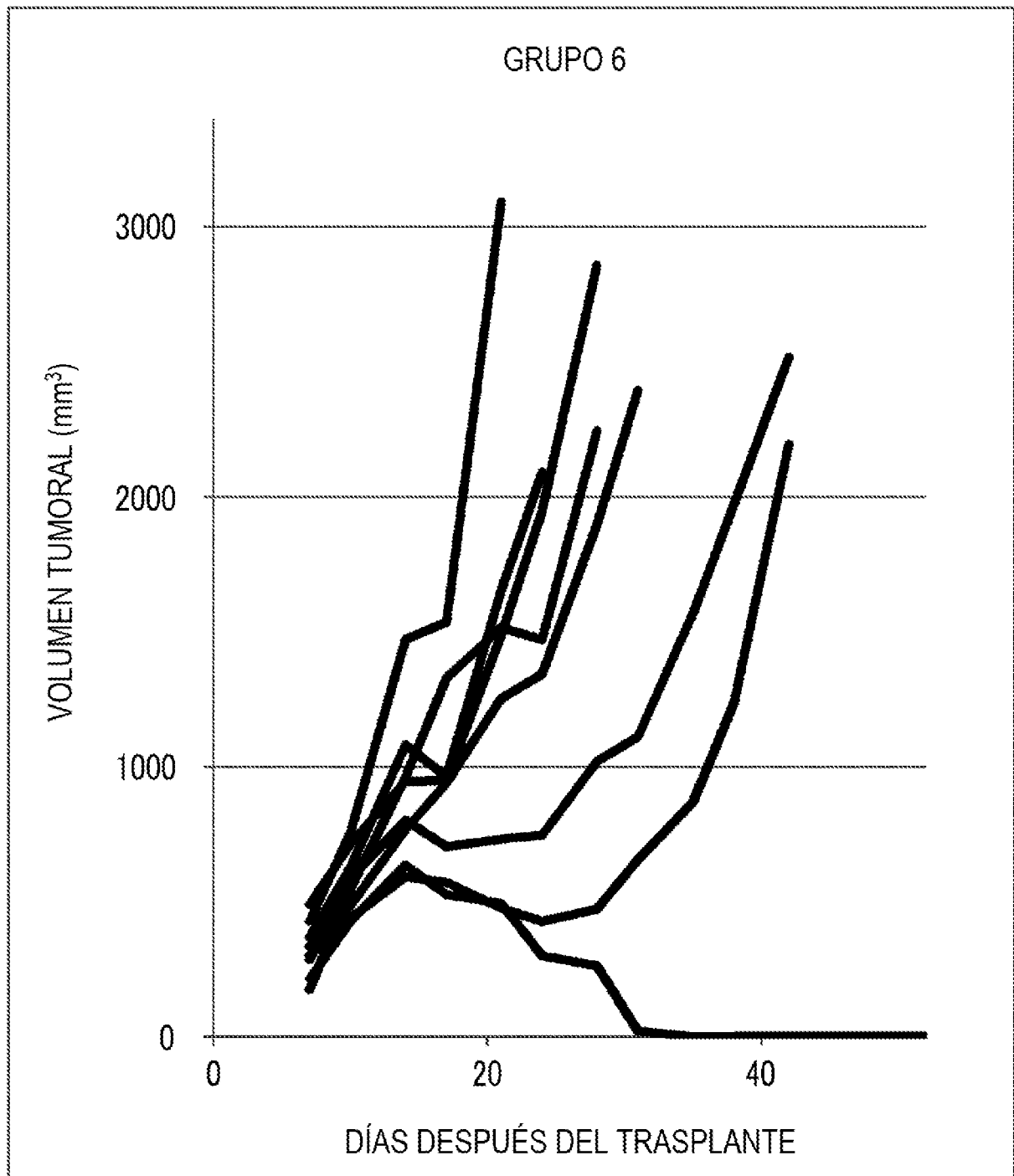


FIG. 27

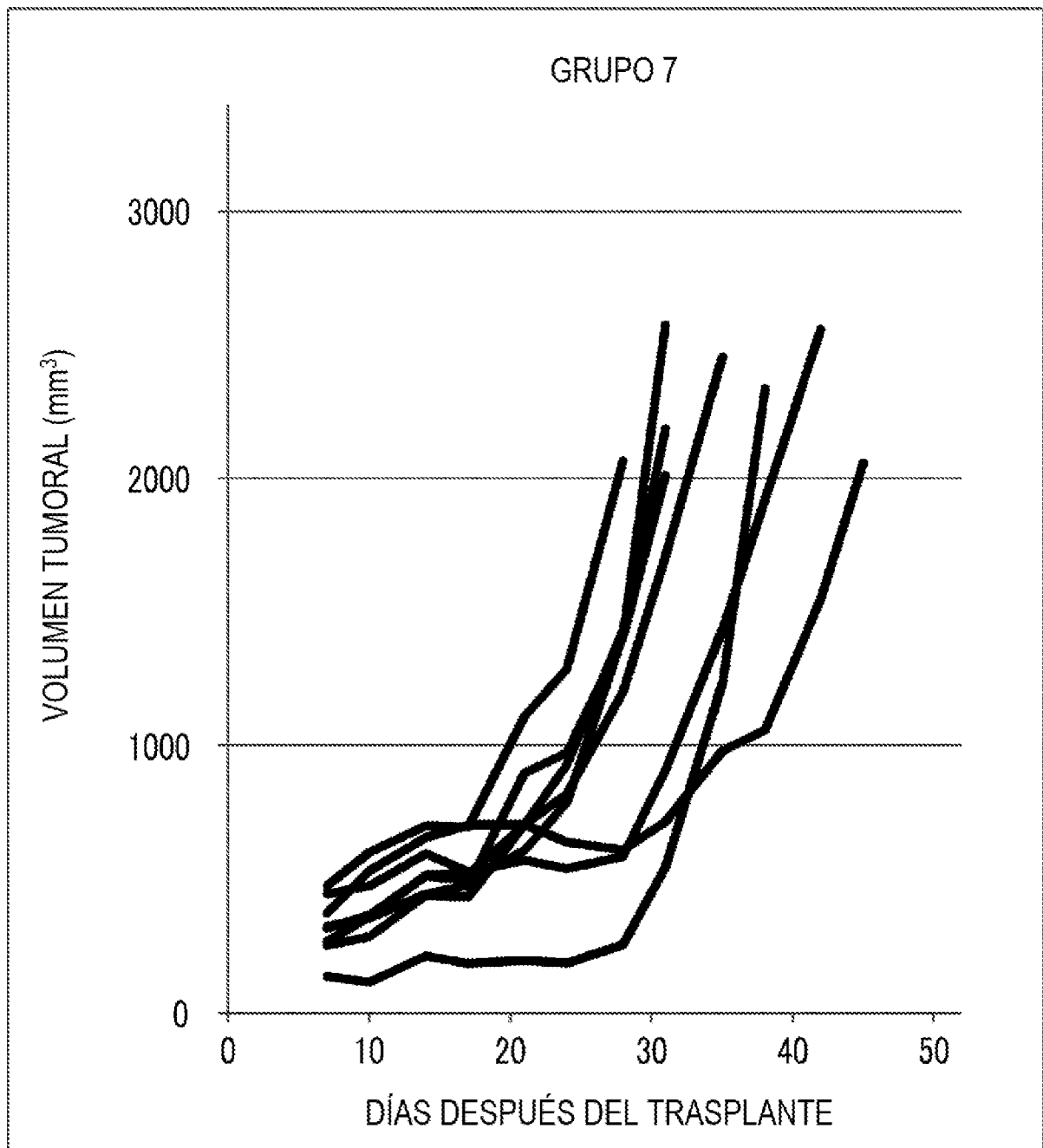


FIG. 28

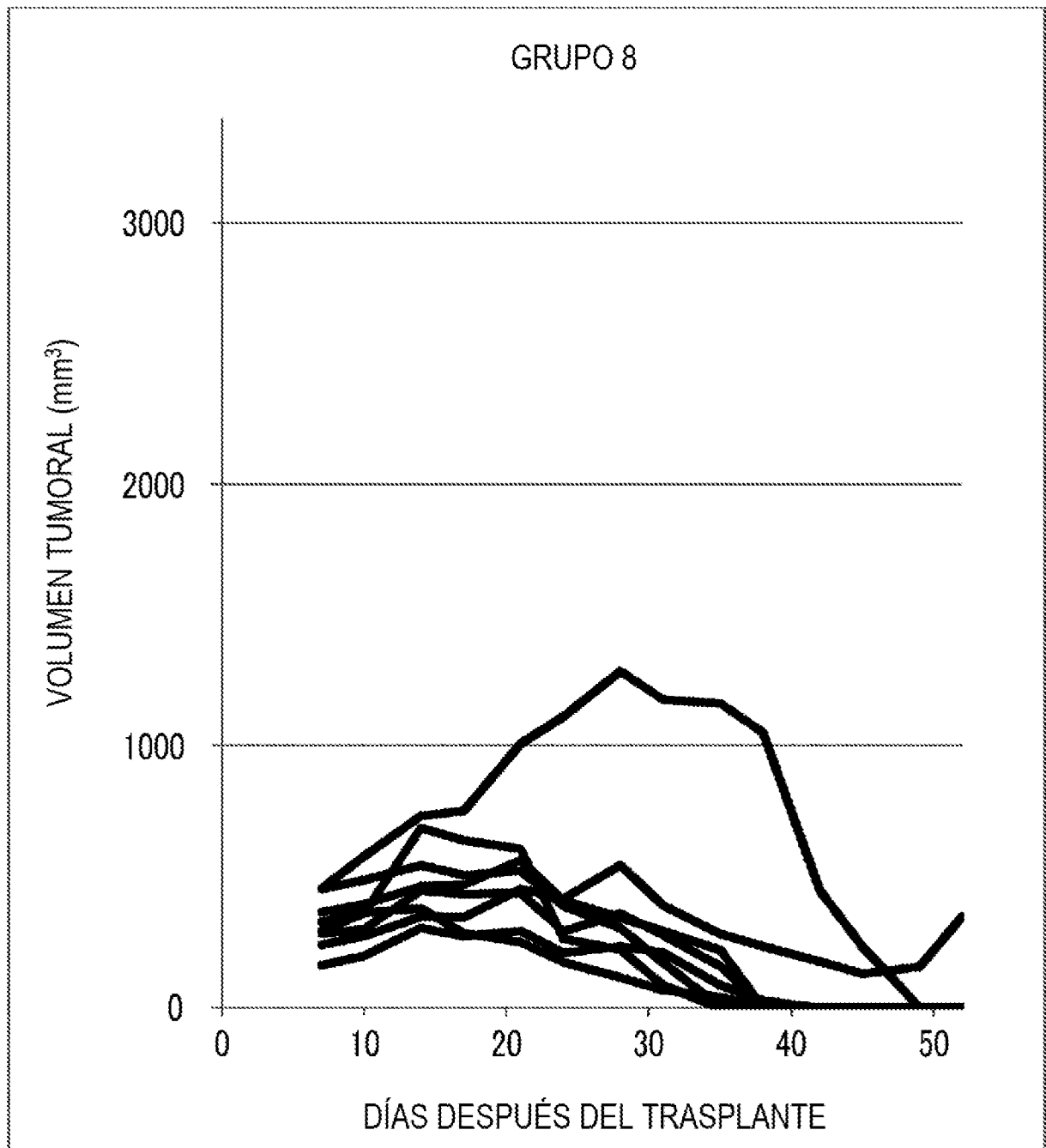


FIG. 29

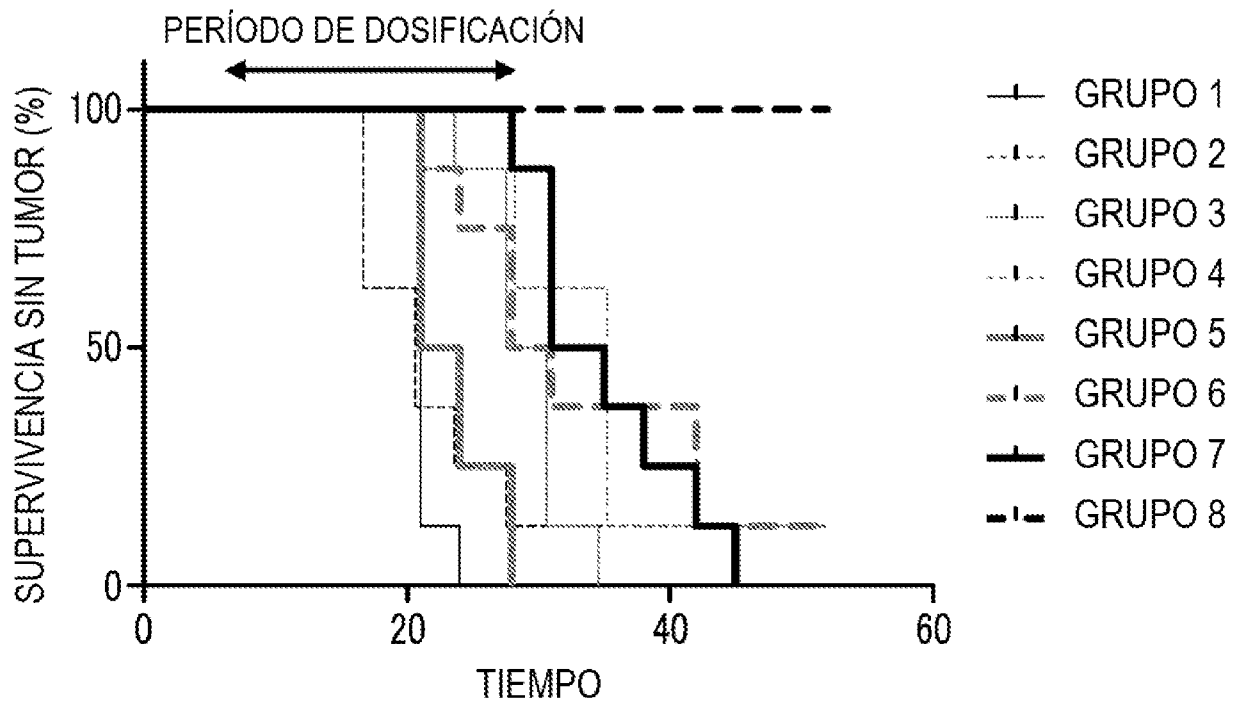


FIG. 30

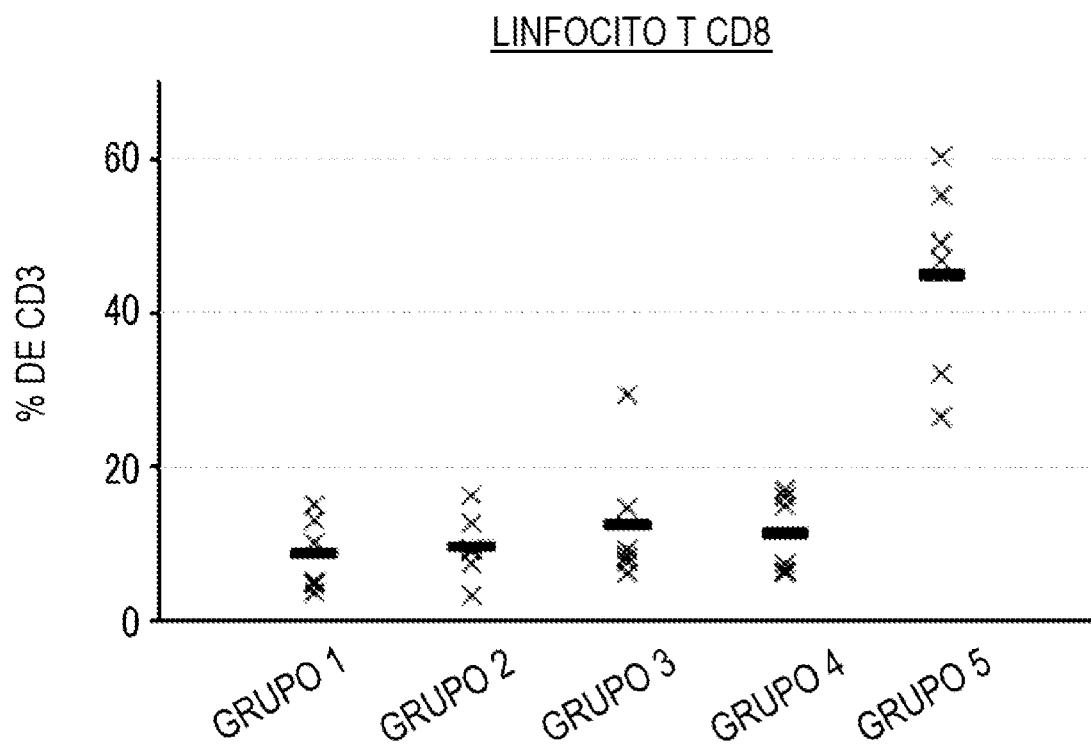


FIG. 31

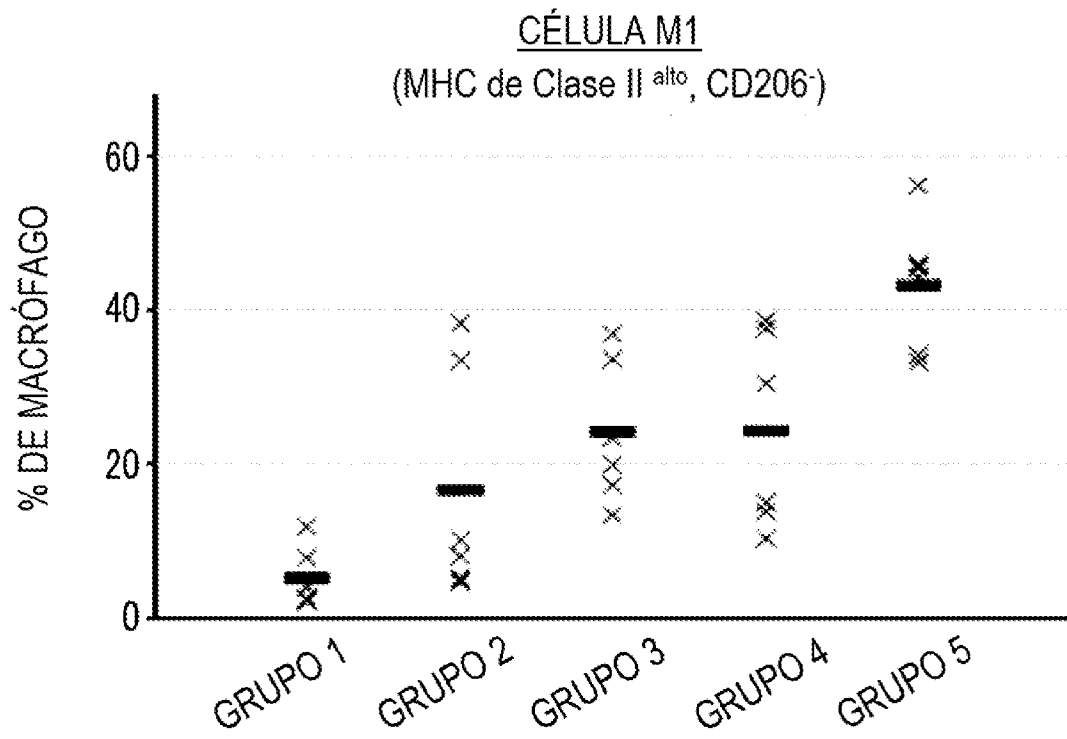


FIG. 32

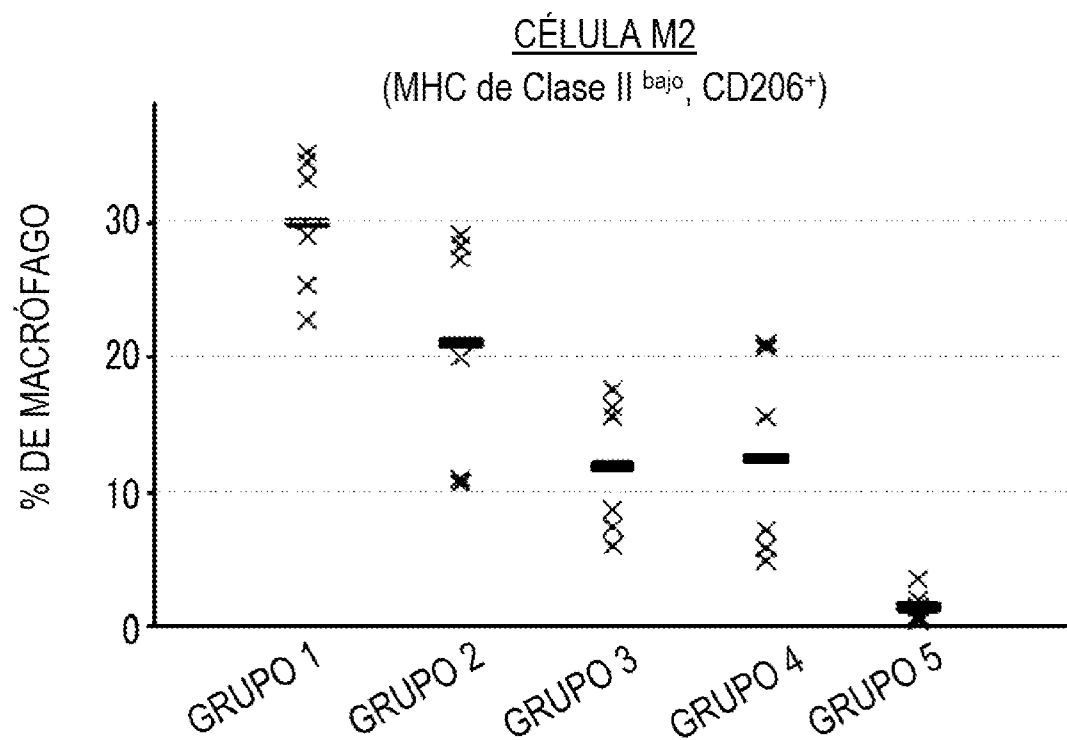


FIG. 33

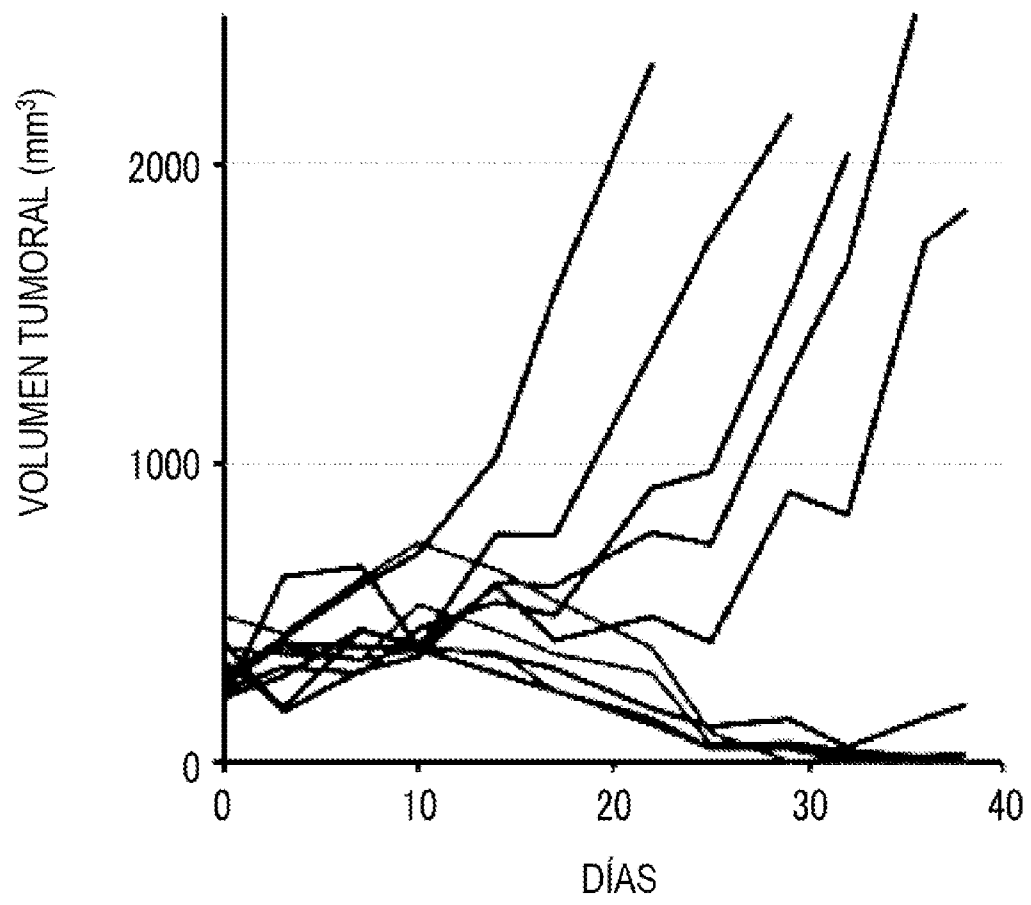


FIG. 34

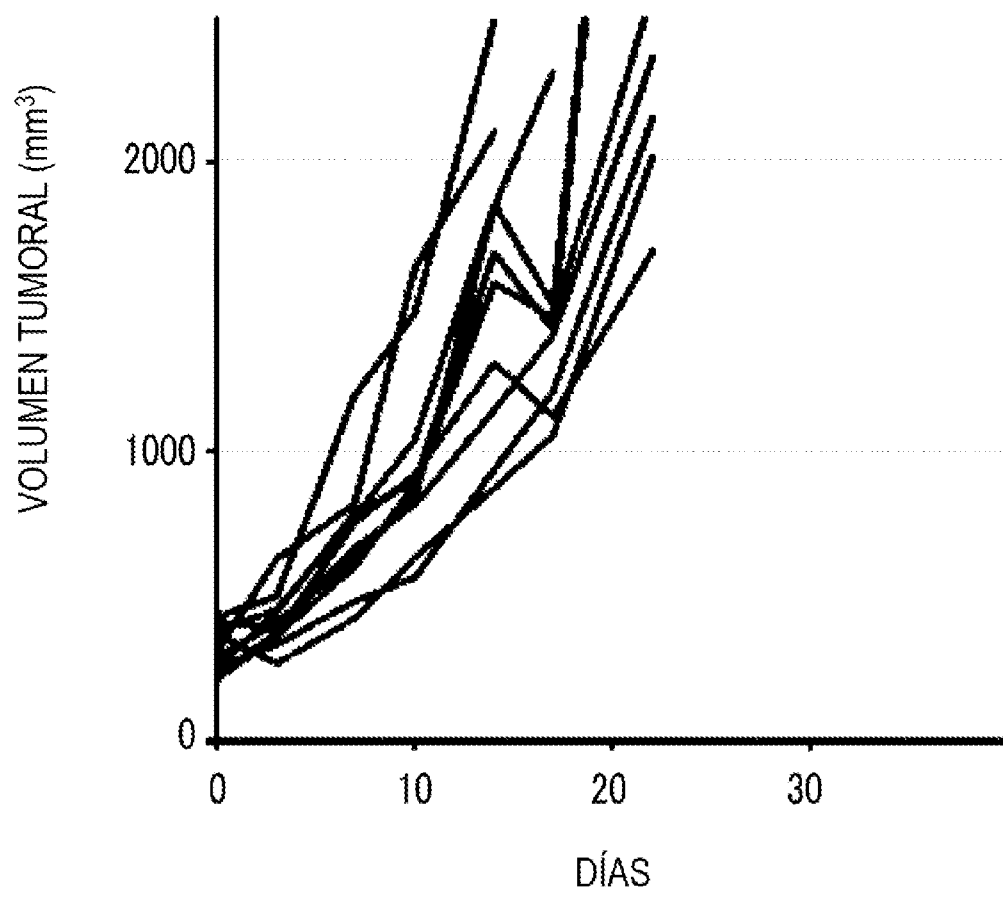


FIG. 35

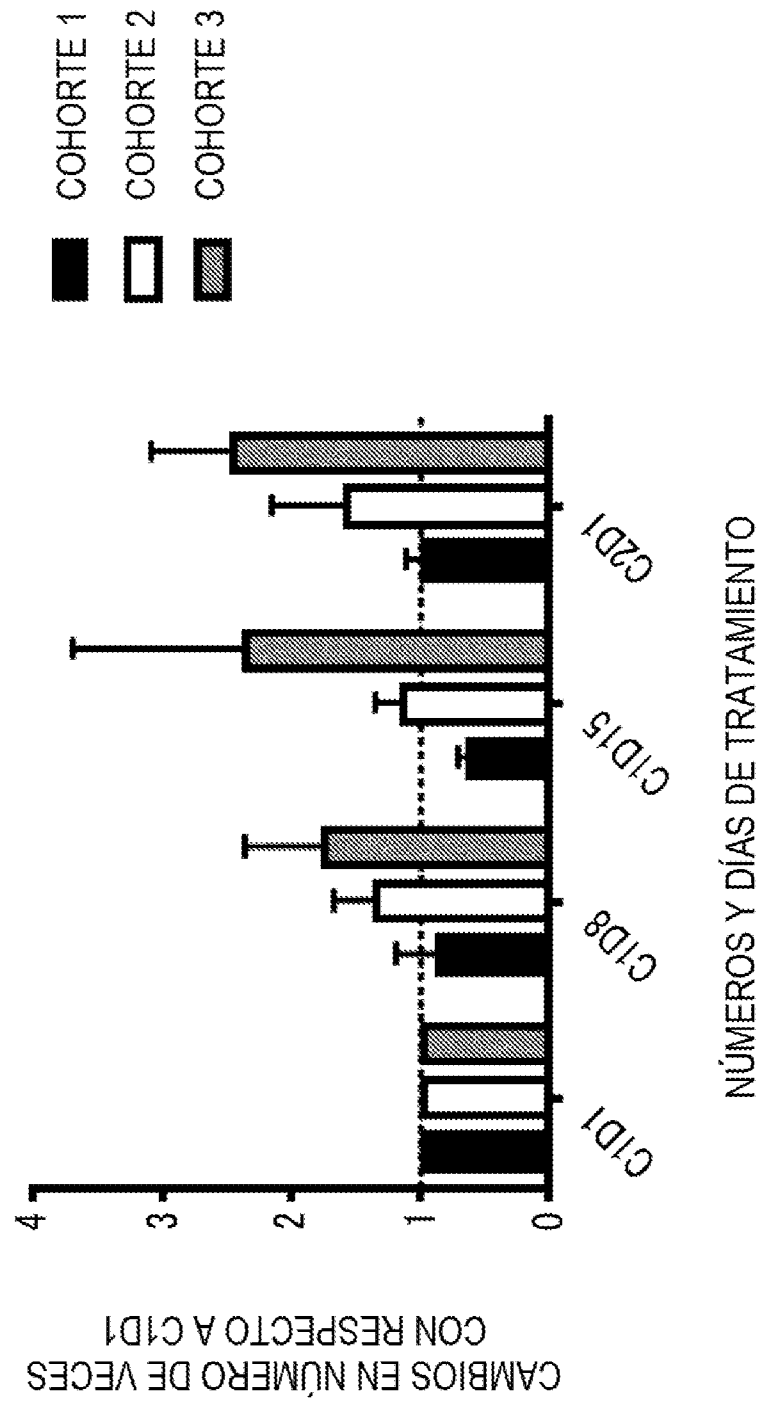


FIG. 36

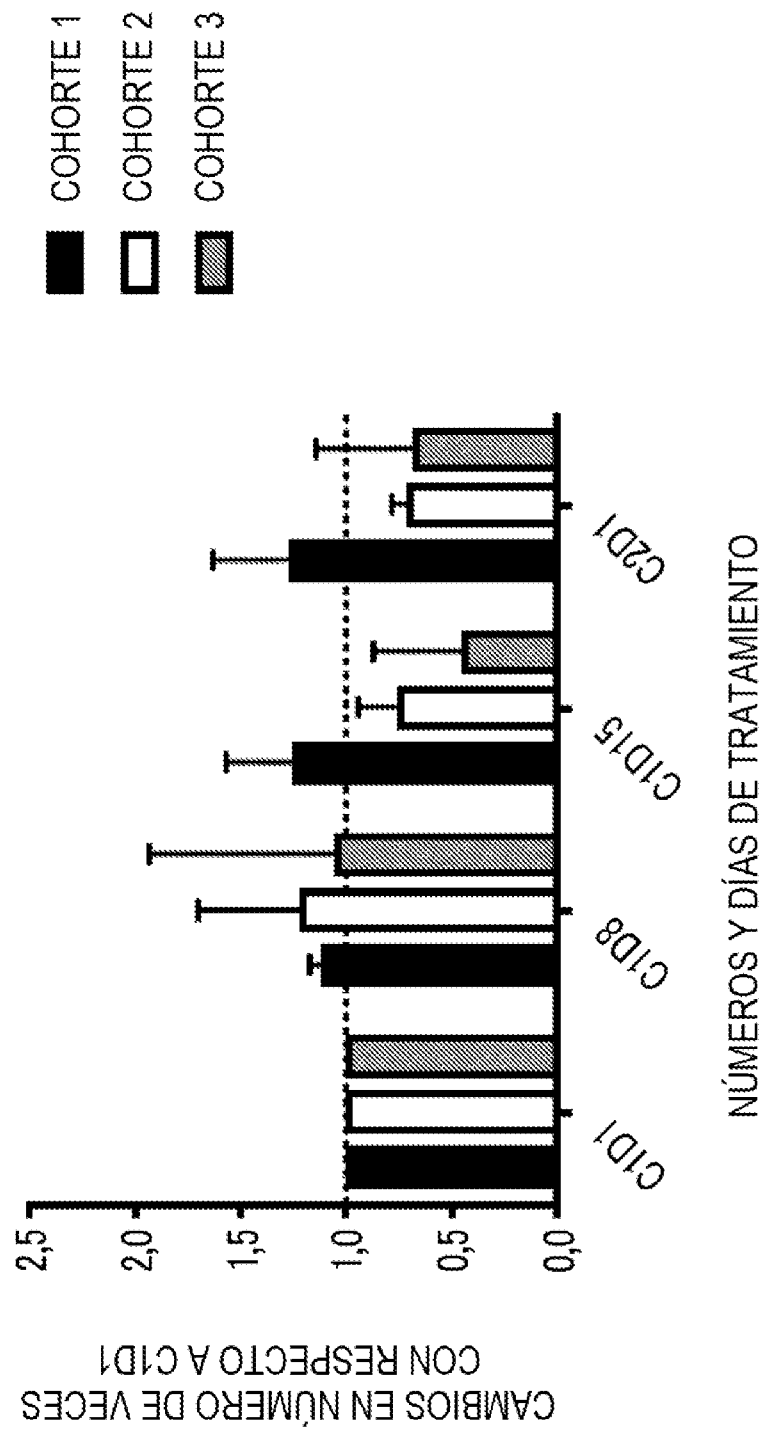


FIG. 37

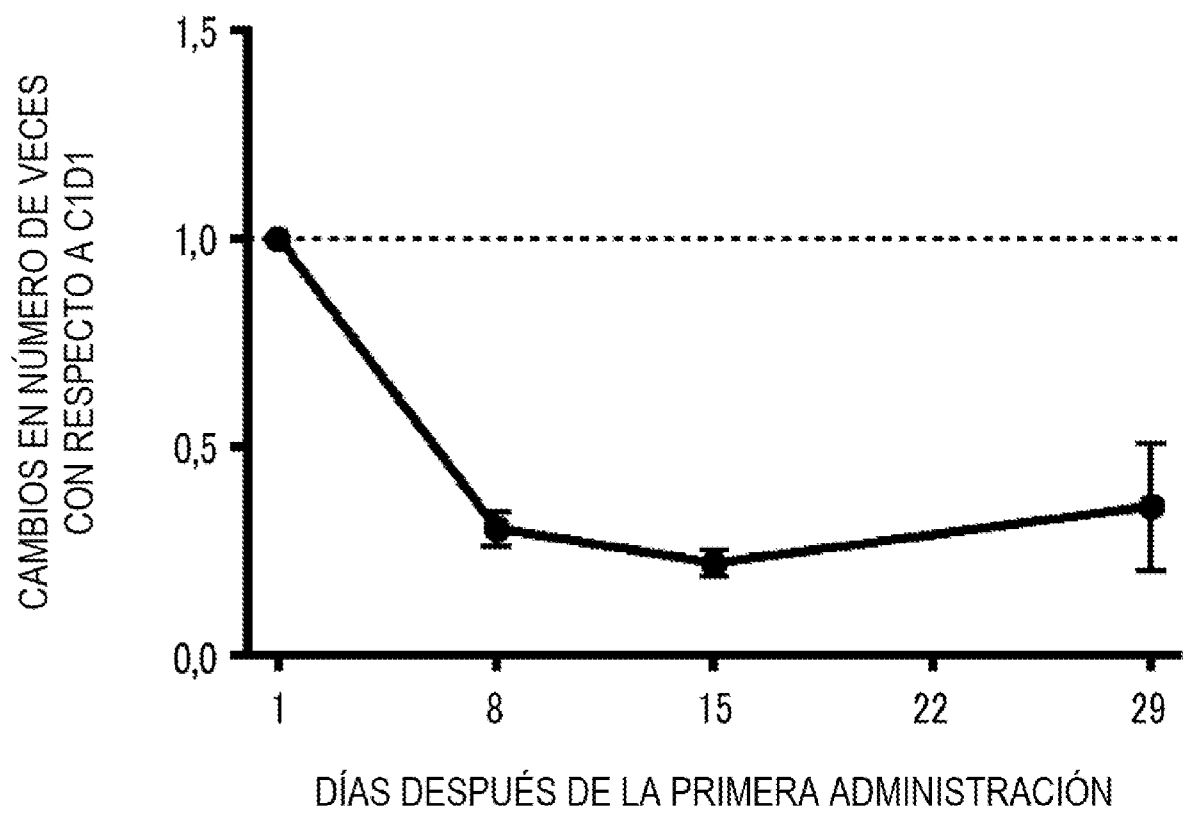


FIG. 38

