

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 148**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 47/04 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2019 PCT/JP2019/024500**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.12.2019 WO19244979**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2019 E 19823228 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024 EP 3811931**

54 Título: **Medicamento de combinación que contiene una composición liposómica que encapsula un fármaco y un inhibidor de punto de control inmunitario**

30 Prioridad:

20.06.2018 JP 2018116707
09.11.2018 JP 2018211291

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:

SHIMOYAMA SUSUMU;
IOROI TADAAKI;
MORI MIKINAGA y
HIGUCHI TAMAMI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 984 148 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 de combinación que contiene una composición liposómica que encapsula un fármaco y un inhibidor de punto de control inmunitario

5 **Campo de la invención**

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

10 **Descripción de la técnica relacionada**

15 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).

20 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.

25 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).

30 En quimioterapia, con frecuencia se estudia que un fármaco se acumula en el sitio de una enfermedad tal como el cáncer y se expone al mismo durante un período de tiempo largo por medio de una composición liposómica.

35 El Documento de patente 3 y el Documento no de patente 2 divulgan un liposoma en el que se encapsula topotecán en un liposoma que contiene esfingomielina y colesterol.

El Documento de patente 4 divulga un liposoma en el que se encapsula topotecán en un liposoma que contiene dihidroesfingomielina y colesterol.

40 El Documento de patente 5 divulga una preparación de camptotecina liposómica adaptada para potenciar la estabilidad de la camptotecina, que incluye (a) camptotecina encapsulada en un liposoma, (b) primera solución que es externa al liposoma y tiene un pH de 4,5 o menos de 4,5, y (c) segunda solución que es interna al liposoma. También se divulga que el liposoma contiene dihidroesfingomielina y colesterol.

45 El Documento de patente 6 divulga un sistema para cargar eficazmente un fármaco anfífilo en un liposoma, incluyendo ajustar una suspensión de liposomas en presencia de un compuesto de amonio o sal de amonio, diluir la suspensión con un tampón o sal, y proporcionar un gradiente de amonio desde el interior hacia el exterior entre una fase acuosa interna y una fase acuosa externa y un gradiente de pH de manera que el pH del interior del liposoma sea más ácido que el pH del exterior del liposoma.

50 El Documento de patente 7 divulga un liposoma en el que se encapsula topotecán en presencia de sulfato de amonio en un liposoma que contiene fosfolípido de soja hidrogenado purificado o esfingomielina, colesterol y un lípido derivado de polímero hidrófilo. El Documento de patente 8 describe nanopartículas lipídicas que comprenden una bicapa lipídica que comprende un fosfolípido, un esteroles, un polietilenglicol-lípido que rodean un núcleo acuoso que comprende un agente terapéutico y/o de diagnóstico y nanopartículas que comprenden una monocapa lipídica que rodea un núcleo hidrófobo.

55 El Documento de patente 9 describe una combinación de un inhibidor de CDK 4/6 selectivo, de acción rápida, de semivida corta con un inhibidor de punto de control para el tratamiento de un tumor o cáncer.

60 El Documento de patente 10 describe un procedimiento de carga transmembrana para la carga eficaz de fármacos anfipáticos en liposomas usando el gradiente transmembrana de amonio y de pH. El Documento de patente 11 describe una nanopartícula liposómica polimerizada híbrida que comprende lípidos polimerizables y lípidos no polimerizables y además un agente terapéutico.

65 El Documento de patente 12 describe un agente terapéutico antitumoral obtenido combinando un agente antitumoral de taxano con una composición liposómica en la que hay gemcitabina o una sal de la misma contenida en un liposoma.

El Documento de patente 13 describe el tratamiento o la prevención del cáncer usando una combinación de un inhibidor de punto de control inmunitario y una vacuna contra el cáncer dirigida.

5 El Documento no de patente 3 describe gradientes de sulfato de amonio transmembrana en liposomas para cargar bases débiles anfífilas en el compartimento acuoso de liposomas.

El Documento no de patente 4 describe mediciones de distribución de tamaño de partícula.

10 El Documento no de patente 5 describe el transporte liposómico de topotecán.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

- 15 Documento de patente 1: WO2006/121168A
 Documento de patente 2: JP2006-340714A
 Documento de patente 3: US7060828B2
 Documento de patente 4: US7811602B2
 20 Documento de patente 5: JP2008-519045A
 Documento de patente 6: JP1990-196713A (JP-H02-196713A)
 Documento de patente 7: US6355268B2
 Documento de patente 8: WO2013/059922A1
 Documento de patente 9: WO 2018/106729A1
 25 Documento de patente 10: EP0361894A2
 Documento de patente 11: US2017/0020816A1
 Documento de patente 12: EP3372232A1
 Documento de patente 13: WO 2017/079303A1

30 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/ll.html>
 35 Documento no de patente 2: Conferencia Internacional de AACR-EORTC, San Francisco, California, del 22 al 26 de octubre de 2007, #C113 *A Pharmacokinetics Study of a Novel Sphingomyelin/Cholesterol Liposomal Topotecan and Non-Liposomal Topotecan in Rats*, William Zamboni *et al.* Documento no de patente 3: "Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases", G. Haran *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 1151, 201-215
 40 Documento no de patente 4: "Particle Size Distribution Measurement from Millimeters to Nanometers and from Rods to Platelets", P. Bowen, *J. Dispers. Sci. Tech.*, 2002, 23(5), 631-662
 Documento no de patente 5: "Ion-Pairing Contribution to the Liposomal Transport of Topotecan as Revealed by Mechanistic Modeling", K. D. Fugit *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 2017, 106(4), 1149-1161

45 **Sumario de la invención**

Los Documentos de patente 3, 4 y 5 mencionados anteriormente y el Documento no de patente 2 divulgan que la eficacia del fármaco se mejora encapsulando topotecán en un liposoma que contiene esfingomielina o dihidroesfingomielina para suprimir la fuga de topotecán en la sangre y mejorar el área bajo la curva (AUC) de concentración-tiempo en sangre. Sin embargo, puesto que la composición de los lípidos que constituyen el liposoma y la composición de las sales que precipitan el topotecán no se han optimizado, la mejora en el AUC no es suficiente y, por lo tanto, se requieren más mejoras para el AUC.

55 Un objeto de la presente invención es proporcionar, en la combinación de inmunoterapia contra el cáncer con un inhibidor de punto de control inmunitario y quimioterapia, una combinación de dos o más agentes antineoplásicos que tienen altos efectos terapéuticos y menos efectos secundarios mediante la combinación de dos o más agentes antineoplásicos que actúan mediante mecanismos diferentes.

60 Como resultado de estudios intensivos, los presentes inventores han descubierto que el objetivo anterior puede 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, como componentes constituyentes de una membrana liposómica, una diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo; una dihidroesfingomielina; y colesteroles, la composición liposómica incluye un fármaco y tiene una fase acuosa interna que contiene sulfato de amonio, una relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco
 65 en una fase acuosa completa es de 0,36 o más, 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

presente invención se ha completado basándose en estos hallazgos.

La presente invención proporciona lo siguiente.

5 [1] Una formulación farmacéutica que comprende:

(A) una composición liposómica en combinación con (B) un inhibidor de punto de control inmunitario,

10 en la que la composición liposómica incluye, como componentes constituyentes de una membrana liposómica, una diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo; una dihidroesfingomielina; y colesteroles, la composición liposómica incluye un fármaco y tiene una fase acuosa interna que contiene sulfato de amonio, una relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en una fase acuosa completa es de 0,36 o más, 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.

15 [2] La formulación farmacéutica de acuerdo con [1], en la que el fármaco es topotecán o una sal del mismo, doxorubicina o una sal de la misma, irinotecán o una sal del mismo, o sunitinib o una sal del mismo.

[3] La composición farmacéutica de acuerdo con [1] o [2], en la que la relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en toda la fase acuosa es de 0,6 o más y 1,8 o menos.

20 [4] La formulación farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en la que la diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo es una diacilfosfatidiletanolamina modificada con polietilenglicol o metoxipolietilenglicol.

[5] La formulación farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], en la que un porcentaje de la diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo en los componentes constituyentes de la membrana liposómica es del 2 al 10 % en moles.

25 [6] La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en la que un porcentaje de colesteroles en los componentes constituyentes de la membrana liposómica es del 35 al 43 % en moles.

[7] La formulación farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], en la que un tamaño de partícula es de 150 nm o menos medido usando un método de dispersión dinámica de luz.

30 [8] La formulación farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7], en la que una fase acuosa externa tiene un pH de 5,5 a 8,5.

[9] La formulación farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8], en la que la dihidroesfingomielina es una dihidroesfingomielina que contiene un grupo alquilo de cadena larga que tiene 16 átomos de carbono y un grupo alquilo de cadena larga que tiene 18 átomos de carbono, y un fármaco incluido es topotecán o una sal del mismo.

35 [10] La formulación farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [9], 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.

[11] La formulación farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [10] para su uso en terapia, en donde la composición liposómica y el inhibidor de punto de control inmunitario se administran simultánea o secuencialmente.

40 [12] La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con [11], en la que la administración se realiza a una dosis y durante un período de dosificación que presentan un efecto terapéutico sinérgico.

[13] La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con [11] o [12], en la que un sujeto de administración tiene resistencia al topotecán.

45 [14] Una formulación farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad (preferentemente cáncer) de un sujeto, comprendiendo la formulación farmacéutica:

(A) una composición liposómica en combinación con (B) un inhibidor de punto de control inmunitario,

50 en la que la composición liposómica incluye, como componentes constituyentes de una membrana liposómica, una diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo; una dihidroesfingomielina; y colesteroles, la composición liposómica incluye un fármaco y tiene una fase acuosa interna que contiene sulfato de amonio, una relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en una fase acuosa completa es de 0,36 o más, 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, y la composición liposómica y el inhibidor de punto de control inmunitario se administran simultánea o secuencialmente.

60 La formulación farmacéutica de acuerdo con un aspecto de la presente invención tiene al menos un efecto de tratar o prevenir el cáncer mediante la administración de una composición liposómica y un inhibidor de punto de control inmunitario en combinación simultánea o secuencialmente.

Además, la formulación farmacéutica de acuerdo con el aspecto de la presente invención tiene un AUC alto o una semivida en sangre larga, 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 a aquel en el caso en el que se usan en combinación un agente

antineoplásico que no está formulado en una preparación liposómica y un inhibidor de punto de control inmunitario.

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 no sólo tiene alta seguridad, sino también baja carga física y alta comodidad para los sujetos, incluyendo los pacientes.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados de medición de un volumen tumoral en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de MBT-2.

La Fig. 2 muestra los resultados de medición de un volumen tumoral en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de MBT-2.

La Fig. 3 muestra los resultados de medición de un volumen tumoral en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de MBT-2.

La Fig. 4 muestra los resultados de medición de un volumen tumoral en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de MBT-2.

La Fig. 5 muestra los resultados de una curva de supervivencia en un ensayo de eficacia del fármaco con el uso combinado de un anticuerpo anti-PD-1 en un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de CT26.WT.

La Fig. 6 muestra los resultados de medición de un volumen tumoral en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 7 muestra los resultados de medición de un volumen tumoral en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 8 muestra los resultados de medición de un volumen tumoral en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

La Fig. 9 muestra los resultados de medición de un volumen tumoral en un ensayo de eficacia del fármaco usando un modelo de ratón portador de tumor con trasplante subcutáneo de EMT6.

Descripción de las realizaciones preferidas

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

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.

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 del sujeto por encima de lo esperado en ausencia de tratamiento.

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.

El tratamiento puede incluir 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 citotóxicos y una disminución de los niveles de antígenos específicos de tumor.

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.

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.

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).

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.

La expresión "retención en sangre" significa una propiedad en la que un fármaco en un estado de estar contenido en un liposoma está presente en la sangre en un sujeto al que se le administra una composición liposómica.

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. Los ejemplos de dispositivos de determinación disponibles en el mercado que usan dispersión de luz dinámica incluyen un analizador de tamaño de partícula de sistema concentrado FPAR-1000 (fabricado por Otsuka Electronics Co., Ltd.), un UPA Nanotracer (fabricado por Nikkiso Co., Ltd.) y un Nanosizer (fabricado por Malvern Panalytical Ltd.). También es posible calcular un tamaño de partícula promedio en volumen y un tamaño de partícula promedio en número del liposoma mediante la ecuación de conversión específica del dispositivo de determinación de cada fabricante. Con el fin de medir partículas en las proximidades de 100 nm, la distribución de partículas no puede capturarse con precisión mediante un método de dispersión de luz estática o similar, y se prefiere la medición mediante el método de dispersión de luz dinámica.

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

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

La primera realización ilustrativa de 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, como componentes constituyentes de una membrana liposómica, una diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo; una dihidroesfingomielina; y colesterol, la composición liposómica incluye un fármaco y tiene una fase acuosa interna que contiene sulfato de amonio, una relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en una fase acuosa completa es de 0,36 o más, 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 segunda realización ilustrativa de la formulación farmacéutica descrita en el presente documento 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, como componentes constituyentes de una membrana liposómica, una diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo; una dihidroesfingomielina; y colesterol, la composición liposómica incluye un fármaco y tiene una fase acuosa interna que contiene una sal de amonio, la dihidroesfingomielina es una dihidroesfingomielina que contiene un grupo alquilo de cadena larga que tiene 16 átomos de carbono y un grupo alquilo de cadena larga que tiene 18 átomos de carbono, y la composición liposómica y el inhibidor de punto de control inmunitario se administran simultánea o secuencialmente.

La tercera realización ilustrativa de la formulación farmacéutica descrita en el presente documento 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, como componentes constituyentes de una membrana

liposómica, una diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo; una dihidroesfingomielina; y colesterolos, la composición liposómica incluye un fármaco, y la composición liposómica y el inhibidor de punto de control inmunitario se administran simultánea o secuencialmente.

5 La siguiente descripción relacionada con la presente invención se aplica a las realizaciones ilustrativas primera a tercera de la formulación farmacéutica. Además, la presente invención incluye aspectos resultantes de modificaciones y/o combinaciones de determinadas realizaciones ilustrativas de la presente invención basándose en la siguiente descripción relacionada con la presente invención.

10 ((A) Composición liposómica)

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 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.

El tamaño de partícula promedio del liposoma es de 10 nm a 1.000 nm, preferentemente de 20 nm a 500 nm, más preferentemente de 30 a 300 nm, aún más preferentemente de 30 nm a 200 nm, incluso más preferentemente 150 nm o menos, por ejemplo, de 30 nm a 150 nm y en particular preferentemente de 70 nm a 150 nm. El liposoma tiene preferentemente una forma esférica o una forma cercana a la misma.

En el caso en el que se espere un efecto potenciado de permeabilidad y retención (efecto EPR), 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 %.

El componente (componente de membrana) que constituye la bicapa lipídica del liposoma incluye un lípido. 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 específicos del lípido incluyen un fosfolípido, un lípido distinto del fosfolípido, colesterolos y derivados de los mismos. Estos componentes pueden estar constituidos por un único componente o una pluralidad de componentes. El liposoma en la presente invención incluye una diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo, dihidroesfingomielina y colesterolos como los componentes constituyentes de la membrana liposómica.

Los ejemplos del lípido que sirve como material base para formar una membrana bicapa lipídica incluyen un fosfolípido que tiene dos cadenas de acilo, por ejemplo, un fosfolípido natural o sintético tal como fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina o cardiolipina, y un producto hidrogenado de los mismos (por ejemplo, fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC)).

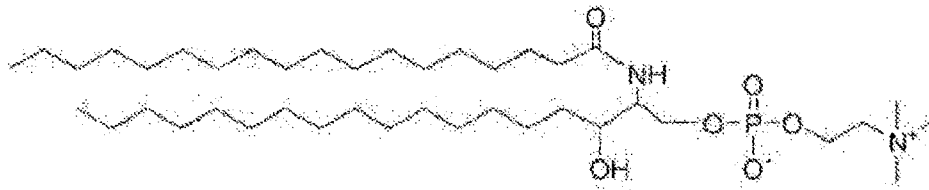
En la presente invención, la dihidroesfingomielina, que es un fosfolípido que tiene dos cadenas de acilo, se usa como lípido que sirve como material base para formar una membrana bicapa lipídica. La retención de liposomas en la sangre puede mejorarse usando dihidroesfingomielina.

Mediante el uso de dihidroesfingomielina como material base de la membrana liposómica, las propiedades de reparto de la membrana liposómica pueden mejorarse y, por lo tanto, la fuga del fármaco encapsulado puede evitarse. Se especula que esto se debe a que los enlaces amida de la dihidroesfingomielina tienen una fuerte capacidad de formación de enlaces de hidrógeno y pueden formar una membrana fuerte y altamente susceptible de reparto al interactuar fuertemente entre sí. Además, los enlaces amida de la dihidroesfingomielina interactúan fuertemente con los grupos hidroxilo del colesterol utilizados simultáneamente en la presente invención, por lo que puede formarse una membrana que tiene altas propiedades de reparto. Esta es una función que no puede conseguirse con lípidos utilizados habitualmente tales como HSPC y lecitina que tienen enlaces éster.

Además, puesto que la dihidroesfingomielina totalmente saturada tiene un punto de fusión más alto y una menor movilidad de la membrana formada con respecto a la esfingomielina que tiene enlaces amida, pero que tiene enlaces insaturados en la cadena de acilo, se especula que la dihidroesfingomielina puede formar una membrana con mayores propiedades de reparto con respecto a la esfingomielina.

La dihidroesfingomielina generalmente tiene dos grupos alquilo de cadena larga en la molécula y los ejemplos de dihidroesfingomielina que tiene dos grupos alquilo de cadena larga incluyen dihidroesfingomielina que tiene dos grupos alquilo de cadena larga que tienen 16 átomos de carbono, dihidroesfingomielina que tiene un grupo alquilo de cadena larga que tiene 16 átomos de carbono y un grupo alquilo de cadena larga que tiene 18 átomos de carbono, y dihidroesfingomielina que tiene un grupo alquilo de cadena larga que tiene 16 átomos de carbono y un grupo alquilo de cadena larga que tiene de 20 a 24 átomos de carbono.

Desde el punto de vista de prevenir la fuga de un fármaco del liposoma, como dihidroesfingomielina se usa preferentemente el siguiente compuesto que tiene un grupo alquilo de cadena larga que tiene 16 átomos de carbono y un grupo alquilo de cadena larga que tiene 18 átomos de carbono. Esto se debe a que el punto de fusión aumenta a medida que aumenta el número de átomos de carbono y, por lo tanto, puede formarse una membrana liposómica que tiene altas propiedades de reparto.



Como dihidroesfingomielina, por ejemplo, puede usarse dihidroesfingomielina obtenida reduciendo esfingomielina de origen natural mediante un método general, o puede usarse dihidroesfingomielina obtenida mediante síntesis. Puesto que la mayoría de las dihidroesfingomielinas derivadas de productos naturales tales como huevos de gallina generalmente tienen dos grupos alquilo de cadena larga que tienen 16 átomos de carbono, se prefiere usar dihidroesfingomielina obtenida mediante síntesis química, desde el punto de vista de que puede obtenerse con alta pureza dihidroesfingomielina que tiene un grupo alquilo de cadena larga que tiene 16 átomos de carbono y un grupo alquilo de cadena larga que tiene 18 átomos de carbono.

El porcentaje de dihidroesfingomielina en los componentes constituyentes de la membrana liposómica (los lípidos totales que constituyen el liposoma) es preferentemente del 30 al 80 % en moles, más preferentemente del 40 al 70 % en moles y aún más preferentemente del 50 al 60 % en moles.

Los ejemplos del polímero hidrófilo en la diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo incluyen polietilenglicoles, poliglicerinas, polipropilenglicoles, alcoholes polivinílicos, copolímeros alternantes de estireno-anhídrido de ácido maléico, 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 composición, se prefieren los polietilenglicoles, las poliglicerinas y los polipropilenglicoles, y se prefieren más el polietilenglicol (PEG), la poliglicerina (PG), el polipropilenglicol (PPG) y los derivados de los mismos.

El polietilenglicol (PEG) y los derivados de los mismos se prefieren aún más desde el punto de vista de la versatilidad y la retención en la sangre. Los ejemplos de derivados de polietilenglicol (PEG) incluyen, pero sin limitación particular, metoxipolietilenglicoles.

El peso molecular de los polietilenglicoles no está particularmente limitado y 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.

El número de átomos de carbono en el resto acilo de diacilfosfatidiletanolamina es preferentemente de 16 o más, por ejemplo, preferentemente 16 o más y 30 o menos, más preferentemente 16 o más y 24 o menos, y aún más preferentemente 20.

Los ejemplos de la diacilfosfatidiletanolamina modificada con polietilenglicol incluyen 1,2-diestearoil-3-fosfatidiletanolamina-polietilenglicol tal como 1,2-diestearoil-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.).

El porcentaje de diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo en los componentes constituyentes de la membrana liposómica (los lípidos totales que constituyen el liposoma) es preferentemente del 1 al 15 % en moles y más preferentemente del 2 al 10 % en moles.

Los ejemplos de colesterol incluyen colesterol que contienen ciclopentahidrofenantreno como cadena principal básica y en el que los átomos de carbono están parcial o totalmente hidrogenados y derivados del mismo. Por ejemplo, se prefiere el colesterol. En el caso en el que el tamaño de partícula promedio del liposoma disminuye a 100 nm o menos, la curvatura de la membrana lipídica aumenta. La deformación de la membrana dispuesta en el liposoma

también aumenta. Es eficaz añadir colesterol o similares con el fin de llenar la deformación de la membrana causada por el lípido (efecto estabilizante de la membrana).

5 En relación con el liposoma, se espera que la adición de colesterol reduzca la fluidez de la membrana del liposoma, por ejemplo, llenando los huecos en la membrana del liposoma.

El porcentaje de colesterol en los componentes constituyentes de la membrana liposómica (lípidos que constituyen el liposoma) es preferentemente del 20 % en moles al 50 % en moles, más preferentemente del 30 % en moles al 45 % en moles y aún más preferentemente del 35 % en moles al 43 % en moles.

10 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.

(Fármaco)

20 La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención incluye un fármaco.

El tipo de fármaco no está particularmente limitado, pero pueden usarse los agentes antineoplásicos que se proporcionan a continuación. Los ejemplos específicos del fármaco incluyen agentes antineoplásicos a base de antraciclina tales como doxorubicina, daunorrubicina y epirubicina;

25 agentes antineoplásicos a base de cisplatino tales como cisplatino y oxaliplatino;
agentes antineoplásicos a base de taxano tales como paclitaxel y docetaxel;
agentes antineoplásicos a base de alcaloides de la vinca tales como vincristina y vinblastina;
agentes antineoplásicos a base de bleomicina tales como bleomicina;
agentes antineoplásicos a base de sirolimus tales como sirolimus;
30 agentes antineoplásicos a base de camptotecina tales como topotecán (también conocido como nogitecán), irinotecán, karenitecina (marca registrada) (también conocida como BNP1350), exatecán, lurtotecán, gimitecán (también denominado ST1481) y belotecán (también denominado CKD602);
agentes antineoplásicos a base de alcaloides de la vinca tales como vincristina; y
fármacos dirigidos molecularmente tales como imatinib (Gleevec (marca registrada)), everolimus (Afinitor (marca registrada)), erlotinib (Tarceva (marca registrada)), gefitinib (Iressa (marca registrada)), sunitinib (Sutent (marca registrada)), sorafenib (Nexavar (marca registrada)), dasatinib (Sprycel (marca registrada)), tamibaroteno (Amnolake (marca registrada)), tretinoína (Vesanoid (marca registrada)), bortezomib (Velcade (marca registrada)) y lapatinib (Tykerb (marca registrada)).

40 Entre los fármacos anteriores, se prefiere el topotecán (también denominado nogitecán), la doxorubicina, el irinotecán o el sunitinib, y se prefiere más el topotecán.

Puede aplicarse preferentemente clorhidrato de nogitecán (nombre genérico, nombre químico: monoclóhidrato de (+)-(4S)-10[-(dimetilamino)metil]-4-etil-4,9-dihidroxi-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-3,14(4H,12H)-diona) como topotecan, y está disponible en el mercado, por ejemplo, con el nombre comercial de HYCAMTIN (marca registrada).

El fármaco puede usarse en la forma de una sal.

50 Los ejemplos de la sal del fármaco incluyen sales en un grupo básico tal como un grupo amino y un grupo ácido tal como un grupo hidroxilo o un grupo carboxilo, que son habitualmente conocidos en la técnica relacionada.

Los ejemplos de la sal en un grupo básico incluyen sales con ácidos minerales tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido bórico, ácido nítrico y ácido sulfúrico; sales con ácidos carboxílicos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico, ácido aspártico, ácido tricloroacético y ácido trifluoroacético; y sales con ácido sulfónicos, tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido mesitilenosulfónico y ácido naftalenosulfónico.

60 Los ejemplos de la sal en un grupo ácido incluyen sales con metales alcalinos tales como sodio y potasio; sales con metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio; sales de amonio; y sales con bases orgánicas que contienen nitrógeno tales como trimetilamina, trietilamina, tributilamina, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, dietilamina, dicitlohexilamina, procaína, dibencilamina, N-bencil- β -fenetilamina, 1-efenamina y N,N'-dibenciletildiamina.

65 El contenido del fármaco en la composición liposómica no está particularmente limitado, pero es preferentemente de

0,025 a 20 mg/ml y más preferentemente de 0,25 a 10 mg/ml con respecto a la composición liposómica.

La cantidad de fármaco encapsulado en liposoma con respecto al lípido formador de membrana de liposoma está en una relación molar de preferentemente 0,1 a 1,5 y más preferentemente de 0,2 a 0,3 desde el punto de vista de la velocidad de liberación del fármaco del liposoma, la presión osmótica dentro del liposoma y la forma del liposoma por el fármaco precipitado.

En el caso en el que la relación molar de la cantidad de fármaco con respecto al lípido sea demasiado baja, el área de la membrana liposómica con respecto a la cantidad unitaria de fármaco aumenta, la velocidad de liberación del fármaco del liposoma aumenta y, por lo tanto, se altera la función de mejorar la retención en la sangre. Por otra parte, en el caso en el que la relación molar de la cantidad de fármaco con respecto a lípido sea demasiado alta, la presión osmótica dentro del liposoma aumenta con una mayor cantidad del fármaco disuelto, dando como resultado por lo tanto en la destrucción del liposoma, o en el caso en el que el fármaco precipite dentro del liposoma, el sólido precipitado crece, dando como resultado por lo tanto la deformación de la forma del liposoma.

(Sulfato de amonio en fase acuosa interna)

La fase acuosa interna del liposoma en la presente invención contiene sulfato de amonio. Además, en la composición liposómica que es la primera realización de la presente invención, la relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en toda la fase acuosa es de 0,36 o más y preferentemente de 0,4 o más. La relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en toda la fase acuosa es más preferentemente de 0,4 o más y 1,8 o menos y aún más preferentemente de 0,6 o más y 1,8 o menos. Estableciendo la relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en toda la fase acuosa como se describió anteriormente, es posible suprimir la fuga del fármaco del liposoma en la sangre.

En el caso en el que la relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en toda la fase acuosa sea demasiado baja, esto conduce a la formación incompleta de un sólido del fármaco debido al sulfato, un aumento de la concentración del fármaco en estado disuelto, lo que da como resultado una mayor permeabilidad de la membrana liposómica en el liposoma y una fuga fácil del fármaco del liposoma, de manera que se altera el efecto de mejorar la retención en la sangre. Además, en el caso en el que la relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en toda la fase acuosa sea demasiado alta, la presión osmótica dentro del liposoma será alta, dando como resultado la destrucción de la estructura del liposoma, por lo que es probable que el fármaco se fugue del liposoma y, por lo tanto, se altere el efecto de mejorar la retención en la sangre.

Además, en la presente invención, el porcentaje de iones sulfato contenidos en la fase acuosa interna del liposoma con respecto a iones sulfato en toda la composición liposómica (relación de iones sulfato en la fase acuosa interna) es preferentemente de al menos el 80 % y más preferentemente del 90 % o más, y simultáneamente el porcentaje del fármaco contenido en la fase acuosa interna del liposoma con respecto al fármaco en toda la composición liposómica (relación de fármaco en la fase acuosa interna) es preferentemente de al menos el 80 % y más preferentemente el 90 % o más.

La concentración del fármaco en el liposoma puede medirse, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos/detección de absorbancia UV-vis. Además, la concentración de iones sulfato en la fase acuosa interna del liposoma puede medirse, por ejemplo, mediante cromatografía iónica.

(pH de la fase acuosa externa)

La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención puede incluir un liposoma que encapsula un fármaco y un disolvente acuoso (fase acuosa externa) en el que se dispersa el liposoma. La fase acuosa externa tiene preferentemente un pH neutro y específicamente un pH de aproximadamente 5,5 a 8,5.

En el caso en el que la fuga de fármaco esté extremadamente suprimida, la fuga de fármaco en el área afectada, particularmente en el sitio del tumor, también puede suprimirse y, por lo tanto, es posible que no se obtenga la eficacia esperada del fármaco.

La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención tiene un mecanismo sorprendente de supresión de la fuga de fármaco en la sangre, suministrando una cantidad suficiente de fármaco al sitio del tumor y liberando rápidamente el fármaco en el sitio del tumor.

El sitio del tumor tiene la propiedad de que la concentración de amonio es mayor que la de otros órganos tales como la sangre (véase, por ejemplo, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(2015) 1841-1850) y, por lo tanto, la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención puede presentar una liberación de fármaco significativamente mayor en un entorno en el que el metabolismo de la glutamina está potenciado y por lo tanto una concentración de amonio es alta (5 mmol/l), tal como un tumor.

La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención tiene una velocidad de liberación

de fármaco del 20 %/24 horas o menos a 37 °C de liposomas en plasma que tienen una concentración de amonio de 1 mmol/l o menos y una velocidad de liberación de fármaco del 60 % o más a 37 °C de liposomas en plasma que tienen una concentración de amonio de 4 a 6 mmol/l; y más preferentemente una velocidad de liberación de fármaco del 15 %/24 horas o menos a 37 °C de liposomas en plasma que tienen una concentración de amonio de 1 mmol/l o menos y una velocidad de liberación de fármaco del 70 % o más a 37 °C de liposomas en plasma que tienen una concentración de amonio de 4 a 6 mmol/l.

(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.

Por ejemplo, la composición lipídica de acuerdo con la realización de la presente invención puede producirse mediante las siguientes etapas:

- (a) preparación de una fase oleosa;
- (b) preparación de una fase acuosa;
- (c) formación de partículas liposómicas mediante emulsificación;
- (d) regulación del tamaño de partícula mediante extrusora;
- (e) reemplazo del líquido de la fase acuosa externa de los liposomas mediante diálisis;
- (f) encapsulación del fármaco en partículas liposómicas mediante carga remota; y
- (g) eliminación del fármacos en la fase acuosa externa mediante diálisis.

La regulación del tamaño de partícula mediante una extrusora (d) puede realizarse o no.

<(a) Preparación de la fase oleosa>

(a) En la preparación de una fase oleosa, se mezclan los componentes individuales (diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo, dihidroesfingomielina y colesterol) que constituyen el liposoma y un disolvente orgánico, y la mezcla se calienta para disolver los componentes, con lo que puede producirse la fase oleosa.

Aunque el disolvente orgánico utilizado en la fase oleosa no está particularmente limitado, por ejemplo, puede usarse un disolvente orgánico hidrosoluble que opcionalmente se mezcla con agua.

Los ejemplos 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, son preferibles los alcoholes. El alcohol es preferentemente al menos uno seleccionado de etanol, metanol, 2-propanol, o t-butanol, más preferentemente al menos uno seleccionado de etanol, 2-propanol o t-butanol, y aún más preferentemente etanol.

La concentración de cada componente que constituye el liposoma no está particularmente limitada y puede ajustarse apropiadamente.

<(b) Preparación de la fase acuosa>

Como fase acuosa puede usarse agua (agua destilada, agua para inyectables o similares), suero fisiológico, diversas soluciones tampón o soluciones acuosas de azúcares (sacarosa o similares), o mezclas de los mismos (disolvente acuoso). En la presente invención, se prefiere usar una solución acuosa de sulfato de amonio como fase acuosa, en el caso en el que un fármaco se encapsule en partículas liposómicas mediante carga remota que se describirá más adelante.

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 de tampón Tris, una solución de tampón citrato, una solución de tampón acetato y una solución de tampón de Good. 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 o 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 0,9 % (porcentaje de masa/volumen) de cloruro de sodio, PBS y solución salina tamponada con Tris.

En la presente invención, la fase acuosa significa 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.

5 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.

10 La fase acuosa interna en la presente invención se refiere a una fase acuosa en la vesícula cerrada a través de la membrana bicapa lipídica del liposoma.

<(c) Formación de partículas liposómicas mediante emulsificación>

15 En la etapa de emulsificación, se mezclan una fase oleosa y una fase acuosa para preparar una solución acuosa que contiene lípidos, que después se puede emulsionar 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 en donde se emulsionan una fase oleosa y una fase acuosa en un tipo O/W (tipo aceite en agua). Después de la mezcla, los liposomas se forman eliminando una porción o la totalidad del disolvente orgánico derivado de la fase oleosa mediante evaporación. 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.

20 Como un método de agitación, se utilizan ondas ultrasónicas o fuerza de corte mecánica para la miniaturización de partículas. Además, se puede llevar a cabo un procesamiento con extrusora o un procesamiento con microfluidizador 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.

25 La etapa de emulsificación no está limitada siempre que sea una etapa de emulsificación, pero preferentemente es una etapa de aplicación de una fuerza de cizalla elevada y realización de una microparticulación con una etapa de emulsificación que incluye un disolvente orgánico. La alta velocidad de cizalla se define en términos de velocidad circunferencial de una paleta agitadora de una máquina de emulsificación y es preferentemente de 5 m/s a 32 m/s y en particular preferentemente de 20 m/s a 30 m/s. En caso necesario, puede realizarse la evaporación (desolvatación) del disolvente orgánico utilizado en la etapa de emulsificación para formar liposomas.

30 La temperatura del líquido en la etapa de emulsificación en el caso de producción de liposomas puede controlarse apropiadamente, pero la temperatura del líquido en el momento de mezclar una fase oleosa y una fase acuosa es preferentemente igual o superior a la temperatura de transición de fase del lípido que ha de usarse. Por ejemplo, en el caso en el que se use un lípido que tiene una temperatura de transición de fase de 35 °C a 40 °C, la temperatura del líquido en el momento de mezclar una fase oleosa y una fase acuosa es preferentemente de 35 °C a 70 °C.

35 En la etapa de emulsificación, el disolvente orgánico y el agua se pueden evaporar de la solución acuosa que contiene los liposomas. En cuanto a la evaporación a la que se hace referencia en el presente documento, una porción o todo el disolvente orgánico derivado de la fase oleosa y el agua derivada de la fase acuosa pueden evaporarse y eliminarse por la fuerza, o una porción o todo el disolvente orgánico derivado de la fase oleosa y el agua derivada de la fase acuosa puede evaporarse naturalmente durante el curso de la agitación-emulsión.

40 El método de evaporación no está particularmente limitado y, por ejemplo, puede realizarse al menos una de una etapa de calentamiento para evaporar un disolvente orgánico y agua, una etapa de continuar el reposo o agitación lenta después de la emulsificación, o una etapa de realizar desgasificación al vacío.

45 <(d) Regulación del tamaño de partícula mediante extrusora>

Los liposomas obtenidos se pueden uniformar en tamaño de partícula mediante diálisis, filtración, procesamiento por extrusión, o similares.

55 El procesamiento por extrusión implica 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 mismos incubando 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.

Además, la regulación del tamaño de partícula mediante una extrusora puede realizarse o no.

60 <(e) Reemplazo de la fase líquida acuosa externa de liposomas mediante diálisis>

65 En la presente invención, en el caso en el que el fármaco esté encapsulado en las partículas liposómicas mediante

carga remota, el líquido de la fase acuosa externa de liposomas puede reemplazarse mediante diálisis. Puede usarse una solución acuosa de NaCl del 0,05 % al 5 % en masa como líquido de diálisis que no está particularmente limitado. La diálisis del líquido de los liposomas usando el líquido de diálisis mencionado anteriormente puede proporcionar liposomas en los que se elimina el sulfato de amonio presente en la fase acuosa externa y la fase acuosa externa se reemplaza con el líquido de diálisis.

<(f) Encapsulación del fármaco en partículas liposómicas mediante un método de carga remota>

En la presente invención, se prefiere encapsular un fármaco en partículas liposómicas mediante un método de carga remota.

En la presente invención, el método de carga remota se refiere a un método para producir un liposoma vacío en el que no se encapsula un fármaco y después añadir el fármaco al líquido externo del liposoma para introducir el fármaco en el liposoma. El método de carga remota no está particularmente limitado, pero se prefiere un método que use una sal de amonio y se prefiere más un método que use sulfato de amonio.

En el método de carga remota, el fármaco añadido al líquido externo se transfiere activamente a los liposomas y se incorpora en los liposomas. Un gradiente de solubilidad, un gradiente de iones, un gradiente de pH o similar se usa como fuerza impulsora. Por ejemplo, existe un método para introducir un fármaco en liposomas usando un gradiente iónico formado a través de una membrana liposómica. Por ejemplo, existe una técnica para añadir un fármaco en liposomas que se realiza mediante el método de carga remota usando un gradiente de concentración de Na^+/K^+ .

Entre los gradientes de iones, generalmente se usa un gradiente de concentración de protones. Por ejemplo, hay un aspecto en el que el pH interno (fase acuosa interna) de la membrana de los liposomas tiene un gradiente de pH menor que el pH externo (fase acuosa externa). El gradiente de pH puede formarse específicamente mediante un gradiente de concentración de ion amonio o similar.

<(g) Eliminación del fármaco en la fase acuosa externa mediante diálisis>

El líquido de los liposomas con fármaco encapsulado puede someterse a diálisis para eliminar el fármaco no contenido en los liposomas. Por ejemplo, sometiendo el líquido de los liposomas con fármaco encapsulado a diálisis, usando una concentración predeterminada de tampón sacarosa/histidina como líquido de diálisis, el fármaco presente en la fase acuosa externa se puede eliminar para obtener una composición liposómica en la que la fase acuosa externa se reemplaza con el líquido de diálisis.

<Esterilización por filtración>

La composición liposómica obtenida anteriormente 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 o similares. En la presente invención, se prefiere filtrar la composición liposómica a través de un filtro que tenga un tamaño de poro esterilizable (preferentemente un filtro de esterilización por filtración de 0,2 μm).

Para evitar un efecto de deformación de los liposomas sobre el tamaño promedio de partícula, la etapa de esterilización por filtración y la etapa de llenado aséptico descrita a continuación se llevan a cabo preferentemente a una temperatura inferior o igual a la temperatura de transición de fase del lípido que constituye el liposoma. Por ejemplo, en el caso en el que la temperatura de transición de fase del lípido sea de aproximadamente 50 °C, la etapa de esterilización por filtración y la etapa de llenado aséptico que se describen a continuación se realizan a una temperatura de preferentemente aproximadamente 0 °C a 40 °C, y más específicamente de aproximadamente 5 °C a 30 °C.

<Llenado aséptico>

La composición liposómica obtenida después de la esterilización por filtración se llena preferentemente de forma aséptica para aplicaciones médicas. Pueden aplicarse métodos conocidos para el llenado aséptico. Puede prepararse una composición liposómica adecuada para aplicaciones médicas cargando asépticamente la composición liposómica en un recipiente.

(Composición liposómica)

En relación con la vía de administración, la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención puede contener al menos uno de entre un agente de tonicidad, un estabilizante, un antioxidante o un agente de ajuste del pH que sea farmacéuticamente aceptable.

El agente de tonicidad no está particularmente limitado y sus ejemplos incluyen sales inorgánicas tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, hidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de potasio e hidrogenofosfato de potasio; polioles tales como glicerol, manitol y sorbitol; y azúcares tales como glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa.

El estabilizador no está particularmente limitado y los ejemplos del mismo incluyen azúcares tales como glicerol, manitol, sorbitol, lactosa y sacarosa.

5 El antioxidante no está particularmente limitado y sus ejemplos incluyen ácido ascórbico, ácido úrico, tocoferol u homólogos (por ejemplo, vitamina E, cuatro isómeros de tocoferol α , β , γ y δ) cisteína y ácido etilendiaminatetraacético (EDTA). Los estabilizadores y antioxidantes pueden usarse respectivamente solos o en combinación de dos o más de los mismos.

10 Los ejemplos del agente de ajuste del pH incluyen hidróxido de sodio, ácido cítrico, ácido acético, trietanolamina, hidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio y dihidrogenofosfato de potasio.

15 La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención puede contener un disolvente orgánico, colágeno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, un polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa de sodio, poliácido de sodio, alginato de sodio, dextrano hidrosoluble, carboximetil almidón de sodio, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantana, goma arábiga, caseína, gelatina, agar, diglicerina, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina sérica humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, solución salina tamponada con fosfato (PBS), cloruro de sodio, azúcares, un polímero biodegradable, un medio sin suero, cada uno de los cuales es farmacéuticamente aceptable, o un aditivo que es aceptable como un aditivo farmacéutico.

20 El recipiente en el que se carga 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 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.

30 En el recipiente en el que se carga la composición liposómica, 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 inyección se burbujea con nitrógeno, de modo que el llenado de la solución de inyección en un recipiente se puede llevar a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno.

35 La vía de administración de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención es preferentemente la administración parenteral. Ejemplos de administración parenteral incluyen inyección intravenosa tal como goteo intravenoso, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, inyección intraocular e inyección intratecal. El método de administración de la composición liposómica puede ser, por ejemplo, administración mediante jeringa o goteo intravenoso.

40 La dosificación y frecuencia de administración de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención pueden establecerse apropiadamente dependiendo del tipo de fármaco, del estado del paciente y similares. La dosis de la composición liposómica puede establecerse generalmente en el intervalo de 0,01 mg/kg/día a 100 mg/kg/día en términos de masa de fármaco que es un principio activo. La dosis de la composición liposómica puede establecerse en el intervalo de 2 mg a 10 mg por dosis en términos de masa de fármaco que es un principio activo, pero no se limita a estas dosificaciones.

50 ((B) Inhibidor de punto de control inmunitario)

La expresión "inhibidor de punto de control inmunitario" se refiere a un fármaco que actúa sobre una molécula de punto de control inmunitario o un ligando de la misma para inhibir la transducción de señales por la molécula de punto de control inmunitario. Los ejemplos de moléculas diana del inhibidor de punto de control inmunitario incluyen moléculas de punto de control inmunitario y ligandos de las mismas que se presentan en la superficie de linfocitos T y células presentadoras de antígenos, específicamente, moléculas tales como PD-1, CTLA-4, TIM3, LAG3, PD-L1, PD-L2, BTNL2, 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/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.

65 El inhibidor de punto de control inmunitario puede ser cualquier sustancia capaz de inhibir la función de una molécula de punto de control inmunitario y un ligando de la misma presentado en la superficie de linfocitos T o células presentadoras de antígenos e incluye al menos uno seleccionado de entre 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-1, 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-1, 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 y tremelimumab. 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 sin limitarse 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 EPR en el que los liposomas con fármaco encapsulado 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 función de una molécula de punto de control inmunitario tal como CTLA-4 o PD-1 o un ligando del mismo PD-L1 o PD-L2, mediante lo cual puede suprimirse la progresión del cáncer o puede tratarse el cáncer.

Además, administrando simultánea o secuencialmente una composición liposómica que contiene fármaco y un inhibidor de punto de control inmunitario en combinación, la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención tiene un efecto antitumoral más fuerte (por ejemplo, efecto inhibidor del crecimiento tumoral) mediante el uso de agentes únicos (una composición liposómica que contiene fármaco y un inhibidor de punto de control inmunitario) en combinación en comparación con cada uno de los agentes únicos.

La formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención puede usarse como una formulación farmacéutica en la que se combinan y administran simultánea o secuencialmente una composición liposómica que contiene fármaco y un inhibidor de punto de control inmunitario, y preferentemente como agente antineoplásico.

El tipo de cáncer al que se aplica la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención no está particularmente limitado, y los ejemplos del mismo incluyen cáncer de pulmón (especialmente cáncer de pulmón microcítico), cáncer de ovario, tumor pediátrico sólido, cáncer de cuello del útero, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de endometrio, cáncer gástrico (adenocarcinoma gástrico), cáncer de pulmón no microcítico, cáncer pancreático, carcinoma de células escamosas del cuello uterino, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, melanoma, cáncer de colon, cáncer de células renales, linfoma no Hodgkin, cáncer urotelial, mieloma múltiple, leucemia mieloide

aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia de linfocitos T en adultos, cáncer metastásico de médula ósea, sarcoma, tumor de tejido blando, leucemia mielomonocítica crónica, linfoma de Hodgkin y linfoma cutáneo de linfocitos T.

5 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
10 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.

La formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención puede ejercer un efecto excelente sobre el cáncer resistente al topotecán. La proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) es un miembro de la familia de proteínas transportadoras del casete de unión a ATP (ABC). Esta proteína transportadora dirige la salida de un agente antineoplásico de las células cancerosas y reduce la concentración intracelular del agente antineoplásico, reduciendo o eliminando de este modo un efecto antineoplásico deseado del fármaco en estas células cancerosas resistentes. Se especula que la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención puede ejercer un efecto excelente sobre el cáncer resistente al topotecán logrando la exposición de las células tumorales a una alta concentración de topotecán durante un período de tiempo largo debido al efecto EPR que el fármaco se acumula y queda retenido en los tejidos tumorales.

(Volumen tumoral)

25 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.

30 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.

35 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.

40 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.

45 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 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).

Ejemplos

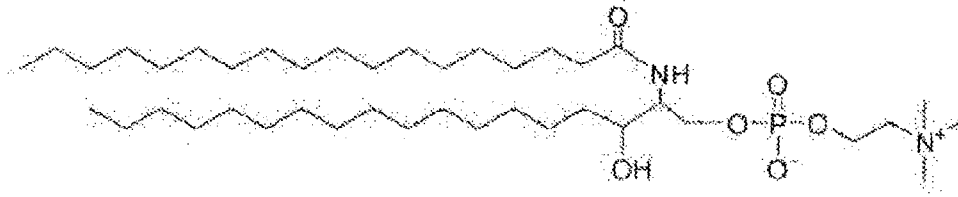
50 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá de manera específica haciendo referencia a los Ejemplos, pero la presente invención no se limita a ello. Se entiende que los expertos en la materia pueden cambiar y modificar la presente invención de diversas formas. A menos 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.

SM representa esfingomielina (COATSOME NM-10, fabricada por NOF Corporation).

60 DHSM derivada de huevos de gallina representa dihidroesfingomielina obtenida hidrogenando SM derivada de huevos de gallina (producto sintético obtenido hidrogenando COATSOME NM-10 (fabricada por NOF Corporation)). Esta DHSM derivada de huevos de gallina es una mezcla que contiene DHSM que tiene dos cadenas alquílicas que tienen 16 átomos de carbono, que representa del 70 % al 80 % del total de DHSM derivada de huevos de gallina y DHSM que tiene diferentes longitudes de cadena alquílica, que es el resto.

65 DHSM totalmente sintética representa dihidroesfingomielina producida mediante síntesis química para contener el

98 % o más del siguiente compuesto que tiene un grupo alquilo de cadena larga que tiene 16 átomos de carbono y un grupo alquilo de cadena larga que tiene 18 átomos de carbono.



5 Se usó SUNBRIGHT DSPE-020CN (en lo sucesivo en el presente documento, DSPE-PEG, fabricada por NOF Corporation) como fosfolípido de PEG (indicado como PEG en la tabla).

10 Se usó colesterol HP (fabricado por Nippon Fine Chemical Co., Ltd.) como colesterol (indicado como Chol en la tabla).

<Ejemplos comparativos 1 a 10>

(a) Preparación de la fase oleosa

15 Para el Ejemplo comparativo 1, se pesaron respectivamente 11,52 g de SM, 4,32 g de fosfolípido PEG y 4,32 g de colesterol. Para los Ejemplos comparativos 2 a 10, las cantidades de SM o DHSM derivada de huevos de gallina, fosfolípido PEG y colesterol se cambiaron a las relaciones descritas en la Tabla 1. El lípido se mezcló con 381 ml de etanol y se disolvió a 65 °C para preparar una fase oleosa.

20 (b1) Preparación de la fase acuosa 1

Se disolvieron 25,2 g de sulfato de amonio en 1118,5 g de agua para preparar la fase acuosa 1.

(b2) Preparación de la fase acuosa 2

25 Se disolvieron 5,04 g de sulfato de amonio en 223,7 g de agua para preparar la fase acuosa 2.

(c) Formación de partículas liposómicas mediante emulsificación

30 La fase acuosa 1 preparada en (b1) se calentó a 65 °C, se le añadió toda la fase oleosa preparada en (a) y después estas fases se mezclaron con un dispersor de emulsificación de precisión a una velocidad circunferencial de 26 m/s durante 60 minutos. Posteriormente, se añadió a ello la fase acuosa 2 a temperatura ambiente, seguido de continuar agitando a una velocidad circunferencial de 0,1 m/s mientras se calentaba a 65 °C para evaporar el disolvente orgánico y el agua. En el caso en el que el líquido se concentró a 600 ml, se detuvieron el calentamiento y la agitación y, por lo tanto, se terminó la evaporación.

(e) Reemplazo del líquido de la fase acuosa externa de liposomas mediante diálisis

40 Se usó una solución acuosa de NaCl al 3,15 % en masa como líquido de diálisis. Utilizando este líquido de diálisis, el líquido obtenido en (c) se sometió a filtración de flujo cruzado a temperatura ambiente para eliminar el sulfato de amonio presente en la fase acuosa externa para obtener liposomas en los que la fase acuosa externa se reemplazó con el líquido de diálisis.

(f) Encapsulación de topotecán en partículas liposómicas mediante carga remota

45 Se añadió agua para inyección a clorhidrato de topotecán (fabricado por Biocompounds Pharmaceutical Inc.) a 5 mg/ml. Además, mientras se agita bien el líquido, se añadió una solución de HCl 8 mol/l para ajustar el pH a aproximadamente 3 para disolver el topotecán. Se añadieron liposomas a la solución de topotecán resultante en una relación de volumen de 1/1, seguido de calentamiento a 60 °C durante 60 minutos.

(g) Eliminación del topotecán en fase acuosa externa mediante diálisis

55 Se preparó como líquido de diálisis un tampón sacarosa/histidina que consistía en sacarosa al 9,4 % en masa e histidina 10 mmol/l. Utilizando este líquido de diálisis, el líquido obtenido en (f) se sometió a filtración de flujo cruzado a temperatura ambiente para eliminar el topotecán presente en la fase acuosa externa para obtener liposomas que contienen topotecán en los que la fase acuosa externa se reemplazó con el líquido de diálisis.

<Ejemplos Comparativos 11 y 12>

60 (a) Preparación de la fase oleosa

Para el Ejemplo comparativo 11, se pesaron respectivamente 0,517 g de DHSM derivada de huevo de gallina y 0,233 g de colesterol. Para el Ejemplo comparativo 12, las cantidades de SM y colesterol se cambiaron a las relaciones descritas en la Tabla 1. Para marcar liposomas con Dil (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina), una cantidad de Dil, que fue de 0,2 % en moles con respecto a los lípidos totales, se pesó y se disolvió en etanol. Se añadió etanol a la solución en etanol de Dil para obtener un volumen total de 1,5 ml, y el lípido pesado y este disolvente orgánico se mezclaron y se calentaron a 65 °C para disolver el lípido y formar una fase oleosa.

10 (b) Preparación de la fase acuosa

Se disolvieron 0,9 g de sulfato de amonio y 2,16 g de sacarosa en 13,5 g de agua para preparar una fase acuosa.

15 (c) Formación de partículas liposómicas mezclando fase oleosa y fase acuosa

La fase acuosa preparada en (b) se calentó a 65 °C y se agitó con un agitador magnético (3000 rpm). Toda la fase oleosa preparada en (a) se calentó a 65 °C con una placa caliente, y toda la fase oleosa se succionó con una jeringa y se calentó durante 5 minutos con una placa caliente. La fase oleosa se añadió gota a gota durante 30 segundos a la fase acuosa calentada.

20 (d) Regulación del tamaño de partícula mediante extrusora

El líquido obtenido en (c) se sometió a la regulación del tamaño de partícula haciéndolo pasar secuencialmente a través de un filtro usando una extrusora (Mini Extruder, fabricada por Avanti Polar Lipids, Inc.) con calentamiento a 25 70 °C.

(e) Reemplazo del líquido de la fase acuosa externa de liposomas mediante diálisis

30 Se usó una solución acuosa de NaCl al 0,09 % en masa como líquido de diálisis. Utilizando este líquido de diálisis, el líquido obtenido en (c) o (d) se sometió a diálisis a temperatura ambiente para eliminar el sulfato de amonio presente en la fase acuosa externa para obtener liposomas en los que la fase acuosa externa se reemplazó con el líquido de diálisis.

35 (f) Encapsulación de topotecán en partículas liposómicas mediante carga remota

Se añadió agua para inyección a clorhidrato de topotecán (fabricado por Biocompounds Pharmaceutical Inc.) a 5 mg/ml. Además, mientras se agita bien el líquido, se añadió una solución de HCl 8 mol/l para ajustar el pH a aproximadamente 3 para disolver el topotecán. Se añadieron liposomas a la solución de topotecán resultante en una relación de volumen de 1/1, seguido de calentamiento a 60 °C durante 120 minutos.

40 (g) Eliminación del topotecán en fase acuosa externa mediante diálisis

45 Se preparó como líquido de diálisis un tampón sacarosa/histidina que consistía en sacarosa al 9,4 % en masa e histidina 10 mmol/l. Utilizando este líquido de diálisis, el líquido obtenido en (f) se sometió a diálisis a temperatura ambiente para eliminar el topotecán presente en la fase acuosa externa para obtener liposomas que contienen topotecán en los que la fase acuosa externa se reemplazó con el líquido de diálisis.

<Ejemplos 1 a 8>

50 (a) Preparación de la fase oleosa

Para el Ejemplo 1, se pesaron respectivamente 11,52 g de DHSM derivada de huevo de gallina, 4,32 g de fosfolípido PEG (SUNBRIGHT DSPE-020CN, fabricado por NOF Corporation, en lo sucesivo denominado DSPE-PEG) y 4,32 g de colesterol. Para los Ejemplos 2 a 8, las cantidades de DHSM, DSPE-PEG y colesterol se cambiaron a las relaciones descritas en la Tabla 2. El lípido se mezcló con 381 ml de etanol y se disolvió a 65 °C para preparar una fase oleosa.

(b1) Preparación de la fase acuosa 1

60 Se disolvieron 25,2 g de sulfato de amonio en 1118,5 g de agua para preparar la fase acuosa 1.

(b2) Preparación de la fase acuosa 2

Se disolvieron 5,04 g de sulfato de amonio en 223,7 g de agua para preparar la fase acuosa 2.

65 (c) Formación de partículas liposómicas mediante emulsificación

La fase acuosa 1 preparada en (b1) se calentó a 65 °C, se le añadió toda la fase oleosa preparada en (a) y después estas fases se mezclaron con un dispersor de emulsificación de precisión a una velocidad circunferencial de 26 m/s durante 60 minutos. Posteriormente, se añadió a ello la fase acuosa 2 a temperatura ambiente, seguido de continuar agitando a una velocidad circunferencial de 0,1 m/s mientras se calentaba a 65 °C para evaporar el disolvente orgánico y el agua. En el caso en el que el líquido se concentró a 600 ml, se detuvieron el calentamiento y la agitación y, por lo tanto, se terminó la evaporación.

(e) Reemplazo del líquido de la fase acuosa externa de liposomas mediante diálisis

10 Se usó una solución acuosa de NaCl al 3,15 % en masa como líquido de diálisis. Utilizando este líquido de diálisis, el líquido obtenido en (c) se sometió a filtración de flujo cruzado a temperatura ambiente para eliminar el sulfato de amonio presente en la fase acuosa externa para obtener liposomas en los que la fase acuosa externa se reemplazó con el líquido de diálisis.

15 (f) Encapsulación de topotecán en partículas liposómicas mediante carga remota

Se añadió agua para inyección a clorhidrato de topotecán (fabricado por Biocompounds Pharmaceutical Inc.) a 5 mg/ml. Además, mientras se agita bien el líquido, se añadió una solución de HCl 8 mol/l para ajustar el pH a aproximadamente 3 para disolver el topotecán. Se añadieron liposomas a la solución de topotecán resultante en una relación de volumen de 1/1, seguido de calentamiento a 60 °C durante 60 minutos.

(g) Eliminación del topotecán en fase acuosa externa mediante diálisis

25 Se preparó como líquido de diálisis un tampón sacarosa/histidina que consistía en sacarosa al 9,4 % en masa e histidina 10 mmol/l. Utilizando este líquido de diálisis, el líquido obtenido en (f) se sometió a filtración de flujo cruzado a temperatura ambiente para eliminar el topotecán presente en la fase acuosa externa para obtener liposomas que contienen topotecán en los que la fase acuosa externa se reemplazó con el líquido de diálisis.

<Ejemplos 9 y 10>

30 (a) Preparación de la fase oleosa

Para el Ejemplo 9, se pesaron respectivamente 0,412 g de DHSM derivada de huevo de gallina, 0,153 g de DSPE-PEG y 0,153 g de colesterol. Para el Ejemplo 10, las cantidades de DHSM derivada de huevos de gallina, DSPE-PEG y colesterol se cambiaron a las relaciones descritas en la Tabla 2. Para marcar liposomas con Dil, se pesó y se disolvió en etanol una cantidad de Dil, que fue del 0,2 % en moles con respecto a los lípidos totales. Se añadió etanol a la solución de etanol Dil resultante para obtener un volumen total de 11,25 ml y se le añadieron además 3,75 ml de acetato de etilo. El lípido pesado y este disolvente orgánico se mezclaron y se calentaron a 60 °C para disolver el lípido, preparando así una fase oleosa.

(b) Preparación de la fase acuosa

Se disolvieron 0,9 g de sulfato de amonio en 40 g de agua para preparar una fase acuosa.

45 (c) Formación de partículas liposómicas mediante emulsificación

La fase acuosa preparada en (b) se calentó a 70 °C, se le añadió toda la fase oleosa preparada en (a) (relación en volumen: fase acuosa/fase oleosa = 8/3), y después se mezclaron estas fases usando una máquina de emulsificación (homogeneizador Excel Auto ED-3, fabricado por Nippon Seiki Seisakusho Co., Ltd.) a 3000 rpm (rotación por minuto: $1/60 \text{ s}^{-1}$) por 30 minutos. A esto le siguió continuar la agitación a 300 rpm mientras se calentaba a 65 °C para evaporar el disolvente orgánico y el agua. En el caso en el que el líquido se concentró hasta 15 g, se detuvieron el calentamiento y la agitación y, por lo tanto, se terminó la evaporación.

(d) Regulación del tamaño de partícula mediante extrusora

55 El líquido obtenido en (c) se sometió a la regulación del tamaño de partícula haciéndolo pasar secuencialmente a través de un filtro usando una extrusora (Mini Extruder, fabricada por Avanti Polar Lipids, Inc.) con calentamiento a 70 °C.

60 (e) Reemplazo del líquido de la fase acuosa externa de liposomas mediante diálisis

Se usó una solución acuosa de NaCl al 0,09 % en masa como líquido de diálisis. Utilizando este líquido de diálisis, el líquido obtenido en (c) o (d) se sometió a diálisis a temperatura ambiente para eliminar el sulfato de amonio presente en la fase acuosa externa para obtener liposomas en los que la fase acuosa externa se reemplazó con el líquido de diálisis.

(f) Encapsulación de topotecán en partículas liposómicas mediante carga remota

5 Se añadió agua para inyección a clorhidrato de topotecán (fabricado por Biocompounds Pharmaceutical Inc.) a 5 mg/ml. Además, mientras se agita bien el líquido, se añadió una solución de HCl 8 mol/l para ajustar el pH a aproximadamente 3 para disolver el topotecán. Se añadieron liposomas a la solución de topotecán resultante en una relación de volumen de 1/1, seguido de calentamiento a 60 °C durante 120 minutos.

(g) Eliminación del topotecán en fase acuosa externa mediante diálisis

10 Se preparó como líquido de diálisis un tampón sacarosa/histidina que consistía en sacarosa al 9,4 % en masa e histidina 10 mmol/l. Utilizando este líquido de diálisis, el líquido obtenido en (f) se sometió a diálisis a temperatura ambiente para eliminar el topotecán presente en la fase acuosa externa para obtener liposomas que contienen topotecán en los que la fase acuosa externa se reemplazó con el líquido de diálisis.

15 [Medición y evaluación de propiedades físicas]

<Tamaño de partícula promedio>

20 En la presente invención, el tamaño de partícula promedio se refiere a un tamaño de partícula promedio acumulativo medido mediante un método de dispersión dinámica de luz. Los tamaños de partícula promedio en cada uno de los Ejemplos y Ejemplos Comparativos descritos en la tabla es un tamaño de partícula promedio acumulativo medido mediante un método de dispersión dinámica de luz usando un analizador de tamaño de partícula de sistema concentrado FPAR-1000AS (fabricado por Otsuka Electronics Co., Ltd.) con un muestreador automático. Los resultados de medición se muestran en las Tablas 1 y 2.

25

<Medición de la concentración de topotecán>

30 Las Tablas 1 y 2 muestran los resultados de la cuantificación de la concentración de topotecán midiendo una muestra con un aparato de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) Nexera-i LC-2040C (fabricado por Shimadzu Corporation). El método de medición específico es el siguiente.

35 En los liposomas de las Tablas 1 y 2, el porcentaje del fármaco contenido en la fase acuosa interna del liposoma con respecto al fármaco en toda la composición liposómica fue de al menos el 95 %, excepto para el Ejemplo comparativo 10. Para el Ejemplo comparativo 10, el porcentaje del fármaco contenido en la fase acuosa interna del liposoma con respecto al fármaco en toda la composición liposómica fue del 59 %.

Medición de la cantidad de topotecán en la preparación liposómica

40 El líquido de los liposomas preparado se disolvió en metanol y después se filtró para preparar una solución de muestra y se diluyó clorhidrato de topotecán para preparar una solución patrón de curva de calibración. Usando la solución de muestra y la solución patrón de la curva de calibración preparada de este modo, la cantidad de topotecán en la preparación liposómica se midió mediante cromatografía de líquidos/detección de absorbancia UV-vis.

45 La concentración de topotecán en la fase acuosa interna se calculó restando la concentración de topotecán en la fase acuosa externa de la concentración de topotecán en toda la fase acuosa.

La concentración de topotecán en cada fase acuosa se midió como sigue.

50 (Concentración de topotecán en toda la fase acuosa)

Se midieron 50 µl del líquido de dispersión de liposomas y se le añadieron 950 µl de metanol, seguido de agitación con un vórtice durante 1 minuto. Se midieron 100 µl del líquido y se le añadieron 900 µl de agua Milli-Q, seguido de agitación con un vórtice durante 1 minuto para preparar una muestra para el análisis por HPLC.

55 (Concentración de topotecán en la fase acuosa externa)

60 Se midieron 50 µl del líquido de dispersión de liposomas y después se diluyeron añadiendo 450 µl de una solución acuosa de sacarosa al 9,4 % en peso/histidina 10 mM. Se añadieron 200 µl de PBS a 100 µl del líquido diluido que después se mezcló por inversión. El líquido de dispersión se ultracentrifugó (200.000 g, 20 °C, 60 minutos) y el sobrenadante se usó como muestra de análisis de HPLC. La ultracentrífuga utilizada fue Himac CP80WX (fabricada por Hitachi, Ltd).

a) Preparación de la solución patrón de curva de calibración

65 Se pesaron aproximadamente 20 mg de clorhidrato de topotecán y se disolvieron en 20 ml de una solución acuosa de metanol al 10 % en masa. Se añadió agua Milli-Q a este líquido para preparar una solución que tenía una

ES 2 984 148 T3

concentración de clorhidrato de topotecán de 0,1, 1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0 o 100,0 ppm, que después se usó como solución patrón de curva de calibración.

b) Preparación de la solución de muestra

5 (1) Se pesaron aproximadamente 50 µl de una muestra (solución de preparación liposómica) mediante MICROMAN (marca registrada), y se le añadieron aproximadamente 950 µl de metanol pesados mediante MICROMAN. Después de agitar durante aproximadamente 1 minuto, se confirmó visualmente que la solución se volvía transparente.

10 (2) Se pesaron 100 µl de la solución de (1) anterior por MICROMAN y se le añadieron aproximadamente 900 µl de agua Milli-Q pesados con una micropipeta. Este líquido se agitó durante aproximadamente 1 minuto, se sometió a ultrasonidos durante aproximadamente 1 minuto y se agitó adicionalmente durante aproximadamente 10 segundos.

15 (3) La solución obtenida al filtrar la solución de (2) anterior a través de un filtro DISMIC (marca registrada) (diámetro de poro: 0,45 µm) se usó como solución de muestra.

c) Medición

20 La medición se realizó en las siguientes condiciones mediante cromatografía de líquidos/detección de absorbancia UV-vis.

Longitud de onda de medición: 382 nm, columna: Shiseido CAPCELLPAK C18 ACR 3 µm_3,0 mm*75 mm
Temperatura de la columna: temperatura constante de aproximadamente 40 °C

25 Ambas fases móviles A y B son una mezcla de agua/metanol/ácido trifluoroacético, y la alimentación de las fases móviles se realizó cambiando la relación de mezcla de las fases móviles A y B para controlar un gradiente de concentración.

30 La medición se realizó en las condiciones de un caudal: 1,0 ml/minuto, un volumen de inyección: 10 µl y una temperatura del muestreador automático: temperatura constante de aproximadamente 25 °C.

<Medición de la concentración de iones sulfato>

35 La muestra se midió con un aparato de cromatografía iónica 883 Basic IC plus (fabricado por Metrohm AG) para cuantificar la concentración de iones sulfato. Los resultados de medir la relación molar de iones sulfato con respecto a topotecán se muestran en las Tablas 1 y 2. En los liposomas de las Tablas 1 y 2, el porcentaje de iones sulfato contenidos en la fase acuosa interna del liposoma con respecto a iones sulfato en toda la composición liposómica fue de al menos el 90 %.

40 La concentración de iones sulfato en la fase acuosa interna se calculó restando la concentración de iones sulfato en la fase acuosa externa de la concentración de iones sulfato en toda la fase acuosa. La concentración de iones sulfato en cada fase acuosa se midió como sigue.

(Concentración de iones sulfato en toda la fase acuosa)

45 Se midieron 50 µl del líquido de dispersión de liposomas y se le añadieron 950 µl de metanol, seguido de mezcla con ultrasonidos durante 15 segundos. Se midieron 90 µl del líquido y se les añadieron 810 µl de agua para inyección (fabricada por Hikari Pharmaceutical Co., Ltd.), seguido de mezcla con ultrasonidos durante 30 segundos. Se añadieron 900 µl de acetato de etilo a la solución resultante que después se agitó bien para extraer los lípidos en una fase de acetato de etilo. Se midió una cantidad apropiada del líquido de la fase acuosa y se usó para el análisis por cromatografía iónica.

(Concentración de iones sulfato en la fase acuosa externa)

55 Se midieron 100 µl del líquido de dispersión de liposomas y después se diluyeron añadiendo 900 µl de solución de glucosa al 5 % (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.). Se trataron 450 µl del líquido resultante mediante ultrafiltración y el filtrado se usó como muestra de análisis por cromatografía iónica.

60 Las condiciones de centrifugación fueron 7400 g, 5 °C y 30 minutos. La centrifuga utilizada fue Himac CF15RXII (fabricada por Hitachi, Ltd).

<Medición del AUC>

65 Los ratones a los que se les administraron los liposomas preparados que contenían topotecán (dosis: 1 mg/kg en términos de cantidad de fármaco) se sangraron a las 0,25, 2, 6 y 24 horas después de la administración. La sangre se centrifugó a 800 xg durante 10 minutos para recuperar el plasma. La concentración de topotecán se cuantificó para el

5 plasma recogido mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas/espectrometría de masas (CL/EM/EM). Usando el software de análisis farmacocinético WinNonlin (marca registrada) (disponible en Certara, L.P.), el área bajo la curva de concentración en sangre-tiempo (AUC) hasta un tiempo infinito después de la administración única se calculó a partir de la transición de la concentración de topotecán obtenida de este modo. La unidad de AUC es tiempo×ng/ml (expresado como h*ng/ml en la tabla). Además, el AUC del liposoma descrito en ["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.onco-oncology.jp/contents/patient/opdivo_faq/11.html>] se calcula en 68152 horas × ng/ml.

[Tabla 1]

	Tamaño de partícula promedio nm	Concentración de topotecán en toda la fase acuosa ppm	SO ₄ ²⁻ en fase acuosa interna/topotecán en fase acuosa completa mol/mol	Relación molar de componentes constituyentes de la membrana liposómica				Dosis mg/kg	ABC h*ng/ml	Porcentaje de topotecán en la fase acuosa interna %	Porcentaje de SO ₄ ²⁻ en la fase acuosa interna %
				PEG	Col	DHSM	MP				
Ejemplo comparativo 1	101,7	2419	0,70	4,7 %	37 %	0 %	58 %	1,0	120189	99	100
Ejemplo comparativo 2	96,3	2605	0,75	4,8 %	42 %	0 %	53 %	1,0	136669	100	100
Ejemplo comparativo 3	90,2	2993	1,57	4,5 %	42 %	0 %	54 %	1,0	140108	100	98
Ejemplo comparativo 4	105,2	2889	1,58	4,6 %	47 %	0 %	48 %	1,0	137082	100	98
Ejemplo comparativo 5	91,1	2946	1,01	4,9 %	47 %	0 %	48 %	1,0	157878	100	96
Ejemplo comparativo 6	99,3	2994	1,01	4,7 %	39 %	0 %	56 %	1,0	143615	100	100
Ejemplo comparativo 7	101,2	3080	0,96	4,7 %	39 %	0 %	56 %	1,0	119518	100	98
Ejemplo comparativo 8	100,8	2437	1,14	4,7 %	39 %	0 %	57 %	1,0	173179	100	98
Ejemplo comparativo 9	90,8	1191	0,32	5,0 %	38 %	57 %	0 %	1,0	140277	100	100
Ejemplo comparativo 10	131,2	1328	0,3	4,4 %	36 %	59 %	0 %	1,0	174087	59	100
Ejemplo comparativo 11	106	1876	-	0 %	43 %	57 %	0 %	1,0	182694	99	-
Ejemplo comparativo 12	111,2	2437	-	0 %	45 %	0 %	55 %	1,0	134591	100	-

[Tabla 2]

	Tamaño de partícula promedio nm	Concentración de topotecán en toda la fase acuosa ppm	SO ₄ ²⁻ en fase acuosa interna/topotecán en fase acuosa completa mol/mol	Relación molar de componentes constituyentes de la membrana liposómica				Dosis mg/kg	ABC h*ng/ml	Porcentaje de topotecán en la fase acuosa interna %	Porcentaje de SO ₄ ²⁻ en la fase acuosa interna %
				PEG	Col	DHSM	MP				
Ejemplo 1	100	2160	0,66	5,6 %	40 %	54 %	0 %	1,0	227895	99	97
Ejemplo 2	122	2347	1,38	5,3 %	39 %	56 %	0 %	1,0	201264	100	100
Ejemplo 3	88	2353	1,16	5,4 %	38 %	56 %	0 %	1,0	270579	99	100
Ejemplo 4	111,3	2167	1,05	5,2 %	38 %	57 %	0 %	1,0	295476	99	98
Ejemplo 5	115,9	2659	0,8	5,1 %	35 %	60 %	0 %	1,0	330913	100	100
Ejemplo 6	125,2	1349	0,9	4,4 %	36 %	60 %	0 %	1,0	261345	99	100
Ejemplo 7	120,3	3984	0,6	5,0 %	43 %	52 %	0 %	1,0	278684	98	98
Ejemplo 8	116,8	2254	1,1	5,1 %	43 %	52 %	0 %	1,0	307412	99	98
Ejemplo 9	101	1561	0,73	10,0 %	40 %	50 %	0 %	1,0	245450	100	100
Ejemplo 10	104	1758	0,68	5,1 %	40 %	55 %	0 %	1,0	270294	100	92

5 Como puede observarse a partir de los resultados de las Tablas 1 y 2, en los Ejemplos 1 a 10 de la composición liposómica que incluye una diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo, una dihidroesfingomielina y colesterol como componentes constituyentes de una membrana liposómica, en la que una fase acuosa interna contiene sulfato de amonio, y una relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en toda la fase acuosa es de 0,36 o más, se demostró que el valor medido de AUC es de 200.000 o más y, por lo tanto, se puede lograr una alta retención en la sangre.

10 Por otra parte, en los Ejemplos Comparativos 1 a 8 en los que no se usa dihidroesfingomielina, los Ejemplos comparativos 9 y 10 en los que la relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en toda la fase acuosa es inferior a 0,36 y los Ejemplos comparativos 11 y 12 en los que no se usa diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo, se demostró que el valor medido de AUC es inferior a 200.000, que es inferior a los Ejemplos 1 a 10.

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

20 Clorhidrato de topotecán: 20 mg
 HSPC (Nota 1): 95,8 mg
 MPEG-DSPE (Nota 2): 31,9 mg
 Colesterol: 31,9 mg
 Sulfato de amonio: 20 mg
 L-histidina: 15,5 mg
 Azúcar blanco purificado: 940 mg
 Agente de ajuste del pH: c.s.

25 La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención se produjo basándose en los Ejemplos mencionados anteriormente. Se confirmó que la relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en toda la fase acuosa era de 0,36 o más.

30 Se usó InVivoMAb anti-PD-L1 de ratón (fabricado por Bio X Cell) como anticuerpo anti-PD-L1.

La solución de histidina 10 mM/sacarosa al 9,4 % es una solución en la que la concentración de histidina es de 10 mM en una solución acuosa que contiene 9,4 g/100 ml de sacarosa.

35 Las células MBT-2 se obtuvieron del JCRB Cell Bank.

(Ensayo de eficacia del fármaco con el uso combinado de anticuerpo anti-PD-L1 en un modelo de ratón con tumor con trasplante subcutáneo de MBT-2)

40 Como sustancias de ensayo se usaron un anticuerpo anti-PD-L1 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado Ab contra PD-L1) y una composición liposómica que contiene topotecán de acuerdo con la realización de la presente invención (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado Lipo). Para la dilución de Ab contra PD-L1, se usó tampón de dilución InVivoPure pH 6,5 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado líquido de dilución de Ab, fabricado por Bio X Cell). Para la dilución de Lipo, se usó una solución de
 45 histidina 10 mM/sacarosa al 9,4 % (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada líquido de dilución de Lipo).

50 Se trasplantaron por vía subcutánea 3×10^6 células MBT-2, que es una estirpe celular de cáncer de vejiga de ratón, en el flanco de ratones hembra C3H/HeN para formar tumores subcutáneos. Usando el volumen tumoral como índice, se evaluaron los efectos inhibidores de Ab contra PD-L1 solo, Lipo solo y una combinación de Ab contra PD-L1 y Lipo sobre el crecimiento del tumor subcutáneo. El Ab contra PD-L1 y el líquido de dilución de Ab se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante un total de 3 semanas. La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención y el líquido de dilución de la misma se administraron una vez a la semana mediante
 55 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 3 semanas.

Con respecto a una configuración de grupo,

60 el Grupo 1 era un grupo al que se le administraron un líquido de dilución de Ab y un líquido de dilución de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención,
 el Grupo 2 era un grupo al que se le administraron Ab contra PD-L1 (10 mg/kg) y un líquido de dilución de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención,
 el Grupo 3 era un grupo al que se le administraron un líquido de dilución de Ab y la composición liposómica (1 mg/kg) de acuerdo con la realización de la presente invención, y
 65 el Grupo 4 era un grupo al que se le administraron Ab contra PD-L1 (10 mg/kg) y la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención (1 mg/kg).

5 Los Grupos 1 a 3 corresponden a Ejemplos comparativos y el Grupo 4 corresponde al Ejemplo. La configuración del grupo y la dosis se muestran en la Tabla 3. En la Tabla 3, "Lipo" representa la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, "Abdomen" representa la administración intraperitoneal, "Cola" representa la administración en la vena de la cola, "Dos veces/Sx3" representa dos veces por semana durante un total de 3 semanas y "Una vez/Sx3" representa una vez por semana durante un total de 3 semanas. Además, los cambios en el volumen tumoral para cada individuo en cada grupo se muestran en las Fig. 1 a 4.

[Tabla 3]

Grupo	Sustancia de ensayo	Dosis (mg/kg/administración)		Ab contra PD-L1 y líquido de dilución		Lipo y líquido de dilución de Lipo		Dosificación (ml/kg)
		Ab contra PD-L1	Lipo	Vía de administración	Pausa de administración	Vía de administración	Pausa de administración	
1	Líquido de dilución de Ab + Líquido de dilución de Lipo	0	0	Abdomen	Dos veces/Sx3	Cola	Una vez/Sx3	10
2	Ab contra PD-L1 + Líquido de dilución de Lipo	10	0	Abdomen	Dos veces/Sx3	Cola	Una vez/Sx3	10
3	Líquido de dilución de Ab + Lipo	0	1	Abdomen	Dos veces/Sx3	Cola	Una vez/Sx3	10
4	Ab contra PD-L1 + Lipo	10	1	Abdomen	Dos veces/Sx3	Cola	Una vez/Sx3	10

La Tabla 4 muestra el número de individuos que mantuvieron un estado de remisión completa en cada grupo hasta el día de la finalización del ensayo y la tasa de remisión completa (%).

[Tabla 4]

Grupo	Número de personas que permanecieron en remisión completa	Número de individuos en el grupo	Tasa de remisión completa (%)
1	0	9	0
2	1	9	11,1
3	0	9	0
4	4	9	44,4

5 En el Grupo 1 y el Grupo 3, ningún individuo permaneció en remisión completa. En el Grupo 2, 1 de cada 9 individuos permaneció en remisión completa. En el Grupo 4, 4 de cada 9 individuos permaneció en remisión completa.

10 A partir de los resultados anteriores, la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, en el caso de usarse en combinación con Ab contra PD-L1, presentó un excelente efecto inhibitor del crecimiento con respecto al efecto de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención sola o Ab contra PD-L1 solo. Además, se descubrió que el uso combinado de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención con Ab contra PD-L1 presenta un efecto significativo e inesperado de que se observa un estado de remisión completa.

15 (Ensayo de eficacia del fármaco con el uso combinado de anticuerpo anti-PD-1 en un modelo de ratón con tumor con trasplante subcutáneo de CT26.WT)

20 Se usó InVivoMAb anti-PD-1 de ratón (fabricado por Bio X Cell) como anticuerpo anti-PD-1. La solución de histidina 10 mM/sacarosa al 9,4 % es una solución preparada de manera que la concentración de histidina es de 10 mM en una solución acuosa que contiene 9,4 g/100 ml de sacarosa. Las células CT26.WT se obtuvieron en ATCC.

25 Como sustancias de ensayo se usaron un anticuerpo anti-PD-1 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado Ab contra PD-1) y la composición liposómica que contiene topotecán (Lipo) de acuerdo con la realización de la presente invención. Para la dilución de Ab contra PD-1, se usó tampón de dilución InVivoPure pH 7,0 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado líquido de dilución de Ab, fabricado por Bio X Cell). Para la dilución de Lipo, se usó una solución de histidina 10 mM/sacarosa al 9,4 % (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada líquido de dilución de Lipo).

30 Se trasplantaron por vía subcutánea 1×10^6 células CT26.WT, que es una estirpe celular de cáncer de colon de ratón, en el flanco de ratones hembra BALB/cCrSlc para formar tumores subcutáneos. Se realizaron tratamientos con PD-1 Ab solo, Lipo solo y una combinación de PD-1 Ab y Lipo a partir del día 13 postrasplante, y se evaluó el efecto de prolongar el tiempo de supervivencia debido a la inhibición del crecimiento del tumor subcutáneo. El Ab contra PD-1 y el líquido de dilución de Ab se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante un total de 3 semanas. La composición liposómica (Lipo) de acuerdo con la realización de la presente invención y el líquido de dilución de la misma se administraron una vez a la 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 3 semanas. Los ratones cuyo volumen tumoral superó los 2.000 mm³ fueron sacrificados desde el punto de vista del bienestar animal. El análisis de supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan-Meier y la diferencia significativa se determinó mediante el ensayo de intervalo logarítmico.

Con respecto a una configuración de grupo,

45 El Grupo 1 fue un grupo al que se le administró un líquido de dilución de Ab y un líquido de dilución de Lipo, el Grupo 2 fue un grupo al que se le administró Ab contra PD-1 (10 mg/kg) y un líquido de dilución de Lipo, el Grupo 3 era un grupo al que se le administraron un líquido de dilución de Ab y la composición liposómica (2 mg/kg) de acuerdo con la realización de la presente invención, y el Grupo 4 era un grupo al que se le administraron Ab contra PD-1 (10 mg/kg) y la composición liposómica (2 mg/kg) de acuerdo con la realización de la presente invención.

50 Los Grupos 1 a 3 corresponden a Ejemplos comparativos y el Grupo 4 corresponde al Ejemplo. La configuración del grupo y la dosis se muestran en la Tabla 5. En la Tabla 5, "Lipo" representa la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, "Abdomen" representa la administración intraperitoneal, "Cola" representa la administración en la vena de la cola, "Dos veces/Sx3" representa dos veces por semana durante un total de 3 semanas y "Una vez/Sx3" representa una vez por semana durante un total de 3 semanas. Además, la curva de supervivencia de cada grupo se muestra en la Fig. 5.

[Tabla 5]

Grupo	Sustancia de ensayo	Dosis (mg/kg/administración)		Ab contra PD-1 y líquido de dilución de Ab		Lipo y líquido de dilución de Lipo		Dosisificación (ml/kg)
		Ab contra PD-1	Lipo	Via de administración	Pauta de administración	Via de administración	Pauta de administración	
1	Líquido de dilución de Ab + Líquido de dilución de Lipo	0	0	Abdomen	Dos veces/Sx3	Cola	Una vez/Sx3	10
2	Ab contra PD-1 + Líquido de dilución de Lipo	10	0	Abdomen	Dos veces/Sx3	Cola	Una vez/Sx3	10
3	Líquido de dilución de Ab + Lipo	0	2	Abdomen	Dos veces/Sx3	Cola	Una vez/Sx3	10
4	Ab contra PD-1 + Lipo	10	2	Abdomen	Dos veces/Sx3	Cola	Una vez/Sx3	10

La Tabla 6 muestra la mediana del tiempo de supervivencia calculada a partir del momento del trasplante en cada grupo y la tasa de supervivencia (%) el día de la finalización del ensayo, y la Tabla 7 muestra los resultados del ensayo de intervalo logarítmico. En el caso en el que un valor de p fuera inferior a 0,05, se determinó que había una diferencia estadísticamente significativa.

5

[Tabla 6]

Grupo	Mediana del tiempo de supervivencia	Tasa de supervivencia en la fecha de terminación
1	27	0 %
2	31	28,6 %
3	39,5	0 %
4	ND > 52	75 %

[Tabla 7]

Grupo comparativo	Valor de p	Diferencia significativa
1 frente a 2	p = 0,1227	Sin diferencia significativa
1 frente a 3	p = 0,0001	Diferencia significativa
1 frente a 4	p = 0,0001	Diferencia significativa
2 frente a 3	p = 0,8334	Sin diferencia significativa
2 frente a 4	p = 0,0281	Diferencia significativa
3 frente a 4	p = 0,0020	Diferencia significativa

10 El Grupo 4 presentó un efecto estadísticamente significativo de prolongación del tiempo de supervivencia con respecto a cada uno de los Grupos 1 a 3 que son Ejemplos comparativos, y el 75 % de los individuos sobrevivieron el día de la finalización del ensayo.

15 A partir de los resultados anteriores, está claro que la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, en el caso de usarse en combinación con Ab contra PD-1, muestra un excelente efecto de prolongación de la supervivencia con respecto al efecto de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención sola o Ab contra PD-1 solo.

(Ensayo de eficacia del fármaco con el uso combinado de anticuerpo anti-CTLA-4 en ratón de modelo de EMT6)

20

Se usó InVivoMAb anti-CTLA-4 de ratón (fabricado por Bio X Cell) como anticuerpo anti-CTLA-4.

25 Como sustancias de ensayo se usaron un anticuerpo anti-CTLA-4 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado Ab contra CTLA-4) y la composición liposómica que contiene topotecán (Lipo) de acuerdo con la realización de la presente invención. Para la dilución de Ab contra CTLA-4, se usó tampón de dilución InVivoPure pH 7,0 (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado líquido de dilución de Ab, fabricado por Bio X Cell). Para la dilución de Lipo, se usó una solución de azúcar al 5 % (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada líquido de dilución de Lipo, fabricado por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.).

30 Se trasplantaron por vía subcutánea $2,25 \times 10^6$ células EMT6, que es 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 Ab contra CTLA-4 solo, Lipo solo y una combinación de Ab contra CTLA-4 y Lipo sobre el crecimiento del tumor subcutáneo. El Ab contra CTLA-4 y el líquido de dilución de Ab se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante un total de 3 semanas. La composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención y el líquido de dilución de la misma se administraron una vez a la 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.

40 Con respecto a una configuración de grupo,

45 el Grupo 1 era un grupo al que se le administraron un líquido de dilución de Ab y un líquido de dilución de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, el Grupo 2 era un grupo al que se le administraron Ab contra CTLA-4 (10 mg/kg) y un líquido de dilución de la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, el Grupo 3 era un grupo al que se le administraron un líquido de dilución de Ab y la composición liposómica (4

mg/kg) de acuerdo con la realización de la presente invención, y el Grupo 4 era un grupo al que se le administraron Ab contra CTLA-4 (10 mg/kg) y la composición liposómica (4 mg/kg) de acuerdo con la realización de la presente invención.

- 5 Los Grupos 1 a 3 corresponden a Ejemplos comparativos y el Grupo 4 corresponde al Ejemplo. La configuración del grupo y la dosis se muestran en la Tabla 8. En la Tabla 8, "Lipo" representa la composición liposómica de acuerdo con la realización de la presente invención, "Abdomen" representa la administración intraperitoneal, "Cola" representa la administración en la vena de la cola, "Dos veces/Sx3" representa dos veces por semana durante un total de 3 semanas y "Una vez/Sx3" representa una vez por semana durante un total de 3 semanas. Además, los cambios en el volumen tumoral para cada individuo en cada grupo se muestran en las Fig. 6 a 9.
- 10

[Tabla 8]

Grupo	Sustancia de ensayo	Dosis (mg/kg/administración)		Ab contra CTLA-4 y líquido de dilución		Líquido y líquido de dilución de Lipo		Dosisificación (ml/kg)
		Ab contra CTLA-4	Lipo	Vía de administración	Pauta de administración	Vía de administración	Pauta de administración	
1	Líquido de dilución de Ab + Líquido de dilución de Lipo	0	0	Abdomen	Dos veces/Sx3	Cola	Una vez/Sx3	10
2	Ab contra CTLA-4 + Líquido de dilución de Lipo	10	0	Abdomen	Dos veces/Sx3	Cola	Una vez/Sx3	10
3	Líquido de dilución de Ab + Lipo	0	4	Abdomen	Dos veces/Sx3	Cola	Una vez/Sx3	10
4	Ab contra CTLA-4 + Lipo	10	4	Abdomen	Dos veces/Sx3	Cola	Una vez/Sx3	10

A partir de los resultados anteriores, se demostró que la formulación farmacéutica de acuerdo con la realización de la presente invención es muy útil para prevenir o tratar el cáncer y tiene un efecto inhibidor del crecimiento tumoral inesperado.

5 En particular, se ha hecho posible proporcionar una nueva formulación farmacéutica administrando una composición liposómica que incluye topotecán en combinación con al menos un anticuerpo que inhibe PD-1, PD-L1 y CTLA-4 como inhibidor de punto de control inmunitario.

10 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, como componentes constituyentes de una membrana liposómica, una diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo; una dihidroesfingomielina; y colesteroles, la composición liposómica incluye un fármaco y tiene una fase acuosa interna que contiene sulfato de amonio, una relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en una fase acuosa completa es de 0,36 o más,

10 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.
 - 15 2. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el fármaco es topotecán o una sal del mismo, doxorubicina o una sal de la misma, irinotecán o una sal del mismo, o sunitinib o una sal del mismo.
 3. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2,

20 en donde la relación molar de iones sulfato en la fase acuosa interna con respecto al fármaco en toda la fase acuosa es de 0,6 o más y 1,8 o menos.
 4. La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,

25 en donde la diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo es una diacilfosfatidiletanolamina modificada con polietilenglicol o metoxipolietilenglicol.
 5. La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,

30 en donde un porcentaje de la diacilfosfatidiletanolamina modificada con polímero hidrófilo en los componentes constituyentes de la membrana liposómica es del 2 al 10 % en moles.
 6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,

en donde un porcentaje de colesteroles en los componentes constituyentes de la membrana liposómica es del 35 al 43 % en moles.
 - 35 7. La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde un tamaño de partícula es de 150 nm o menos medido usando un método de dispersión dinámica de luz.
 8. La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7,

40 en donde una fase acuosa externa tiene un pH de 5,5 a 8,5.
 9. La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,

en donde la dihidroesfingomielina es una dihidroesfingomielina que contiene un grupo alquilo de cadena larga que tiene 16 átomos de carbono y un grupo alquilo de cadena larga que tiene 18 átomos de carbono, y un fármaco incluido es topotecán o una sal del mismo.
 - 45 10. La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, 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.
 - 50 11. La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en terapia, en donde la composición liposómica y el inhibidor de punto de control inmunitario se administran simultáneamente.
 12. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11,

55 en donde la administración se realiza a una dosis y durante un período de dosificación que presentan un efecto terapéutico sinérgico.
 13. La formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12,

en donde un sujeto de administración tiene resistencia al topotecán.

FIG. 1

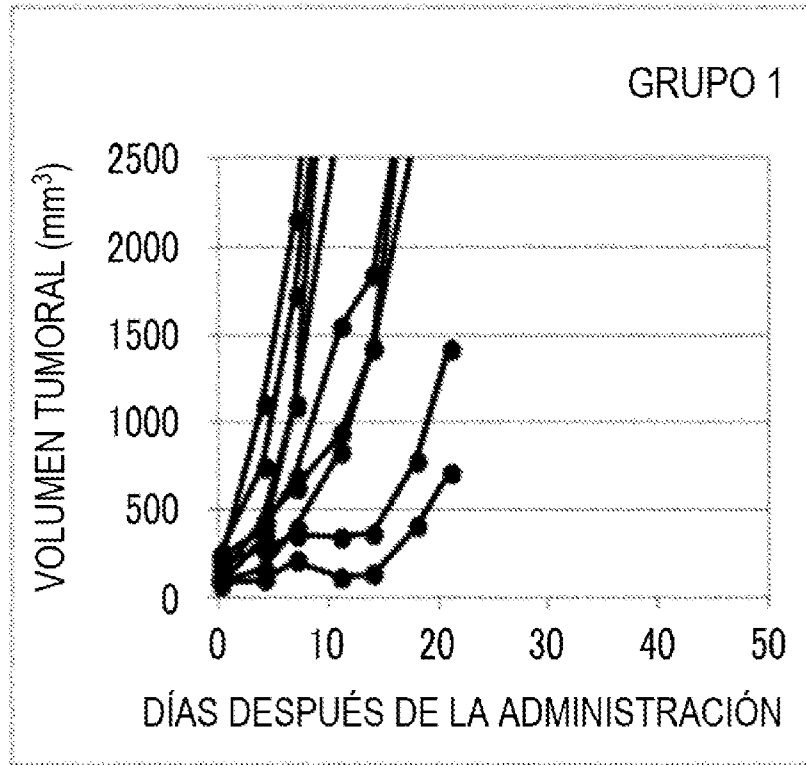


FIG. 2

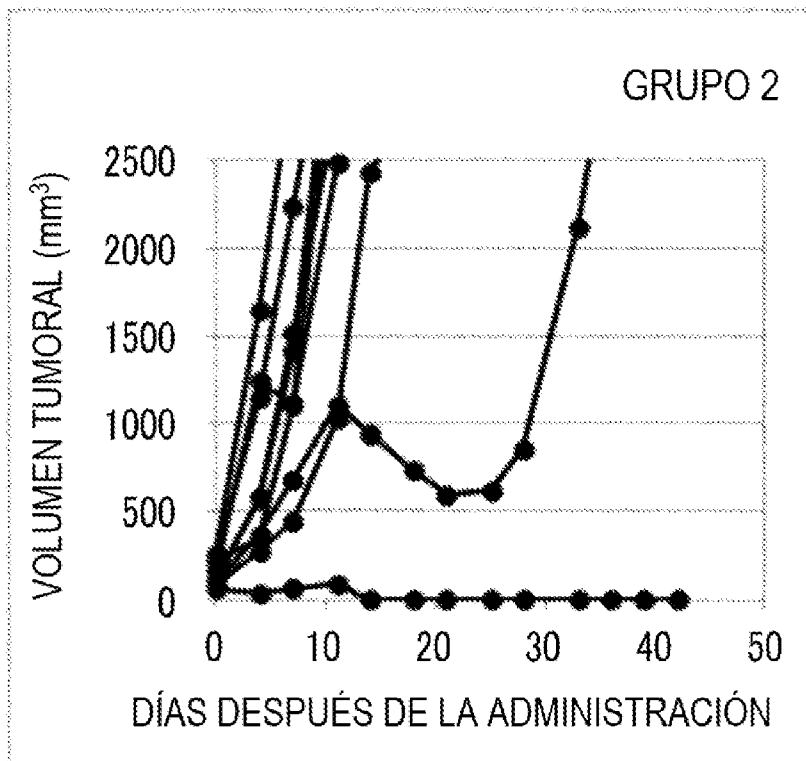


FIG. 3

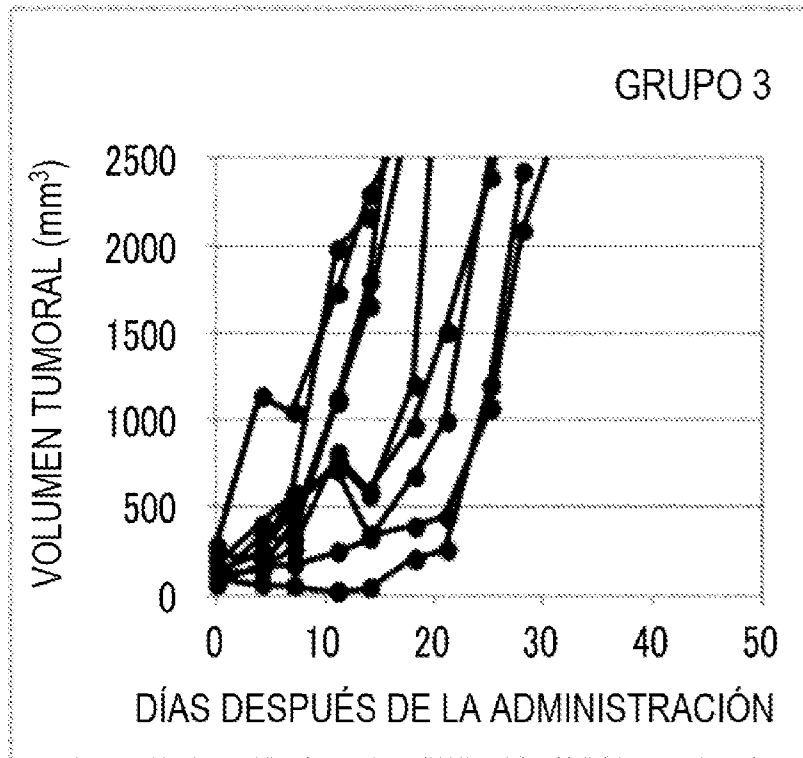


FIG. 4

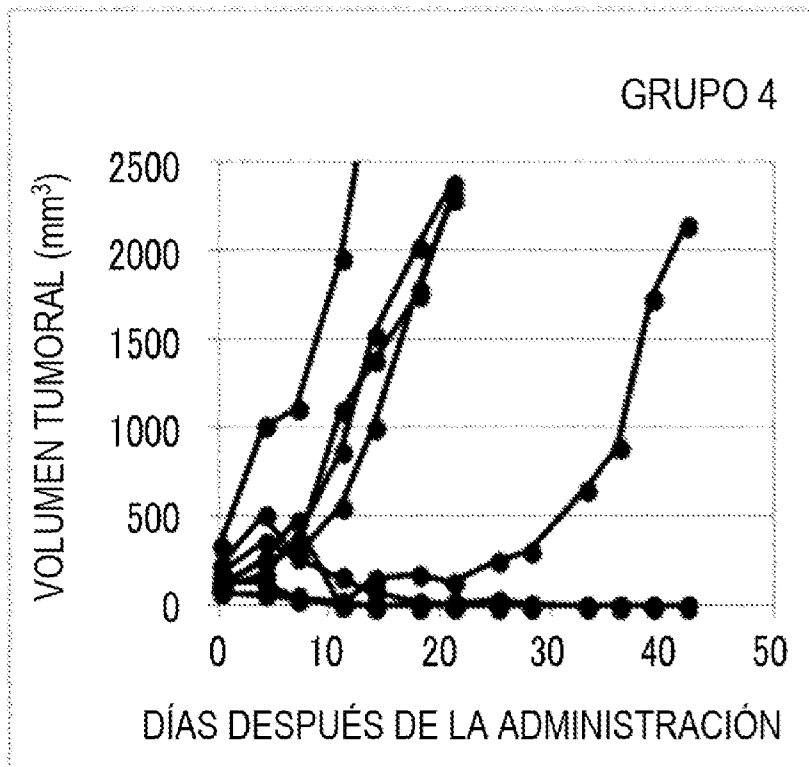


FIG. 5

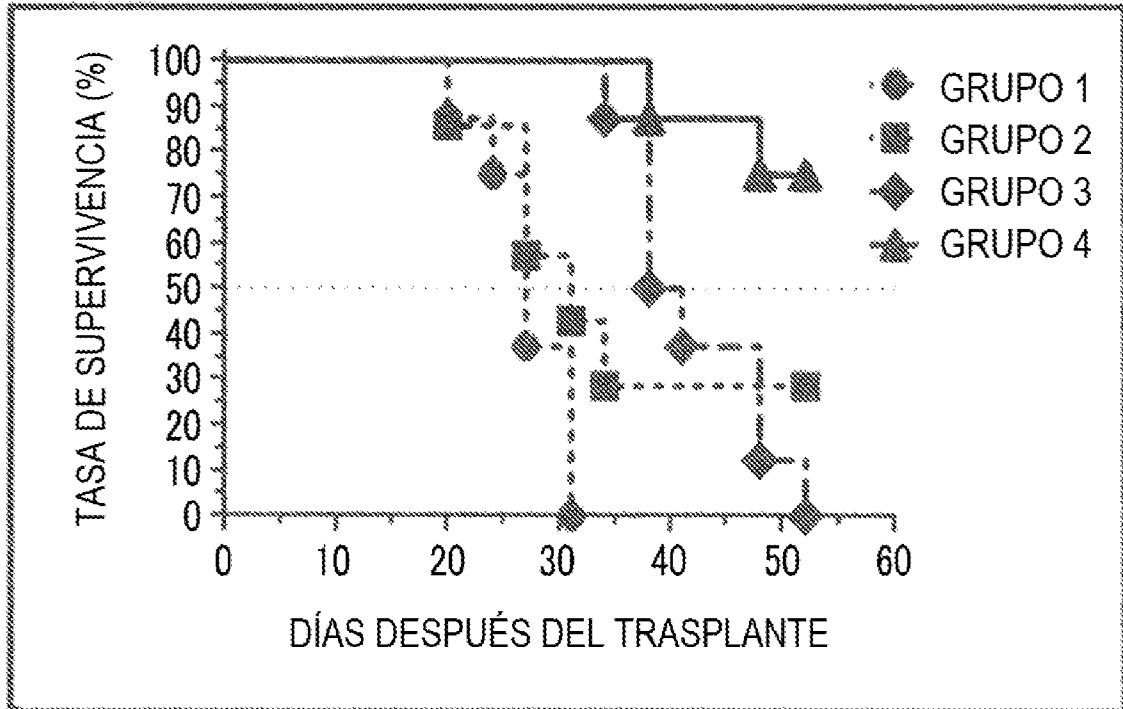


FIG. 6

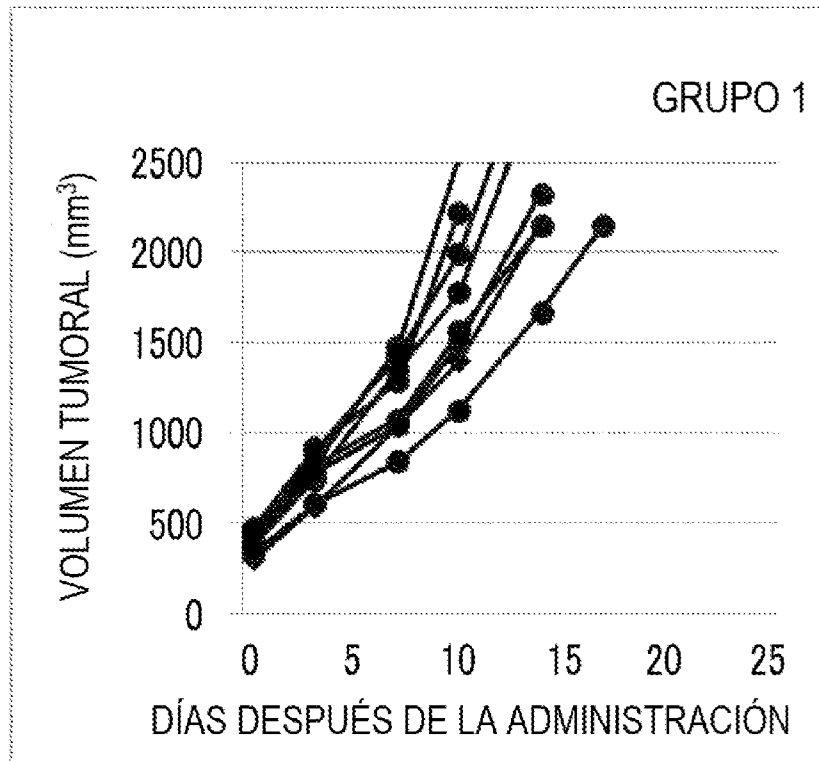


FIG. 7

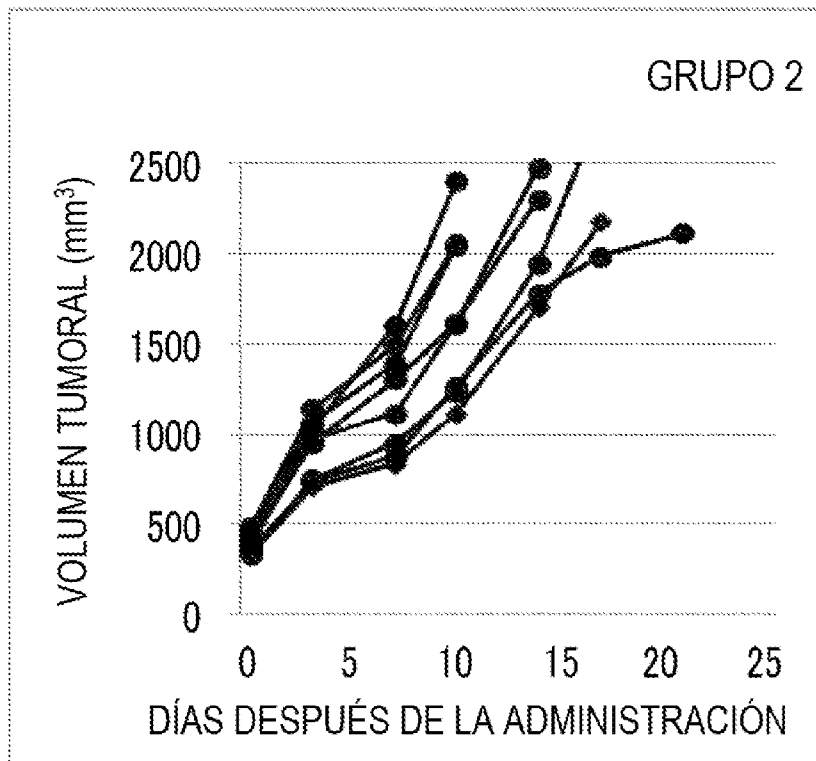


FIG. 8

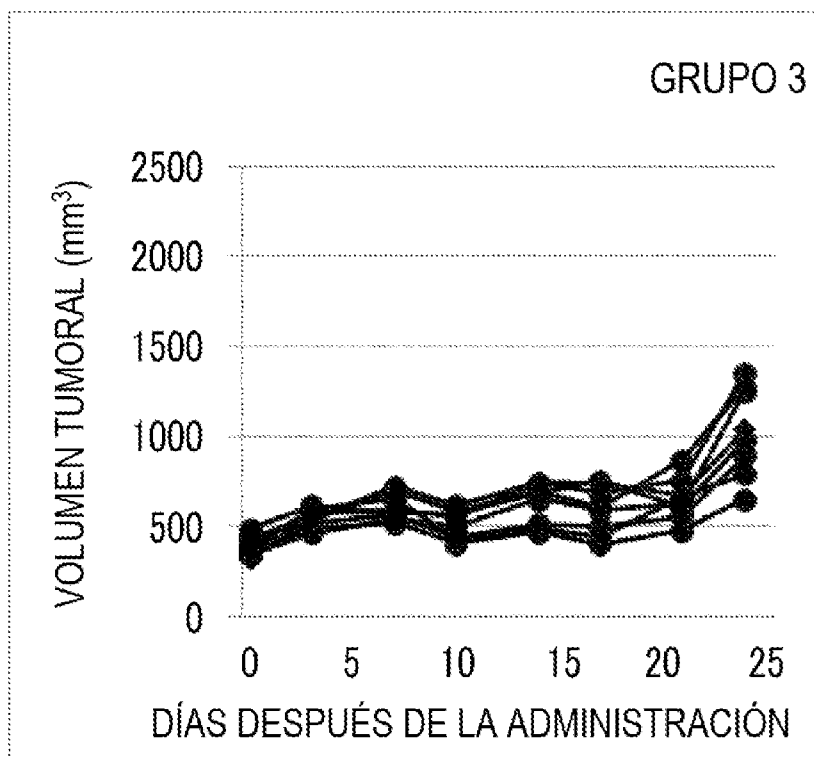


FIG. 9

