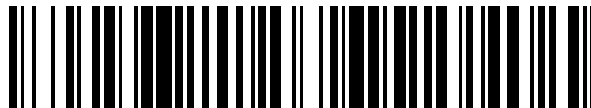


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 680**

51 Int. Cl.:

A61K 31/357 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2017 PCT/JP2017/016633**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017 WO17188350**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2017 E 17789632 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2023 EP 3449921**

54 Título: **Eribulina para inhibir el crecimiento tumoral**

30 Prioridad:

28.04.2016 JP 2016091919

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

03.11.2023

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
4-6-10 Koishikawa Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

**ASANO, MAKOTO y
MATSUI, JUNJI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 952 680 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

Eribulina para inhibir el crecimiento tumoral

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en la inhibición del crecimiento tumoral mediante la administración de una composición liposómica que comprende eribulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

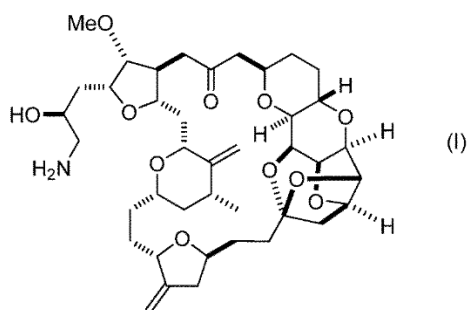
10

Antecedentes de la técnica

La eribulina representada por la fórmula (I) a continuación es un inhibidor de la dinámica de los microtúbulos, que detiene el ciclo celular al inhibir el alargamiento de los microtúbulos. La eribulina se usa como fármaco en el tratamiento de cáncer de mama.

15

[Estructura química 1]



20

El documento 1 de patente divulga eribulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un método para producir la misma.

El documento 2 de patente y el documento 3 de patente divulgan métodos para producir eribulina y mesilato de eribulina que es la sal mesilato (metanosulfonato) de eribulina.

25

El documento 4 de patente divulga un método para inhibir el crecimiento canceroso en un paciente mediante la administración al paciente de eribulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

El documento 5 de patente divulga un método para tratar el cáncer en un paciente mediante la administración al paciente de eribulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con un segundo agente antineoplásico estipulado.

30

El documento 6 de patente divulga un método para tratar el cáncer en un paciente mediante la administración al paciente de eribulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en combinación con un segundo medio de tratamiento.

35

El documento 7 de patente divulga una composición liposómica que comprende mesilato de eribulina.

Los documentos WO 2014/208774 y WO 2015/134399 divulgan eribulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en combinación con un segundo medio de tratamiento para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer.

40

Lista de citas

Documentos que son patente

45

Documento 1 de patente: WO 99/65894

Documento 2 de patente: WO 2005/118565

50

Documento 3 de patente: WO 2011/094339

Documento 4 de patente: patente de Estados Unidos n.º 6.469.182

Documento 5 de patente: publicación de patente de Estados Unidos n.º 2006/104984

Documento 6 de patente: patente de Estados Unidos n.º 6.653.341

Documento 7 de patente: WO 2010/113984

5

Sumario

Problema técnico

10 El problema a resolver por la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para su uso en la inhibición del crecimiento de determinados tumores en pacientes, comprendiendo la composición farmacéutica una composición liposómica que comprende eribulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Solución al problema

15 Como resultado de investigación intensivas, los autores de la presente invención descubrieron que el problema mencionado anteriormente puede resolverse mediante la administración a un paciente una composición liposómica que comprende eribulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. La presente invención se consiguió en función de este descubrimiento.

20

Es decir, la presente invención es como sigue.

- 25 1. [1] Una composición farmacéutica para su uso en la inhibición del crecimiento de al menos un tumor seleccionado del grupo que consiste en cáncer pancreático y cáncer de estómago en un paciente, comprendiendo la composición farmacéutica una composición liposómica que comprende eribulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
2. [2] La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con [1], en donde el tumor es cáncer de estómago.
- 30 3. [3] La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con [1] y/o [2], en donde la eribulina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma es mesilato de eribulina.

Efectos ventajosos de la invención

35 La presente invención puede proporcionar una composición farmacéutica novedosa para su uso en la inhibición del crecimiento de determinados tumores en pacientes al administrar al paciente una composición liposómica que comprende eribulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Breve descripción de los dibujos

40

La figura 1A muestra la actividad antitumoral *in vivo* de una composición liposómica que comprende mesilato de eribulina en ratones atímicos con un tipo diferente de tumor.

45 La figura 1B muestra la actividad antitumoral *in vivo* de una composición liposómica que comprende mesilato de eribulina en ratones atímicos con un tipo diferente de tumor.

La figura 1C muestra la actividad antitumoral *in vivo* de una composición liposómica que comprende mesilato de eribulina en ratones atímicos con un tipo diferente de tumor.

50 La figura 1D muestra la actividad antitumoral *in vivo* de una composición liposómica que comprende mesilato de eribulina en ratones atímicos con un tipo diferente de tumor.

Descripción de las realizaciones

55 La presente invención se describe más específicamente usando realizaciones de la invención. Sin embargo, la presente invención no se limita a las realizaciones de la presente invención descritas a continuación y pueden hacerse diversas modificaciones.

60 La composición liposómica en la presente invención comprende eribulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma (a partir de ahora en este documento denominada "eribulina, etc.").

En la presente invención, la "sal farmacéuticamente aceptable" puede ser una sal de ácido inorgánico o una sal de ácido orgánico sin limitación particular siempre que se forme una sal con eribulina. Ejemplos de la misma incluyen el cloruro, sulfato, citrato, bromhidrato, yodhidrato, nitrato, bisulfato, fosfato, superfosfato, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, tartrato, pantotenato, ascorbato, succinato, maleato, fumarato, gluconato, sacarinato, formiato, benzoato,

65

glutamato, mesilato (metanosulfonato), etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato, en donde el cloruro, sulfato, acetato, fosfato, citrato y mesilato son preferidos y el mesilato es más preferido.

5 La sal farmacéuticamente aceptable de eribulina puede ser una sal de eribulina con aluminio, calcio, litio, magnesio, calcio, sodio, cinc o dietanolamina.

El mesilato de eribulina es preferido como eribulina, etc. en la presente invención.

10 La eribulina, etc. son el compuesto descrito en el documento 1 de patente o la patente de Estados Unidos n.º 6.214.865 o sales del mismo y tiene actividad farmacológica, incluyendo actividad antitumoral y actividad antimetabólica. El documento 1 de patente divulga que la eribulina, etc. tienen, como agentes antitumorales, una actividad antitumoral para, por ejemplo, melanoma, fibrosarcoma, leucemia monocítica, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de mama, osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer pulmonar y fibroblastos transformados con ras. La eribulina, etc. se obtienen mediante los métodos de producción descritos en los documentos 1 a 3 de patente.

15 En la presente invención, "liposoma" significa una vesícula cerrada microscópica que tiene una fase interna encerrada por una bicapa lipídica. Los liposomas incluyen, por ejemplo, liposomas unilaminares pequeños (SUV: vesícula unilaminar pequeña), liposomas unilaminares grandes (LUV: vesícula unilaminar grande), liposomas unilaminares grandes (GUV: vesícula unilaminar grande), liposomas multicapa que tienen una pluralidad de membranas concéntricas (MLV: vesícula multilaminar) y liposomas que tienen una pluralidad de membranas que no son concéntricas, sino irregulares (MVV: vesícula multivesicular).

20 En la presente invención, "fase interna liposómica" significa una región acuosa encerrada por la bicapa lipídica del liposoma y se usa como sinónimo de "fase acuosa interna" y "fase acuosa interna liposómica". "Fase externa liposómica" significa una región no encerrada por la bicapa lipídica del liposoma cuando el liposoma se dispersa en un líquido (es decir, una región distinta de la fase interna y la bicapa lipídica).

25 En la presente invención, "composición liposómica" significa una composición que comprende un liposoma y que comprende además eribulina, etc. en la fase interna liposómica. En la presente invención, la composición liposómica incluye una composición en forma sólida y una composición en forma líquida.

30 En la presente invención, "dispersión liposómica" significa una composición que contiene liposoma en que la eribulina, etc. aún no está encapsulada en la fase interna liposómica.

35 En la presente invención, "solución de preparación liposómica" significa una composición que contiene liposoma en que aún no se ha realizado un ajuste de la fase externa liposómica para encapsular la eribulina, etc. en la fase interna liposómica.

40 [Lípido]

En la presente invención, el liposoma preferiblemente comprende, como componente constituyente de la membrana, un fosfolípido y/o un derivado de fosfolípido.

45 Ejemplos del fosfolípido y derivado de fosfolípido incluyen fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, cardiolipina, esfingomielina, ceramida fosforiletanolamina, ceramida fosforilglicerol, ceramida fosforilglicerol fosfato, 1,2-dimiristoil-1,2-desoxifosfatidilcolina, plasmalógenos y ácido fosfatídico.

50 El fosfolípido y derivado de fosfolípido puede ser uno solo de los anteriores o puede ser una combinación de dos o más de los anteriores.

55 El residuo de ácido graso en el fosfolípido y derivado de fosfolípido no está particularmente limitado y ejemplos del mismo incluyen los residuos de ácidos grasos saturado o insaturados que tiene de 12 a 20 carbonos. Ejemplos específicos de los mismos incluyen grupos acilo derivados de ácidos grasos tales como ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico. Además, los fosfolípidos que se originan a partir de sustancias naturales, por ejemplo, lecitina de yema de huevo y lecitina de soja, y lecitina de yema de huevo parcialmente hidrogenada, lecitina de yema de huevo (completamente) hidrogenada, lecitina de soja parcialmente hidrogenada y lecitina de soja (completamente) hidrogenada que se proporcionan por hidrogenación parcial o completa de residuos de ácido graso insaturado, pueden usarse como el fosfolípido y derivado de fosfolípido.

60 La cantidad de mezcla (fracción molar) del fosfolípido y/o derivado de fosfolípido usado en la preparación liposómica no está particularmente limitada. Sin embargo, es preferiblemente de un 10 % a un 80 % y más preferiblemente de un 30 % a un 60 % en función de los componentes totales de la membrana liposómica.

65 En la presente invención, además del fosfolípido y/o derivado de fosfolípido, el liposoma también puede comprender, como componente constituyente de la membrana, esteroides tales como colesterol y colestanol, ácidos grasos que

tienen un grupo acilo saturado o insaturado que tiene de 8 a 22 carbonos, y antioxidantes tales como α -tocoferol, como estabilizante de membrana.

5 La cantidad de mezcla (fracción molar) del esteroles usado en la preparación liposómica no está particularmente limitada. Sin embargo, es preferiblemente de un 1 % a un 60 %, más preferiblemente de un 10 % a un 50 %, e incluso más preferiblemente de un 30 % a un 50 % en función de los componentes totales de la membrana liposómica.

10 La cantidad de mezcla (fracción molar) del ácido graso no está particularmente limitada. Sin embargo, es preferiblemente de un 0 % a un 30 %, más preferiblemente de un 0 % a un 20 %, e incluso más preferiblemente de un 0 % a un 10 % en función de los componentes totales de la membrana liposómica.

15 La cantidad de mezcla (fracción molar) del antioxidante no está particularmente limitada siempre que se añade una cantidad que proporcione un efecto antioxidante. Sin embargo, es preferiblemente de un 0 % a un 15 %, más preferiblemente de un 0 % a un 10 %, e incluso más preferiblemente de un 0 % a un 5 % en función de los componentes totales de la membrana liposómica.

En la presente invención, el liposoma puede comprender, como componente constituyente de la membrana, un lípido funcional o un lípido modificado.

20 Ejemplos del lípido funcional incluyen derivados lipídicos de circulación prolongada, derivados lipídicos sensibles a la temperatura y derivados lipídicos sensibles al pH.

Ejemplos del lípido modificado incluyen lípidos PEGilados, glucolípidos, lípidos modificados con anticuerpo y lípidos modificados con péptido.

25 Ejemplos de los derivados lipídicos de circulación prolongada incluyen derivados de polietilenglicol (por ejemplo, condensados de metoxipolietilenglicol) tales como N-{carbonil-metoxipolietilenglicol-2000}-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, N-{carbonil-metoxipolietilenglicol-5000}-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, N-{carbonil-metoxipolietilenglicol-750}-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, N-{carbonil-metoxipolietilenglicol-2000}-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (MPEG2000-diestearoilfosfatidiletanolamina) y N-{carbonil-metoxipolietilenglicol-5000}-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, que son condensados de fosfoetanolamina y metoxipolietilenglicol.

35 La cantidad de mezcla (fracción molar) del derivado lipídico de circulación prolongada usado en la preparación liposómica no está particularmente limitada. Sin embargo, es preferiblemente de un 0 % a un 50 %, más preferiblemente de un 0 % a un 30 %, e incluso más preferiblemente de un 0 % a un 20 % en función de los componentes totales de la membrana liposómica.

40 Ejemplos del derivado lipídico sensible a la temperatura incluyen dipalmitoilfosfatidilcolina. La incorporación de un derivado lipídico sensible a la temperatura en el liposoma hace posible, por ejemplo, romper el liposoma a una temperatura estipulada, para cambiar las características superficiales del liposoma a una temperatura estipulada, y así sucesivamente. Además, al combinar esto con la aplicación de calor en la región diana, por ejemplo, un tumor, el liposoma puede romperse en la región diana y el compuesto activo entonces puede liberarse en la región diana.

45 Ejemplos del derivado lipídico sensible al pH incluyen dioleoilfosfatidiletanolamina. La incorporación de un derivado lipídico sensible al pH en el liposoma hace posible, por ejemplo, promover la fusión de la membrana entre el liposoma y el endosoma durante la captación del liposoma en una célula por endocitosis y de ese modo potenciar la administración del compuesto activo al citoplasma.

50 Ejemplos de los glucolípidos, lípidos modificados por anticuerpo y lípidos modificados por péptido incluyen lípidos conjugados con glúcidos, anticuerpos o péptidos que presentan afinidad por la célula diana o tejido diana. El uso del lípido modificado posibilita la administración activa del liposoma a la célula diana o tejido diana.

55 La composición de los componentes constituyentes de la membrana para proporcionar un liposoma que tenga un nivel práctico de permeabilidad de membrana puede determinarse según lo apropiado por los expertos en la materia de acuerdo con, por ejemplo, el compuesto activo y el tejido diana, con referencia según lo necesario a los ejemplos proporcionados a continuación (véase, por ejemplo, Hiroshi Kikuchi, *et al.*, "Liposome I - Preparative Methods and Test Methods -", Cell Technology, (1983) 2(9): pág. 1136-1149, y las referencias citadas en ese documento).

60 Los componentes constituyentes de la membrana liposómica preferiblemente comprenden un fosfolípido, colesterol y un condensado de metoxipolietilenglicol.

[Composición liposómica]

65 En la composición liposómica de la presente invención, la eribulina, etc. se encapsula en un liposoma que tiene una membrana lipídica. La eribulina, etc. puede distribuirse en la bicapa lipídica en la composición liposómica.

La composición liposómica de la presente invención puede obtenerse mediante los métodos descritos en el documento 7 de patente.

5 Cuando la composición liposómica es una forma sólida, la composición liposómica líquida puede obtenerse por disolución o suspensión en un disolvente estipulado como se describe a continuación. Además, cuando la composición liposómica es un sólido congelado, la composición liposómica líquida puede obtenerse, por ejemplo, dejando el sólido a temperatura ambiente para que se funda.

10 La composición liposómica de la presente invención no está limitada siempre que comprenda (1) eribulina, etc. La composición liposómica de la presente invención también puede comprender (2) al menos una sal de amonio y (3) al menos un ácido, sal, base y/o aminoácido.

15 Ejemplos de (2) la al menos una sal de amonio incluyen cloruro de amonio, borato de amonio, sulfato de amonio, formiato de amonio, acetato de amonio, citrato de amonio, tartrato de amonio, succinato de amonio y fosfato de amonio, entre los que se prefieren sulfato de amonio, citrato de amonio y tartrato de amonio.

20 Ejemplos de (3) el ácido, sal, base y/o aminoácido incluyen los siguientes: como ácido, por ejemplo, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glutámico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido propiónico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido láctico, ácido bórico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido adípico, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico; como sal, por ejemplo, sales de sodio de los ácidos mencionados anteriormente, sales de potasio de los ácidos mencionados anteriormente y sales de amonio de los ácidos mencionados anteriormente; como base, por ejemplo, tris(hidroximetil)aminometano, amoníaco, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio; y como aminoácido, por ejemplo, arginina, histidina y glicina.

25 (3) El ácido, sal, base y/o aminoácido en la fase interna liposómica es preferiblemente ácido clorhídrico, ácido acético, ácido láctico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido cítrico y ácido fosfórico, sales de sodio de los ácidos anteriores e hidróxido de sodio y amoníaco, y más preferiblemente ácido acético, ácido láctico, ácido tartárico, ácido cítrico y ácido fosfórico y sales de sodio de los ácidos anteriores e hidróxido de sodio y amoníaco.

30 La tabla 1 da un ejemplo de los componentes individuales en la composición liposómica. En otro ejemplo específico, puede usarse 96 mg/ml de sacarosa en lugar de 9 mg/ml de cloruro de sodio como agente osmótico (fase externa liposómica).

35 [Tabla 1]

Compuesto	Concentración	Propósito de la mezcla
mesilato de eribulina	0,2 mg/ml	fármaco
HSPC ^[1]	7,1 mg/ml	componente de membrana lipídica
colesterol	2,3 mg/ml	componente de membrana lipídica
MPEG2000-DSPE ^[2]	2,7 mg/ml	componente de membrana lipídica
sulfato de amonio	100 mM	componente de fase interna liposómica
ácido cítrico monohidrato	30 mM	componente de fase interna liposómica
cloruro de sodio	9 mg/ml	componente de fase externa liposómica
L-histidina	1,6 mg/ml	componente de fase externa liposómica
hidróxido de sodio/ácido clorhídrico	cantidad adecuada	modificador del pH

[1] fosfatidilcolina de soja hidrogenada

[2] N-{carbonil-metoxipolietilenglicol-2000}-1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (MPEG2000-diestearoilfosfatidiletanolamina)

[Composición farmacéutica]

La composición liposómica de la presente invención puede usarse como composición farmacéutica de agente antitumoral.

5 Cuando la composición liposómica de la presente invención se usa como composición farmacéutica, la composición liposómica puede administrarse por inyección (inyección intravenosa, intraarterial o tópica), o administración oral, nasal o transdérmica, o por inhalación o como colirio. En particular, se prefieren inyecciones, por ejemplo, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intradérmica e inyección intraarterial, así como inyección tópica a células diana o un órgano. Ejemplos de la forma farmacéutica de la composición liposómica a administrar por vía oral incluyen comprimido, polvo, granulado, jarabe, cápsula y agente líquido interno. Ejemplos de la forma farmacéutica de la composición liposómica a administrar por vía parenteral incluyen agentes inyectables, agentes de infusión por goteo, colirios, pomadas, supositorios, suspensiones, cataplasmas, lociones, aerosoles y emplastos. Entre ellos, se prefieren agentes inyectables y agentes de infusión por goteo.

15 Cuando la composición liposómica es un líquido, puede usarse tal cual. Cuando la composición liposómica tiene que usarse como fármaco, puede realizarse su preparación en el momento de uso, por ejemplo, al inyectar, el médico o paciente, un disolvente en un vial cargado con la formulación sólida. En el caso de una formulación sólida proporcionada al congelar la composición liposómica líquida, el almacenamiento puede realizarse en estado congelado y el agente líquido puede entonces proporcionarse para su uso al volver al estado líquido en el momento de uso dejándolo a temperatura ambiente para que se funda o calentándola para que se funda rápidamente.

20 la dosis de la composición farmacéutica varía sustancialmente dependiendo, entre otras cosas, de la enfermedad diana, la edad, el sexo y el peso del paciente, y la gravedad de los síntomas. La dosis de la eribulina, etc. no está particularmente limitada. Sin embargo, la dosis de mesilato de eribulina, que es una sal adecuada, en general es de 0,1 a 10 mg/m² (área de superficie corporal) al día para adultos. El mesilato de eribulina se administra preferiblemente a una dosis de 0,5 a 3 mg/m² (área de superficie corporal) una vez cada 1 semana, 2 semanas o 3 semanas. El mesilato de eribulina se administra más preferiblemente a una dosis de 0,5 a 2 mg/m² (área de superficie corporal) una vez cada 1 semana, 2 semanas o 3 semanas.

25 En otra realización, el mesilato de eribulina se administra preferiblemente a una dosis de aproximadamente 1,5 mg/m² (área de superficie corporal) una vez cada 1 semana, 2 semanas o 3 semanas.

30 Más específicamente, la dosis de mesilato de eribulina en la composición liposómica es de 0,5 a 1,4 mg/m² en el día 1 de un ciclo de 21 días por administración intravenosa o de 0,5 a 1,5 mg/m² en el día 1 y el día 15 de un ciclo de 28 días por administración intravenosa.

35 La eribulina, etc. en la composición liposómica puede administrarse una vez al día o la dosis diaria puede administrarse durante varias administraciones.

40 Por ejemplo, una composición liposómica que comprende de 0,01 a 300 mg/ml de eribulina, etc. en la fase interna liposómica puede administrarse como la composición farmacéutica de la presente invención.

45 En un ejemplo específico de una composición farmacéutica inyectable de la presente invención, se formula como un agente inyectable que comprende 0,20 mg/ml de mesilato de eribulina (0,18 mg/ml de eribulina) encapsulado en un liposoma que tiene una membrana lipídica que comprende HSPC, colesterol y MPEG2000-DSPE. Esta composición farmacéutica también comprende sacarosa o cloruro de sodio como agente de tonicidad, sulfato de amonio, ácido cítrico y L-histidina e hidróxido de sodio y ácido clorhídrico para el ajuste del pH. Esta composición farmacéutica puede administrarse directamente a un paciente o puede diluirse, antes de la administración a un paciente, con solución salina fisiológica en el intervalo de concentración de 0,0035 mg/ml a menos de 0,2 mg/ml.

50 [Tipos de tumor]

El tipo de tumores que pueden abordarse mediante la composición para su uso de acuerdo con la presente invención para inhibir el crecimiento tumoral es al menos un tumor seleccionado del grupo que consiste en cáncer pancreático y cáncer de estómago.

55 [Ejemplos]

La presente invención se describe específicamente usando ejemplos y ejemplos comparativos, pero la presente invención no se limita a los ejemplos proporcionados a continuación.

60 [Ejemplo 1]

65 Se produjo una composición liposómica que contiene mesilato de eribulina (a partir de ahora en este documento denominada también "E7389-LF") usando el siguiente procedimiento y los componentes descritos en la tabla 1. La E7389-LF obtenida se evaluó para su actividad antitumoral.

<Preparación de solución acuosa para fase interna liposómica>

5 Se disolvieron sulfato de amonio y ácido cítrico monohidrato en agua pura y se diluyeron para producir una solución acuosa de sulfato de amonio 200 mM ácido cítrico 160 mM. El pH de la solución acuosa de sulfato de amonio 200 mM/ácido cítrico 60 mM se ajustó a pH 5,5 usando amoniaco acuoso, seguido de dilución usando agua pura para producir una solución acuosa de sulfato de amonio 100 mM/ácido cítrico 30 mM.

<Preparación de la solución de preparación liposómica>

10 Se pesaron fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol y MPEG2000-diestearoilfosfatidiletanolamina cada uno de acuerdo con la relación ponderal 71: 23: 27. Cada uno se disolvió en cloroformo y estas soluciones se mezclaron, seguido de eliminación por destilación del cloroformo a presión reducida usando un evaporador rotatorio para producir una película lipídica. La solución acuosa preparada para la fase interna liposómica se calentó hasta aproximadamente 80 °C y se añadió a la película lipídica obtenida y se preparó una preparación liposómica por agitación. El calibrado se realizó usando una extrusora (Lipex Biomembranes Inc.) calentada hasta aproximadamente 80 °C para obtener una solución de preparación liposómica con el tamaño adecuado.

<Preparación de dispersión liposómica>

20 Usando una columna Sephadex G-50, la solución de preparación liposómica obtenida se eluyó con una solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9 %/histidina 10 mM (pH = 7,6) para remplazar la fase externa liposómica con la solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9 %/histidina 10 mM. Después del remplazo de la fase externa liposómica, se realizó centrifugación durante 30 minutos a 400 000 × g. La centrifugación estuvo seguida de redispersión y ajuste del volumen del líquido usando la solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9 %/histidina 10 mM para obtener la dispersión liposómica.

<Preparación de solución de mesilato de eribulina>

30 Se obtuvo una solución de mesilato de eribulina al disolver mesilato de eribulina en una solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9 %/histidina 10 mM.

<Preparación de composición liposómica>

35 La dispersión liposómica y la solución de mesilato de eribulina se mezclaron en un recipiente de vidrio y se realizó incubación durante 3 minutos en un baño de agua a 60 °C para obtener una composición liposómica en que se introdujo mesilato de eribulina en la fase interna liposómica. Se añadió una solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9 %/histidina 10 mM a la composición liposómica y se realizó esterilización por filtración usando un filtro de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,22 µm para obtener composiciones liposómicas a las concentraciones diana de mesilato de eribulina de 0,1 mg/ml a 0,5 mg/ml (por ejemplo, 0,24 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,5 mg/ml).

<Preparación de solución acuosa de mesilato de eribulina>

45 Se disolvió mesilato de eribulina en una solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9 %/histidina 10 mM para obtener soluciones acuosas de 5 mg/ml y 3,5 mg/ml de mesilato de eribulina (a partir de ahora en este documento también denominadas "E7389").

<Medición de la actividad antitumoral>

50 Se adquirieron líneas celulares cancerosas del Riken Bioresource Center (RBC, Japón (Ibaraki)), American Type Culture Collection (ATCC, EE. UU. (Manassas, VA)), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH: DSMZ, Alemania (Braunschweig)), Health Science Research Resource Bank (HSRRB, Japón (Osaka)) y DS Pharma Biomedical Co., Ltd. (DS-Pharma, Japón (Osaka)), y se donaron amablemente por el Kyushu Cancer Center, Kagoshima University y el Cell Resource Center for Biomedical Research of the Institute of Development, Aging, and Cancer de Tohoku University.

55 Las condiciones de cultivo y las condiciones de trasplante para las líneas celulares cancerosas individuales se dan en las tablas 2 y 3, y proporcionan resultados para tipos de cáncer que están dentro del alcance de la invención, así como numerosos tipos de referencia. En las tablas, las líneas celulares cancerosas a las que se añade "*" en la columna de "aclimatación" se obtuvieron de tumores crecidos que se formaron por inoculación subcutánea de cada línea celular cancerosa en un ratón por anticipado.

65 Las células KB indicadas como línea celular cancerosa en la tabla 2 se creía originalmente que derivan de un cáncer epitelial. En los últimos años, sin embargo, se demostró que era una contaminación de células HeLa (cáncer cervicouterino) (<http://www.atcc.org/products/all/CCL-17.aspx#characteristics>). Además, se usó complemento ITS-G (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., n.º 090-06741) como ITS.

[Tabla 2]

línea celular cancerosa	origen	fuente	aclimatación	medio de cultivo	n.º de células trasplantadas x 10 ⁶ células/zona	uso de GelTrex durante el trasplante celular	volumen del tumor al inicio del tratamiento (mm ³)
CMC9	sarcoma (leiomiomasarcoma)	RBC		HamF12/FBS al 10 %	8,7	+	150
MES-SA	sarcoma (leiomiomasarcoma)	ATCC		McCoy5A/FBS al 10 %	6,3	+	190
SK-UT-1	sarcoma (leiomiomasarcoma)	ATCC	*	EMEM/FBS al 10 %, piruvato, NEAA	10	-	260
SK-LMS-1	sarcoma (leiomiomasarcoma)	ATCC	*	EMEM/FBS al 10 %, piruvato, NEAA	4,5	-	290
A673	sarcoma (sarcoma de Ewing)	ATCC		DMEM (alto contenido de glucosa)/FBS al 10 %, piruvato	10	-	220
MFE-280	cáncer uterino (cáncer endometrial)	DSMZ		RPM11640:EMEM = 1:1/FBS al 20 %, ITS	10	+	200
MFE-296	cáncer uterino (cáncer endometrial)	DSMZ		RPM11640:EMEM = 1:1/FBS al 20 %, ITS	5	+	200
HEC-151	cáncer uterino (cáncer endometrial)	HSRRB		EMEM/FBS al 15 %	5	+	220
ECC-1	cáncer uterino (cáncer endometrial)	ATCC		EMEM/FBS al 15 %	10	+	160
KB (HeLa)	cáncer uterino (cáncer cervicouterino)	Kagoshima University, Akiyama		RPM11640/FBS al 10 %	5	-	150
AsPC-1	cáncer pancreático	ATCC		RPM11640/FBS al 10 %	10	-	380
BXPC-3	cáncer pancreático	ATCC		DMEM (alto contenido de glucosa)/FBS al 10 %, piruvato	10	-	120
KP-1	cáncer pancreático	Kyushu Cancer Center, Funakoshi		RPM11640/FBS al 10 %	9	+	200
K1	cáncer tiroideo	DS-Pharma	*	DMEM:F12 = 1:1/FBS al 10 %	5	+	390
U251MG	tumor cerebral (glioblastoma)	RBC		RPM11640/FBS al 10 %	11	+	150

PLC/PRF/5	cáncer de hígado (carcinoma hepatocelular)	Cell Resource Center for Biomedical Research, Institute of Development, Aging, and Cancer, Tohoku University		DMEM (alto contenido de glucosa)/FBS al 10 %, piruvato	10	+	180
Hs746T	cáncer de estómago	ATCC		DMEM (alto contenido de glucosa)/FBS al 10 %, piruvato	10	+	180
UM-UC-3	cáncer urotelial (cáncer de vejiga)	DS-Pharma		EMEM/FBS al 10 %, piruvato, NEAA	10	+	230

[Tabla 3]

línea celular cancerosa	origen	fuente	aclimatación	medio de cultivo	n.º de células trasplantadas		uso de GelTrex durante el trasplante celular	volumen del tumor al inicio del tratamiento (mm ³)
						x 10 ⁶ células/zona		
MES-SA	sarcoma (leiomiোসarcoma)	ATCC		McCoy5A/FBS al 10 %	10		+	420
SK-UT-1	sarcoma (leiomiოსarcoma)	ATCC	*	EMEM/FBS al 10 %, piruvato, NEAA	10		-	290
UM-UC-3	cáncer urotelial (cáncer de vejiga)	DS-Pharma		EMEM/FBS al 10 %, piruvato, NEAA	5		+	190

En el día inicial de inoculación, las células cancerosas se recogieron por tratamiento con tripsina y se lavaron y suspendieron usando el medio particular. Algunas de las células cancerosas recogidas se mezclaron entonces con GelTrex (Gibco, n.º 12760-021 o A14132-02) a 1: 1. Usando una aguja de jeringa de calibre 26, estas células se inocularon a un volumen de 0,1 ml en las cercanías de la región axilar derecha de ratones (BALB/c nu/nu).

Después de que el volumen del tumor hubiera alcanzado de 120 mm³ a 420 mm³, los ratones se dividieron en grupos (día 0) de modo que el volumen del tumor y el peso corporal del ratón fueran sustancialmente iguales entre los grupos de ensayo (de 5 a 9 ratones por grupo de ensayo). El volumen promedio inicial del tumor (TV en el día 0) para cada modelo se da en la tabla 2 y la tabla 3 como volumen del tumor (mm³) al inicio del tratamiento.

Inmediatamente antes de la administración después de la división en grupos, la E7389-LF o E7389 se diluyó con solución salina fisiológica para preparar la muestra de administración. La muestra de administración se administró por vía intravenosa, a un volumen de administración de 0,1 ml por 10 g de peso corporal, después de la división en grupos (día 0) y 7 días después de la división en grupos.

El tamaño del tumor se midió a lo largo del tiempo con un calibre, y se determinó el volumen del tumor en función de la siguiente fórmula de cálculo.

$$\text{tumor volume (mm}^3\text{)} = \text{length (mm)} \times \text{square of width (mm}^2\text{)} \times 1/2$$

longitud: diámetro más largo del tumor

anchura: diámetro perpendicular a la longitud

$$\text{relative tumor volume (RTV)} = \text{tumor volume (day X)} / \text{tumor volume (day 0)}$$

El promedio \pm DT del volumen del tumor se calculó para cada grupo de ensayo.

Los resultados se dan en la figura 1A a la figura 1D.

<Análisis estadístico>

Se realizó tratamiento estadístico para cada grupo de administración mediante RM-ANOVA bidireccional usando log RTV. Se asignó una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de p de probabilidad de significación fue $p < 0,05$ (5 %). Se usó el programa informático Prism6 (Graphpad Software, Inc.) para el análisis estadístico.

<Resultados>

Los resultados del análisis estadístico por RM-ANOVA usando el valor de log RTV se dan en la tabla 4 y la tabla 5 para la actividad antitumoral de E7389-LF y E7389 para cada uno de los modelos de trasplante de tumor humano. En los 18 modelos de xenoinjerto humano, la actividad antitumoral de E7389-LF y E7389 fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo de vehículo. Además, en los 11 modelos, la actividad antitumoral de E7389-LF fue estadísticamente significativa en comparación con la actividad antitumoral de E7389.

En las tablas, el término "Sí 1" indica que hay una diferencia estadísticamente significativa, al comparar el cambio del volumen del tumor con E7389-LF o E7389 con el cambio del volumen del tumor en el grupo de vehículo. El término "Sí 2" indica que hay una diferencia estadísticamente significativa, al comparar el cambio del volumen del tumor con E7389-LF con el cambio del volumen del tumor con E7389. El término "NS" indica que no hay diferencia estadísticamente significativa, al comparar el cambio del volumen del tumor con E7389-LF con el cambio del volumen del tumor con E7389.

El término "día X" indica el periodo experimental durante el que se realizó el ensayo RM-ANOVA.

[Tabla 4]

		RM-ANOVA					
		E7389-LF frente a vehículo		E7389 frente a vehículo		E7389-LF frente a E7389	
OMC9	sarcoma (leiomiocarcinoma)	Sí 1	día 7 - día 35	Sí 1	día 7 - día 35	NS	día 7 - día 49
MES-SA	sarcoma (leiomiocarcinoma)	Sí 1	día 4 - día 18	Sí 1	día 4 - día 18	Sí 2	día 4 - día 46
SK-UT-1	sarcoma (leiomiocarcinoma)	Sí 1	día 3 - día 10	Sí 1	día 3 - día 10	NS	día 3 - día 48
SK-LMS-1	sarcoma (leiomiocarcinoma)	Sí 1	día 2 - día 7	Sí 1	día 2 - día 7	Sí 2	día 2 - día 31
A673	sarcoma (sarcoma de Ewing)	Sí 1	día 4 - día 18	Sí 1	día 4 - día 18	NS	día 4 - día 25
MFE-280	cáncer uterino (cáncer endometrial)	Sí 1	día 4 - día 14	Sí 1	día 4 - día 14	Sí 2	día 4 - día 71
MFE-296	cáncer uterino (cáncer endometrial)	Sí 1	día 4 - día 14	Sí 1	día 4 - día 14	Sí 2	día 4 - día 68
HEC-151	cáncer uterino (cáncer endometrial)	Sí 1	día 3 - día 14	Sí 1	día 3 - día 14	NS	día 3 - día 49
ECC-1	cáncer uterino (cáncer endometrial)	Sí 1	día 4 - día 19	Sí 1	día 4 - día 19	Sí 2	día 4 - día 39
KB (HeLa)	cáncer uterino (cáncer cervicouterino)	Sí 1	día 7 - día 14	Sí 1	día 7 - día 14	Sí 2	día 7 - día 21
AsPC-1	cáncer pancreático	Sí 1	día 3 - día 35	Sí 1	día 3 - día 35	Sí 2	día 3 - día 35
BXPC-3	cáncer pancreático	Sí 1	día 7 - día 21	Sí 1	día 7 - día 21	Sí 2	día 7 - día 49
KP-1	cáncer pancreático	Sí 1	día 3 - día 14	Sí 1	día 3 - día 14	Sí 2	día 3 - día 49
K1	cáncer tiroideo	Sí 1	día 3 - día 17	Sí 1	día 3 - día 17	NS	día 3 - día 24
U251MG	tumor cerebral (glioblastoma)	Sí 1	día 5 - día 23	Sí 1	día 5 - día 23	NS	día 5 - día 40
PLC/PRF/5	cáncer de hígado (carcinoma hepatocelular)	Sí 1	día 4 - día 18	Sí 1	día 4 - día 18	NS	día 4 - día 56
Hs746T	cáncer de estómago	Sí 1	día 4 - día 11	Sí 1	día 4 - día 11	Sí 2	día 4 - día 63
UM-UC-3	cáncer urotelial (cáncer de vejiga)	Sí 1	día 3 - día 10	Sí 1	día 3 - día 10	NS	día 3 - día 21

[Tabla 5]

		RM-ANOVA					
		E7389-LF frente a vehículo		E7389 frente a vehículo		E7389-LF frente a E7389	
MES-SA	sarcoma (leiomiocarcinoma)	Sí 1	día 3 - día 7	Sí 1	día 3 - día 7	Sí 2	día 3 - día 35
SK-UT-1	sarcoma (leiomiocarcinoma)	Sí 1	día 3 - día 10	Sí 1	día 3 - día 10	NS	día 3 - día 45
UM-UC-3	cáncer urotelial (cáncer de vejiga)	Sí 1	día 3 - día 14	Sí 1	día 3 - día 14	Sí 2	día 3 - día 11

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en la inhibición del crecimiento de al menos un tumor seleccionado del grupo que consiste en cáncer pancreático y cáncer de estómago en un paciente, comprendiendo la composición farmacéutica una composición liposómica que comprende eribulina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 10 2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con reivindicaciones 1, en donde el tumor es cáncer de estómago.
3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con reivindicación 1 y/o reivindicación 2, en donde la eribulina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma es mesilato de eribulina.

Fig. 1A

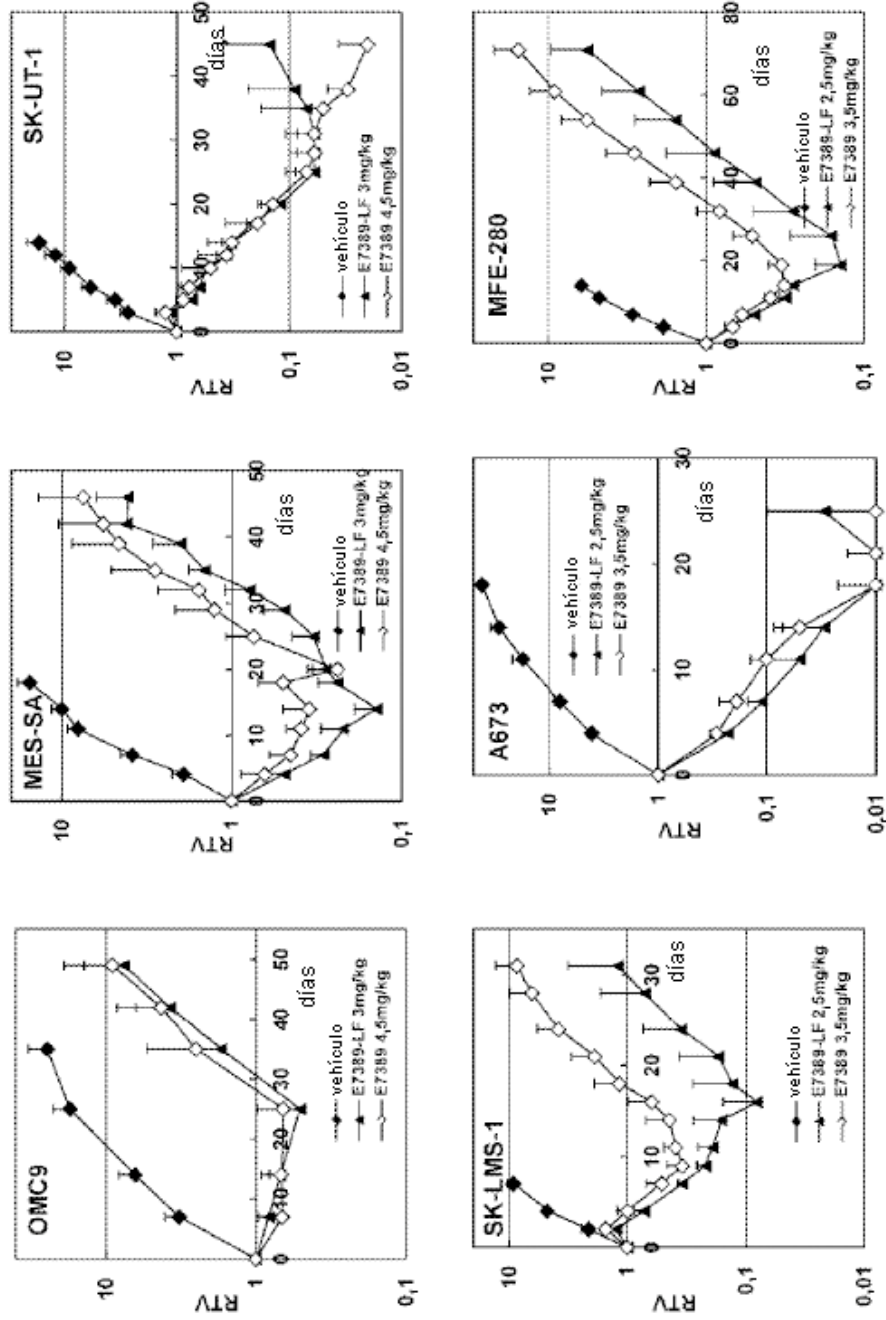


Fig. 1B

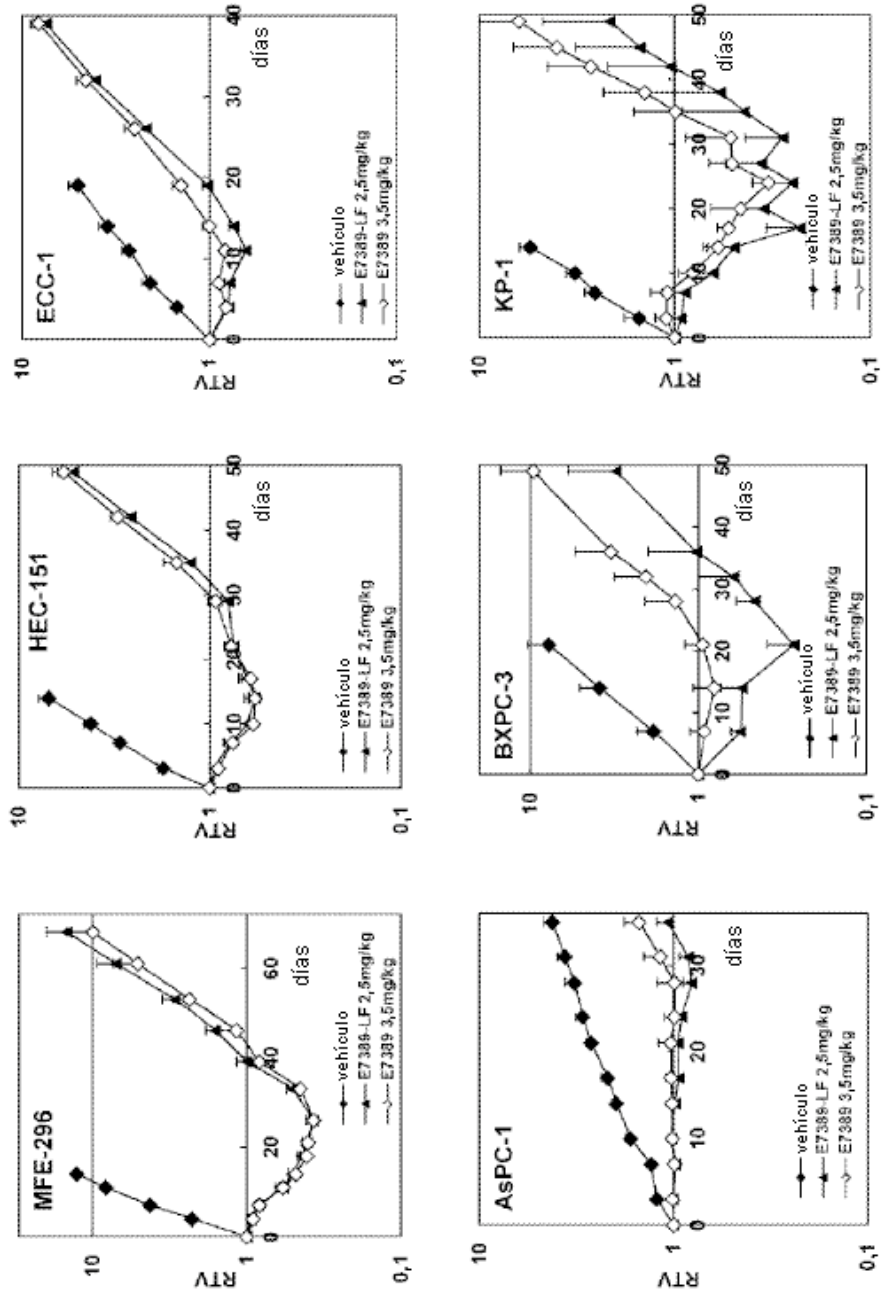


Fig. 1C

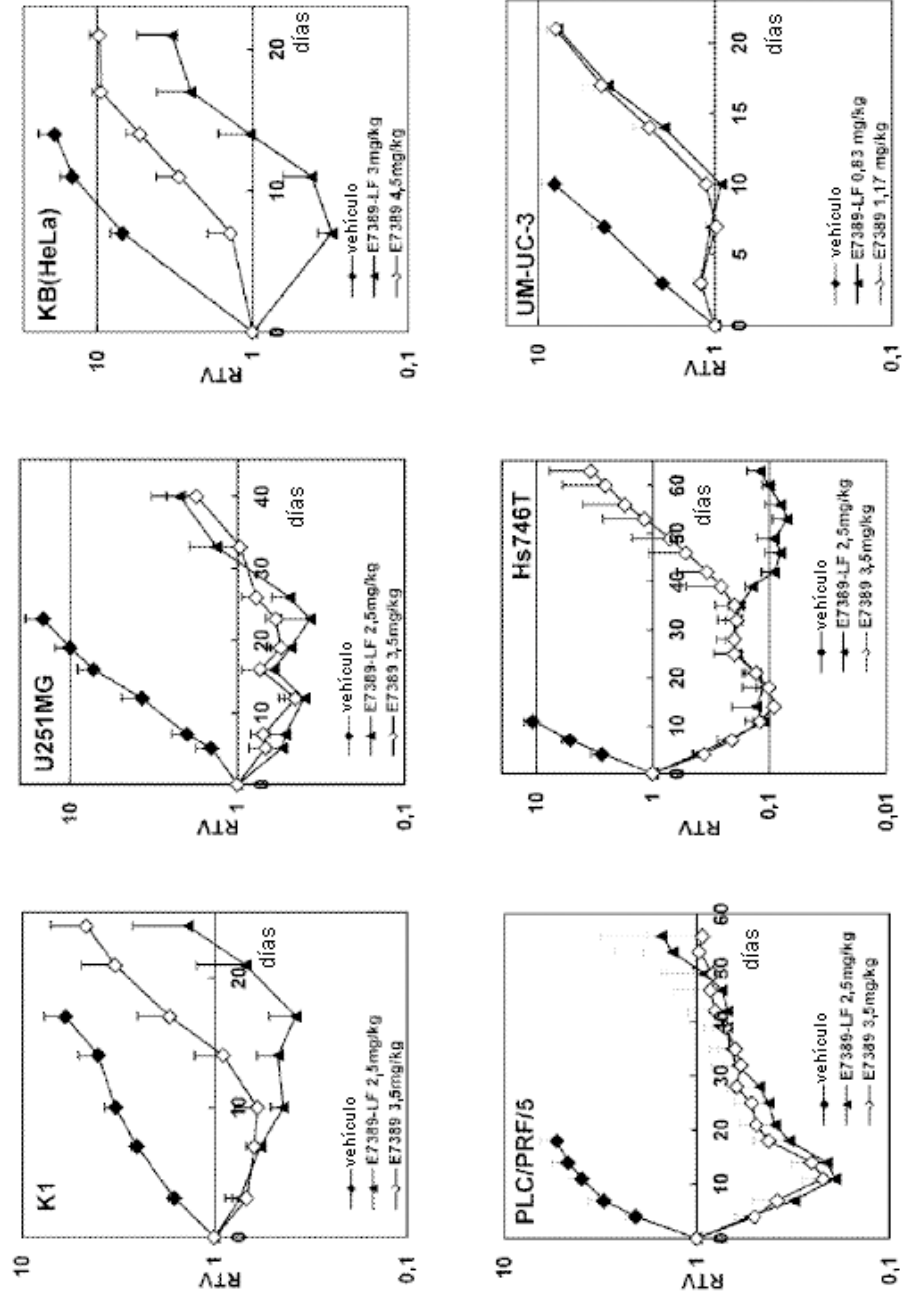


Fig. 1D

