



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 400**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 31/475** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00920004 .9**  
96 Fecha de presentación : **31.03.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1169021**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2002**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para tratar linfomas.**

30 Prioridad: **01.04.1999 US 127444 P**  
**02.06.1999 US 137194 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.02.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.02.2010**

73 Titular/es: **Hana Biosciences, Inc.**  
**7000 Shoreline Court Suite 370**  
**San Francisco, California 94080, US**  
**THE BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF**  
**TEXAS SYSTEM**

72 Inventor/es: **Sarris, Andreas, H.;**  
**Cabanillas, Fernando;**  
**Logan, Patricia, M.;**  
**Burge, Clive, T., R.;**  
**Goldie, James, H.;**  
**Webb, Murray, S. y**  
**Mayer D. Lawrence**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 333 400 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

Composiciones y procedimientos para tratar linfomas.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a procedimientos y composiciones para el tratamiento de neoplasias en mamíferos y, en particular, formas recidivantes de neoplasias.

10 **Antecedentes de la invención**

A pesar de muchos años de investigación sobre el desarrollo de nuevos procedimientos para el tratamiento, los cánceres del sistema linfático, o linfomas, siguen siendo bastante comunes. Por ejemplo, cada año se diagnostican en los EE.UU. más de 60.000 personas con linfomas, incluidos más de 55.000 casos de linfoma ahodgkiniano (NHL, non-Hodgkin's Lymphoma), y estos números siguen creciendo constantemente. Además, con frecuencia, el pronóstico para los afectados es malo puesto que la tasa de supervivencia para los pacientes con linfoma es baja. Claramente, se requieren nuevos procedimientos para tratar estas enfermedades.

Si bien los tratamientos tradicionales de los linfomas típicamente dependen del tipo de linfoma y la historia médica del paciente, el tratamiento de primera línea de muchos linfomas incluye quimioterapia. Frecuentemente, tal quimioterapia incluye la administración de una "combinación" de compuestos, por ejemplo, la formulación CHOP, que incluye ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona. Además, ciertos tratamientos de primera línea de cánceres incluyen también otras formas de terapia del cáncer, tales como radioterapia.

En muchos casos, los pacientes responden inicialmente a tales tratamientos de primera línea, pero posteriormente hay una recidiva, esto es, el tumor reaparece o sigue creciendo. Después de esta recidiva, con frecuencia, los pacientes siguen siendo tratados con más quimioterapia, por ejemplo, con CHOP o con otras formulaciones o, en algunos casos, los pacientes son tratados por otros procedimientos tales como trasplante de médula ósea. Nuevamente, en muchos casos, los pacientes responden inicialmente a tales tratamientos adicionales pero posteriormente tienen otra recidiva. En general, cuantas más recidivas tiene un paciente, hay menos acuerdo en la técnica en cuanto al mejor tratamiento posterior. En otros casos, el paciente no responde en absoluto al tratamiento, incluso inicialmente, y se dice por ello que tiene un cáncer refractario. Tampoco en estos casos hay acuerdo en la técnica sobre el mejor tratamiento posterior.

Los alcaloides aislados de la planta vincapervinca (*Vinca rosea*), denominados "alcaloides de vinca", han demostrado ser eficaces para el tratamiento de primera línea de muchos tipos de linfomas, leucemia y otros cánceres. Uno de tales alcaloides de vinca, la vincristina, está incluido en la formulación quimioterapéutica común CHOP. Las vincristina, que despolariza microtúbulos y por ello inhibe la proliferación de células, se administra en CHOP en su forma libre. Se ha dado cuenta de vincristina encapsulada en liposoma (véase, por ejemplo, patente U.S. n.º. 5.741.516 o patente U.S. n.º. 5.714.163). En particular, estas patentes discuten el uso de vincristina encapsulada en fosfatidilcolina, diestearylfosfatidilcolina o esfingomielina, además de en colesterol. Sin embargo, nunca se han conseguido aplicaciones clínicas con éxito de esta tecnología. De hecho, permanecen importantes incertidumbres teóricas y prácticas, incluso incertidumbres en cuanto a biodistribución, toxicidad y eficacia.

Las formulaciones de fármacos encapsulados en lípidos pueden proporcionar ventajas sobre los procedimientos tradicionales de suministro de fármacos. Por ejemplo, algunas formulaciones basadas en lípidos proporcionan semividas más largas *in vivo*, una selección de tejido diana superior y una toxicidad aminorada. Para la formulación de vehículos de suministro de fármacos basados en lípidos se han descrito numerosos procedimientos. (Véase, por ejemplo, patente U.S. n.º. 5.741.516). Ningún estudio, sin embargo, ha demostrado que tales formulaciones de alcaloide de vinca encapsulado en liposoma ofrecen ventajas sobre tratamientos previos o que tienen eficacia en el tratamiento *in vivo* de un paciente de cáncer. Por ello, siguen siendo necesarios en la técnica nuevos procedimientos para tratar estas enfermedades. Sorprendentemente, la presente invención proporciona tales procedimientos.

**Sumario de la invención**

Se ha descubierto ahora que los alcaloides de vinca encapsulados en liposoma, tales como vincristina, son especialmente eficaces en el tratamiento de primera línea de neoplasias así como el tratamiento de formas recidivantes de neoplasias, en particular de linfomas tales como los linfomas ahodgkinianos. Se proporcionan aquí, por tanto, de acuerdo con la reivindicación 1, procedimientos para el tratamiento de estos y otros cánceres.

En un aspecto, esta invención proporciona un procedimiento para tratar un cáncer reaparecido en un mamífero, procedimiento que comprende administrar al mamífero una composición farmacéutica que comprende un alcaloide de vinca encapsulado en liposoma. En una realización, el cáncer reaparecido es un linfoma ahodgkinianos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un linfoma ahodgkinianos en un paciente, procedimiento que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un alcaloide de vinca encapsulado en liposoma, estando la composición exenta de cardiolipina.

## ES 2 333 400 T3

En una realización, el linfoma ahodgkinianos es un miembro seleccionado entre el grupo constituido por NHL agresivo, NHL transformado, NHL indolente, NHL reaparecido, linfoma ahodgkinianos de bajo grado, linfoma folicular, linfoma de células grandes, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de células de manto, linfoma de Burkin, linfoma de linfocitos NK (citofíticos naturales), linfoma de células B grandes difuso y linfoma linfoblástico agudo.

El alcaloide de vinca es vincristina. En una realización, el liposoma comprende diestearoilfosfatidilcolina o esfingomielina. En otra realización, el liposoma comprende además colesterol. En otra realización, el liposoma comprende un gradiente de pH. En otra realización, el pH en el interior de los liposomas es inferior al pH en el exterior.

El mamífero es un ser humano. El mamífero ha sido sometido previamente al menos a un tratamiento quimioterapéutico. En una realización, el tratamiento quimioterapéutico comprendía la administración de un alcaloide de vinca libre, tal como vincristina, vinblastina, vindesina o vinorelbina. En otras realizaciones, el tratamiento quimioterapéutico incluía una terapia de combinación que contenía antraciclina. En tal tratamiento, la antraciclina era dexametasona. En otra realización, el mamífero ha exhibido una respuesta parcial o completa a la quimioterapia antes de la recidiva del cáncer. En otra realización, la recidiva es una segunda recidiva.

En otra realización, el alcaloide de vinca encapsulado en liposoma se administra sistémicamente por vía intravenosa. En otra realización, la vincristina encapsulada en liposoma se coadministra con ciclofosfamida, dexametasona, y o prednisona, formando CHOP (o, en este caso, "lipo-CHOP"). En otra realización, el alcaloide de vinca encapsulado en liposoma se coadministra con al menos un agente antitumoral adicional. En otra realización, el agente antitumoral adicional es un anticuerpo monoclonal antitumoral, tal como Oncolym<sup>MC</sup>, Rituxan<sup>MC</sup> o Bexxar<sup>MC</sup>. En otra realización, el agente antitumoral adicional es un fármaco antisentido o una vacuna antitumoral. En otra realización, el alcaloide de vinca encapsulado en liposoma se coadministra con un tratamiento profiláctico o terapéutico para la neurotoxicidad, tal como la gabapentina Neurontin<sup>MC</sup> (Neurotonina).

En otra realización, el alcaloide de vinca encapsulado en liposoma se administra a un mamífero una vez cada 7-21 días, preferiblemente cada 14 días. En otra realización, el alcaloide de vinca encapsulado en liposoma se administra a una dosificación dentro del intervalo de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,4 mg/m<sup>2</sup>.

La presente invención proporciona una mejora de los procedimientos convencionales para tratar el cáncer. En particular, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un linfoma agresivo, reaparecido, transformado, indolente o refractario en un mamífero, mejora que comprende administrar al mamífero un alcaloide de vinca encapsulado en liposoma, en forma de vincristina (u otro agente terapéutico encapsulado en liposoma).

La presente invención proporciona también el uso de un alcaloide de vinca encapsulado en liposoma en la preparación de un medicamento para tratar una neoplasia, incluido un linfoma ahodgkinianos. La neoplasia es una neoplasia recidivante, poco activa, agresiva, o transformada, por ejemplo, un linfoma ahodgkinianos. El alcaloide de vinca es vincristina. En otros usos preferidos, el alcaloide de vinca está presente en el medicamento a una dosificación de, por ejemplo, aproximadamente de 2,4 a aproximadamente 3,4 mg/m<sup>2</sup>, y se administra una vez cada 7-21 días, muy preferiblemente cada 14 días.

### Definiciones

"Neoplasia", tal como se usa en esta memoria, se refiere a cualquier crecimiento aberrante de células, tumores, derrames malignos, verrugas, pólipos, tumores no sólidos, quistes y otros crecimientos. Un sitio de neoplasia puede contener una variedad de tipos de células, incluidas, no limitativamente, células neoplásicas, endotelios vasculares o células del sistema inmune, tales como macrófagos y leucocitos, etc.

Un "cáncer" en un mamífero se refiere a cualquiera de las afecciones causadas por el crecimiento anormal, descontrolado, de células. Las células capaces de causar cáncer, denominadas "células cancerosas", poseen varias propiedades características tales como proliferación descontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, rápido crecimiento y velocidad de proliferación, y ciertas características morfológicas. A menudo, las células cancerosas estarán en forma de un tumor, pero tales células pueden existir también solas en el mamífero o pueden estar como células cancerosas no tumorigénicas, tales como una célula de leucemia. Un cáncer se puede detectar por cualquiera de varias procedimientos, incluidos, pero no limitativamente, detección de la presencia de un tumor o tumores (por ejemplo, por medios clínicos o radiológicos), examen de células de un tumor u otra muestra biológica (por ejemplo, de una biopsia de tejido), medición de marcadores de sangre indicativos de cáncer (por ejemplo, CA125, PAP, PSA, CEA, AFP, HCG, CA19-9, CA15-3, CA27-29, LDH, NSE y otros) y detección de un genotipo indicativo de cáncer (por ejemplo, TP53, ATM, etc.). Sin embargo, un resultado negativo en uno o varios de los anteriores procedimientos de detección no indica necesariamente la ausencia de cáncer; por ejemplo, un paciente que ha exhibido una respuesta completa a un tratamiento de cáncer puede seguir teniendo todavía cáncer, como lo evidencia una recidiva posterior.

"Administración sistémica", tal como se usa en esta memoria, se refiere a la administración que conduce a una amplia biodistribución de un compuesto en el organismo. Administración sistémica significa que se expone a la mayoría de las partes del cuerpo a una cantidad útil, preferiblemente terapéutica, de un compuesto. Generalmente, la obtención de una amplia distribución requiere una vía de introducción tal que el compuesto no se degrade o se elimine rápidamente (como puede ser pasando primeramente por órganos (hígado, pulmón, etc.) o por unión rápida, no específica a

## ES 2 333 400 T3

células) antes de llegar al sitio enfermo. La administración sistémica de alcaloides de vinca encapsulados se obtiene preferiblemente por administración intravenosa.

5 “Linfoma” se refiere a un crecimiento maligno de linfocitos B o T del sistema linfático. “Linfoma” incluye numerosos tipos de crecimientos malignos, incluidos linfomas de Hodgkin y linfomas ahodgkinianos (NHL). “Linfoma ahodgkiniano” se refiere a un crecimiento maligno de linfocitos B o T en el sistema linfático que no es un linfoma Hodgkin (que se caracteriza, por ejemplo, por la presencia de células de Redd-Stemberg en la zona cancerosa). Los linfomas ahodgkinianos abarcan más de 29 tipos de linfoma, basándose las distinciones entre ellos en el tipo de células cancerosas. La clasificación particular depende del sistema particular de clasificación usado, tal como la Working Formulation, la clasificación de Rappaport y la clasificación REAL. En realizaciones preferentes se usa la clasificación REAL.

15 Un “cáncer reaparecido” o “linfoma reaparecido” se refiere a un cáncer o linfoma que se ha vuelto a presentar después de una remisión completa o parcial en respuesta a un tratamiento previo. La recidiva se puede definir de cualquier manera, incluida una reaparición o recrecimiento de un tumor detectada por ensayos clínicos, radiológicos o bioquímicos, o por un nivel aumentado de un marcador de cáncer. Los tratamientos previos pueden incluir, no limitativamente, quimioterapia, radioterapia y trasplantes de médula ósea.

20 Un linfoma ahodgkinianos “poco activo” es una clasificación que incluye formas de crecimiento lento de linfoma. Abarca lo que se denomina la categoría de grado bajo y algunas categorías de NHL de grado intermedio en la formulación Working. Los NHL poco activos no responden a veces a las terapias de cáncer convencionales, tales como quimioterapia y radioterapia.

25 Un linfoma ahodgkinianos “transformado” es una clasificación empleada a veces para describir un NHL indolente que adquiere un aspecto agresivo y responde mejor a las quimioterapias estándar.

30 Los pacientes con “cáncer refractario” o “linfoma refractario” son aquellos que no han logrado una remisión completa en el primer transcurso de una terapia de combinación o pacientes que no han logrado una remisión completa o parcial de la posterior quimioterapia. “Pacientes refractarios principales” son los que nunca han conseguido una remisión completa, incluido el primer tratamiento.

35 Una “enfermedad estable” es un estado en el que la terapia causa el cese del crecimiento o la prevalencia de un tumor o tumores medida por medios clínicos, radiológicos y bioquímicos usuales, aunque no haya regresión o disminución del tamaño o la prevalencia del tumor o tumores, esto es, cáncer que no decrece ni aumenta en extensión o gravedad.

40 “Respuesta parcial” o “remisión parcial” se refiere a la mejora de un estado canceroso, medida por el tamaño del tumor y/o los niveles del marcador del cáncer, en respuesta a un tratamiento. Típicamente, una “respuesta parcial” significa que ha disminuido el tamaño de un tumor o el nivel del marcador en aproximadamente 50% en respuesta a un tratamiento. El tratamiento puede ser cualquier tratamiento dirigido contra el cáncer, pero típicamente comprende quimioterapia, radioterapia, terapia con hormonas, cirugía, trasplante de médula ósea o células, inmunoterapia y otras. El tamaño de un tumor se puede detectar por medios clínicos o radiológicos. Los marcadores que indican tumores se pueden detectar por medios bien conocidos por los expertos, por ejemplo, ensayos ELISA y otros basados en anticuerpos.

45 “Respuesta completa” o “remisión completa” significa que un estado canceroso, medido por ejemplo, por el tamaño del tumor o los niveles de un marcador de cáncer, ha desaparecido después de un tratamiento tal como quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, trasplante de médula ósea o inmunoterapia. La presencia de un tumor se puede detectar por medios clínicos o radiológicos. Los marcadores indicadores de tumor se pueden detectar por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, ensayos ELISA u otros basados en anticuerpos. Una “respuesta completa” no indica necesariamente que se ha curado el cáncer, ya que a la respuesta completa puede seguir una recidiva.

50 “Quimioterapia” se refiere a la administración de agentes químicos que inhiben el crecimiento, la proliferación y/o la supervivencia de células cancerosas. Con frecuencia, tales agentes químicos están dirigidos a procesos intracelulares necesarios para el crecimiento o la división de células, y son así eficaces frente a células cancerosas que generalmente crecen y se dividen rápidamente. Por ejemplo, la vincristina despolimeriza microtúbulos e inhibe así que las células entren en mitosis. En general, la quimioterapia puede incluir cualquier agente químico que inhibe, o que está diseñado para inhibir, una célula cancerosa o que probablemente se convierta en cancerosa una célula. Frecuentemente, tales agentes se administran, y a menudo son así muy eficaces, en combinación, por ejemplo, en la formulación de CHOP.

55 “Radioterapia” se refiere a la administración de radiactividad a un animal con cáncer. La radiación mata o inhibe el crecimiento de células que se dividen, tales como células cancerosas.

60 “Cirugía” es la eliminación directa o ablación de células, por ejemplo, células cancerosas, de un animal. Muy frecuentemente, las células cancerosas estarán en forma de un tumor (por ejemplo, resultante de un linfoma) que se elimina del animal.

## ES 2 333 400 T3

“Terapia hormonal” se refiere a la administración de compuestos que contrarrestan o inhiben hormonas tales como estrógenos o andrógenos que tienen un efecto mitogénico sobre células. A menudo, estas hormonas actúan para acrecentar las propiedades cancerosas de células cancerosas *in vivo*.

5 “Inmunoterapia” se refiere a procedimientos para intensificar la capacidad de un sistema inmune de un animal para destruir células cancerosas en el animal.

Agente en “forma libre”, o agente terapéutico “libre” se refiere a un agente terapéutico que no está encapsulado en liposoma. Usualmente, se presume que un fármaco es “libre”, o que está “en forma libre”, cuando no se especifica lo contrario. Un alcaloide de vinca en forma libre puede estar presente, empero, en combinación con otros reactivos, tales como otros compuestos terapéuticos, un vehículo farmacéutico o agentes complejantes, esto es, tal como se usa aquí, el término sólo excluye específicamente formulaciones lipídicas de los alcaloides de vinca.

### 15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra resultados de un ensayo clínico en el que se usan los procedimientos aquí descritos, considerando en especial la eficacia de los procedimientos en el tratamiento de las formas poco activa, transformada, recidivante y agresiva después de trasplante de médula (BMT) de linfoma ahodgkinianos.

20 La Figura 2 muestra resultados concernientes a la respuesta a vincristina liposomal en NHL agresivo recidivante, en particular en cuanto al efecto del número de régimen anterior.

### 25 Descripción detallada de la invención y Realizaciones preferentes

Esta invención proporciona un uso de acuerdo con la reivindicación 1. Esta invención está basada en el descubrimiento de que los alcaloides de vinca encapsulados en liposoma son inusualmente eficaces en el tratamiento de una variedad de formas de linfoma. En particular, se hizo el sorprendente descubrimiento de que la administración de alcaloides de vinca encapsulados en liposoma aumenta la supervivencia media de pacientes con linfoma. La vincristina, encapsulada en un liposoma basado en esfingomielina o colesterol, se usa en el tratamiento de formas recidivantes de linfoma ahodgkinianos (NHL). La invención proporciona también, *inter alia*, procedimientos para tratar formas poco activas, transformadas y agresivas de NHL.

35 Con frecuencia, tales tratamientos de las formas recidivante, poco activa, transformada y agresiva de linfomas ahodgkinianos se administran después de un tratamiento primario anticanceroso, tal como quimioterapia y radioterapia, seguido de una respuesta completa o al menos parcial de como mínimo un tratamiento. En cualquiera de estas realizaciones, los alcaloides de vinca encapsulados en liposoma se pueden suministrar como un agente individual o en una terapia de combinación.

40 La presente invención proporciona además dosificaciones y programas de dosis de alcaloides de vinca liposómicas para el tratamiento, con una toxicidad reducida, de tumores sólidos y no sólidos.

#### 45 I. Cánceres tratables con alcaloides de vinca encapsulados en lípido

Los procedimientos descritos en esta memoria se pueden usar para tratar cánceres de la sangre y el sistema linfático, incluidos linfomas y leucemia.

50 En realizaciones preferentes, los presentes procedimientos se usan para tratar cualquiera de un gran número de linfomas. Por ejemplo, usando los procedimientos descritos en esta memoria se pueden tratar linfomas ahodgkinianos (NHL), incluido cualquier tipo de NHL según se define en cualquiera de los diversos sistemas de clasificación tales como la formulación Working, la clasificación de Rappaport y, preferiblemente, la clasificación REAL. Entre tales linfomas están incluidos, no limitativamente, los linfomas de grado bajo, grado intermedio y grado alto, así como los linfomas de células B y los de células T. Incluidos en estas categorías están los diversos tipos de células pequeñas, células grandes, células escindidas, linfocíticos, foliculares, difusos, de Burkitt, de células de manto, SNC y relacionados con SIDA, linfoblásticos, linfoblásticos de adulto, indolente, agresivo, transformado y otros tipos de linfomas. Los procedimientos de la presente invención se pueden usar para formas de adulto o de niño, así como linfomas en cualquier etapa, por ejemplo, etapa I, II III o IV. Los expertos en la técnica conocen bien los diversos tipos de linfoma, que han sido descritos, por ejemplo, por la American Cancer Society (véase, por ejemplo, [www3.cancer.org](http://www3.cancer.org)).

65 Los procedimientos aquí descritos también se aplican preferiblemente a cualquier forma de leucemia, incluidas las formas de adulto y niño de esta enfermedad. Por ejemplo, cualesquiera formas agudas, crónicas, mielogenosas y linfocíticas de la enfermedad se pueden tratar usando los procedimientos de la presente invención. En realizaciones preferentes, los procedimientos se usan para tratar la leucemia linfocítica aguda (ALL). Se pueden encontrar más información sobre los varios tipos de leucemia en, *Inter. alia*, la Leukemia Society of America (véase, por ejemplo, [www.leukemia.org](http://www.leukemia.org)).

## II. Formas reaparecida o refractaria de la enfermedad

Los presentes procedimientos se pueden usar para tratar las formas primaria, reaparecida, transformada o refractaria de cáncer. Con frecuencia, los pacientes con cánceres reaparecidos han sido sometidos a uno o varios tratamientos, que incluyen quimioterapia, radioterapia, trasplantes de médula ósea, terapia hormonal, cirugía y similares. De los pacientes que responden a tales tratamientos, algunos pueden presentar una enfermedad estable, otros una respuesta parcial (esto es, el tumor o el marcador de cáncer disminuye en al menos 50%) o una respuesta completa (esto es, el tumor así como los marcadores son indetectables). En cualquiera de estos escenarios, el cáncer puede reaparecer, lo que significa una recidiva del cáncer.

En ciertas realizaciones, los procedimientos proporcionados en esta invención se usarán para tratar un paciente que ha sido sometido a un tratamiento único para cáncer, que ha respondido parcial o totalmente a este tratamiento y posteriormente ha tenido una recidiva. En otras realizaciones, se tratan pacientes que han sido sometidos a más de un único tratamiento, han respondido más de una vez y posteriormente han tenido más de una recidiva. El tratamiento previo puede incluir cualquier tratamiento anticanceroso, incluida quimioterapia, radioterapia, trasplante de médula ósea, etc.

En ciertas realizaciones de la presente invención, los alcaloides liposomales se emplean frente a cánceres “resistentes”, esto es, cánceres que previamente han presentado una respuesta completa al tratamiento, pero que posteriormente manifiestan resistencia a un posterior tratamiento.

## III. Alcaloides de vinca y otros

La presente invención puede incluir el uso de cualquier alcaloide natural, incluidos alcaloides de vinca, o cualquier derivado sintético de un alcaloide natural. El grupo de alcaloides de vinca incluye, no limitativamente, vinblastina, vincristina, vindolina, vindesina, vinleurosina, vinrosidina, vinorelbina, o derivados de los mismos (véase, por ejemplo, el Merck Index, 11ª edición (1989) entradas 9887, 9891 y 9893 para vinblastina, vincristina y vindolina). Entre los ejemplos de otros alcaloides adecuados están incluidos, no limitativamente, las podofilinas, podofilotoxinas y sus derivados (por ejemplo, etoposido, fosfato de etoposido, teniposido, etc), las canfotecinas (por ejemplo, irinotecan, topotecan, etc.), los taxanos (taxol, etc.) y sus derivados. Todos los compuestos anteriores son bien conocidos por los expertos en la técnica y son fácilmente asequibles de fuentes comerciales, por síntesis o por purificación de fuentes naturales.

El alcaloide de vinca usado en la presente invención es la vincristina. La vincristina, también conocida como sulfato de leurocristina, 22-oxovincalécoblastina, kyocristina, vincosid, vincex, oncovina, Vincasar PFS® o VCR, es adquirible comercialmente de cualquiera de varias fuentes, por ejemplo, Pharmacia & Upjohn, Lilly, IGT, etc. Frecuentemente se suministra como sulfato de vincristina, por ejemplo, como solución de 1 mg/ml.

La presente invención puede comprender el uso de un único alcaloide de vinca o múltiples alcaloides de vinca coadministrados. Además, el único o los varios alcaloides de vinca se pueden combinar con otros compuesto o moléculas, tales como otros agentes neoplásicos. En ciertas realizaciones, tales combinaciones de alcaloides de vinca y/u otros compuestos se pueden hacer antes como formulación liposomal, creando así una combinación dentro de un liposoma. Individual. En otras realizaciones, se formulan alcaloides de vinca encapsulados en liposoma y posteriormente se combinan con las otras moléculas, que pueden estar libres o encapsuladas en liposoma.

Cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en esta memoria, incluidos los alcaloides encapsulados en liposoma, se puede someter a un ensayo preclínico en modelos de enfermedades humanas bien conocidos. Los modelos *in vivo* de linfomas humanos incluyen ratones que portan la línea B DoHH2 de células ahodgkinianas (Kluin-Nelemens HC y otros (1991) *Leukemia* 5(3) 221-224) o ratones que portan xenografías de células de Daudi o Raji (véase, por ejemplo, Hudson WA y otros, (1998) *Leukemia* 12(12): 2029-2033). También se pueden usar muchos otros modelos oncológicos, conocidos por los expertos en la técnica.

## IV. Lípidos

Para preparar los liposomas de la presente invención, se puede usar uno cualquiera de una serie de lípidos, incluidos lípidos anfipáticos, neutros, catiónicos y aniónicos. Tales lípidos se pueden usar solos o en combinación y se pueden incluir también componentes estabilizadores de doble capa tales como oligómeros poliamida (véase, por ejemplo, solicitud de patente U.S. “Poliamide Oligomers”, por Ansell, n.º. serial de solicitud de patente U.S. 09/218.988, presentada el 22 de diciembre de 1998), péptidos, proteínas, detergentes, derivados lipídicos tales como PEG acoplado a fosfatidiletanolamina y PEG conjugado a ceramidas (véase solicitud de patente U.S, n.º. serial 08/485.608). En una realización preferente, también se pueden incluir agentes encubridores, tales como conjugados de poliamida-oligómero, por ejemplo, lípidos ATTA (véase, por ejemplo, solicitud de patente U.S, n.º. serial 08/996.783, presentada el 2 de febrero de 1998) y conjugados de PEG-lípido (véanse solicitudes de patente U.S. n.ºs seriales 08/486.214, 08/316.407 y 08/485.608).

Se puede incluir cualquier lípido neutro de una serie de lípidos neutros, esto es, cualquiera de las especies lipídicas que existen en forma no cargada o iónica híbrida neutra a un pH fisiológico, incluidas diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomiélinea, cefalina, colesterol, cerebrósidos y diacilglicerol.

## ES 2 333 400 T3

En realizaciones preferentes, el lípido usado es esfingomielina. En realizaciones particularmente preferentes, el lípido comprende esfingomielina y colesterol. En tales realizaciones, la relación de esfingomielina a colesterol típicamente es de entre aproximadamente 75/25 (% en moles de esfingomielina/% en moles de colesterol) y aproximadamente 50/50 (% en moles de esfingomielina/% en moles de colesterol), preferiblemente de entre aproximadamente 70/30 y 55/45 (% en moles de esfingomielina/% en moles de colesterol) y, muy preferiblemente, aproximadamente 55/45 (% en moles de esfingomielina/% en moles de colesterol). Sin embargo, tales relaciones se pueden alterar añadiendo otros lípidos en las presentes formulaciones.

Los lípidos catiónicos, que presentan una carga positiva neta a pH fisiológico, se pueden incorporar fácilmente en liposomas para uso en la presente invención. Entre tales lípidos figuran, no limitativamente, cloruro de N,N-dioleil-N,N'-dimetilamonio ("DODAC"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trietilamonio ("DOTMA"); bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio ("DDAB"), cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio ("DOTAP"); 3 $\beta$ -(N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil)colesterol ("DC-Chol"), trifluoroacetato de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-2-(espermincarboxamido)etil)-N,N-dimetilamonio (DOSPA), dioctadecilamidoglicilcarboxiespermina ("DOGS"), 1,2-dioleil-sn-3-fosfoetanol-amina ("DOPE"); y bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio ("DMRIE"). Adicionalmente se pueden usar varios preparados comerciales de lípidos catiónicos, tales como LIPOFECTIN (incluidos DOTMA y DOPE, adquiribles de GIBCO/BRL), LIPOFECTAMINE (que comprende DOSPA y DOPE, adquirible de GIBCO/BRL), y TRANSFECTAM (que comprende DOGS en etanol, de Promega Corp.).

Entre los lípidos aniónicos adecuados para uso en la presente invención están incluidos, no limitativamente, fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-dodecanoilfosfatidiletanol-amina, N-succinilfosfatidiletanolamina, N-glutarilfosfatidiletanolamina, lisilfosfatidilglicerol y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

En numerosas realizaciones se usarán lípidos anfipáticos. "Lípidos anfipáticos" se refiere a cualquier material adecuado en el que la porción hidrófoba del material lipídico se orienta a la fase hidrófoba, mientras que la porción hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Entre tales compuestos figuran, no limitativamente, fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos. Entre los fosfolípidos representativos están incluidos esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoilfosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina o dilinoleoilfosfatidilcolina. También se pueden usar otros compuestos que no tienen fósforo, tales como, esfingolípidos, familias de glicoesfingolípidos, diacilgliceroles y  $\beta$ -aciloxiácidos. Además, tales lípidos anfipáticos se pueden mezclar fácilmente con otros lípidos tales como triglicéridos y esteroides.

Los liposomas usados en la presente invención pueden ser multilaminares o unilaminares, que se pueden formar usando los procedimientos descritos en esta memoria y otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

También son adecuadas para inclusión en la presente invención formulaciones programables de lípidos de fusión. Tales formulaciones tienen poca tendencia a fusionarse con membranas celulares y suministran su carga dañina hasta que se produce un acontecimiento de señal dado. Esto permite que la formulación lipídica se distribuya más uniformemente tras la inyección en un organismo o el sitio de enfermedad antes de empezar a fusionarse con células. El acontecimiento señalizador puede ser, por ejemplo, un cambio del pH, temperatura, medio iónico o el tiempo. En este último caso, una demora de la fusión o componente de "encubrimiento", tal como un conjugado de ATTA-lípido o un conjugado de PEG-lípido, puede salir con el tiempo de la membrana de liposoma por intercambio. Cuando la formulación se ha distribuido adecuadamente en el cuerpo, ha perdido suficiente agente encubridor para ser fusogénico. Con otros acontecimientos señalizadores, es deseable escoger una señal que esté asociada con el sitio enfermo o la célula diana, como puede ser una temperatura más alta en el sitio de una inflamación.

### V. Producción de liposomas

Hay disponibles una variedad de procedimientos para preparar liposomas, como se describen, por ejemplo, en Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9:467 (1980), Szoka y otros; patentes U.S. n<sup>os</sup>. 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028, 4.946.787; publicación de PCT n<sup>o</sup>. WO 91/17424; Biochim. Biophys. Acta 443:629-634 (1976), Deamer y Bangham; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3348-3352 (1979), Fraley y otros; Biochim. Biophys. Acta 812:55-65 (1985), Hope y otros; Biochim. Biophys. Acta 858:161-168 (1986), Mayer y otros; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:242-246 (1988), Williams y otros; el texto *Liposomes*, Marc J. Ostro, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, capít. I; y Chem. Phys. Lip. 40:89 (1986), Hope y otros, incorporándose todos ellos a esta memoria por referencia. Entre los procedimientos adecuados están incluidos, no limitativamente, sonicación, extrusión, alta presión/homogeneización, microfluidización, diálisis con detergente, fusión inducida por calcio de pequeñas vesículas de liposoma y otros procedimientos de éter-infusión, todos ellos bien conocidos en la técnica.

Un procedimiento produce vesículas multilaminares de tamaños heterogéneos. En este procedimiento, los lípidos que forman vesículas se disuelven en un disolvente orgánico o sistema disolvente y se secan en vacío o en un gas inerte para formar una delgada capa de lípido. Si se desea, la película se puede redissolver en un disolvente adecuado, tal como butanol terciario, y luego se liofiliza para formar una mezcla de lípidos más uniforme que está en forma más fácilmente hidratada, del tipo de polvo. La película se cubre con una solución acuosa tamponada y se deja que se

## ES 2 333 400 T3

hidrate, típicamente durante un período de 15-60 minutos con agitación. La distribución de tamaños de las vesículas multilaminares resultantes se puede desplazar hacia tamaños menores por hidratación de los lípidos en condiciones de una agitación más vigorosa o añadiendo detergentes solubilizantes tales como desoxicolato.

5 Las vesículas unilaminares se pueden preparar por sonicación o extrusión. La sonicación se realiza generalmente con un sonicador de punta, tal como un sonicador de punta Branson, en baño de hielo. Típicamente, la suspensión se somete a varios ciclos de sonicación. La extrusión se puede realizar por dispositivos de extrusión de biomembrana, tales como un Lípex Biomembrane Extruder. Un tamaño de poro definido de los filtros de extrusión puede generar vesículas liposomales unilaminares de tamaños específicos. Los liposomas se pueden formar también por extrusión  
10 a través de un filtro cerámico asimétrico, tal como un microfiltro Ceraflow, asequible comercialmente de la Norton Company, Worcester MA. Las vesículas unilaminares se pueden hacer también disolviendo fosfolípidos en etanol e inyectando luego los lípidos en un tampón, lo que causa que los lípidos formen espontáneamente vesículas unilaminares. También se pueden solubilizar fosfolípidos en un detergente, por ejemplo, colatos, Triton-X o n-alkilglucósidos. Después de añadir el fármaco a las micelas de lípido-detergente solubilizadas, se elimina el detergente por cualquiera  
15 de una serie de posibles procedimientos, incluidas diálisis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, centrifugación y ultrafiltración.

Después de la preparación de los liposomas, los liposomas que no se han clasificado al tamaño deseado durante la formación, se pueden dimensionar para conseguir el intervalo de tamaños deseado y una distribución de tamaños de los  
20 liposomas relativamente estrecha. Un intervalo de tamaños de aproximadamente 0,2-0,4 micrómetros permite que la suspensión de liposoma se esterilice por filtración a través de un filtro convencional. El procedimiento de esterilización por filtración se puede realizar sobre la base de alta producción si los liposomas se han reducido a aproximadamente 0,2-0,4 micrómetros.

Hay disponibles varias técnicas para obtener liposomas de un tamaño deseado. Un procedimiento se describe en la patente U.S. n.º. 4.737.323, que se incorpora aquí por referencia. La sonicación de una suspensión de liposoma por sonicación en baño o con sonda produce una reducción de tamaño progresiva a vesículas unilaminares pequeñas, de  
25 menos de aproximadamente 0,05 micrómetros. La homogeneización es otro procedimiento basado en la energía de cizalladura para fragmentar liposomas grandes en liposomas menores. En un procedimiento típico de homogeneización, las vesículas multilaminares recirculan a través de un homogeneizador de emulsiones estándar hasta los tamaños de liposoma seleccionados, observándose típicamente de entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micrómetros. El tamaño de las vesículas liposomales puede determinarse por dispersión cuasieléctrica de la luz (QELS), descrita por Bloomfield, en  
30 Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421-450 (1981), que se incorpora aquí por referencia. Los diámetros medios de liposoma se pueden reducir por sonicación de liposomas formados. Se pueden alternar ciclos intermitentes de sonicación con estimación por QELS para guiar una síntesis eficiente de liposomas.  
35

La extrusión de liposomas a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño es también un procedimiento eficaz para reducir los tamaños de liposomas a una distribución de tamaños relativamente bien definida. Típicamente, la suspensión se afina a través de la membrana una o varias veces hasta que se alcanza la distribución  
40 deseada de tamaños del liposoma. Los liposomas se pueden extruir a través de membranas de poro sucesivamente menor para conseguir una reducción gradual del tamaño del liposoma. Para uso en la presente invención, se prefieren liposomas que tienen un tamaño de entre aproximadamente 0,05 micrómetros y aproximadamente 0,40 micrómetros. En realizaciones particularmente preferentes, los liposomas tienen un tamaño de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,2 micrómetros.  
45

En realizaciones preferentes, se preparan liposomas vacíos usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Típicamente, como se discute más adelante, los liposomas usados en la presente invención comprenderán un potencial de transmembrana, por lo que los agentes antineoplásicos tales como los alcaloides de vinca se cargan eficazmente en el liposoma y son retenidos por él. En realizaciones preferentes, el potencial se efectuará creando un gradiente del pH a través de la membrana. En realizaciones particularmente preferentes, el pH es más bajo en el interior de los liposomas que en el exterior. Tales gradientes pueden lograrse, por ejemplo, formulando los liposomas en presencia de un tampón con un pH más bajo, por ejemplo, que tiene un pH de entre aproximadamente 2 y aproximadamente  
50 6, y pasando posteriormente los liposomas a una solución de pH más alto. En realizaciones preferentes, el pH es de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 y en realizaciones muy preferentes, el pH es de aproximadamente 4. Se puede usar cualquiera de varios tampones, por ejemplo citrato.  
55

Posteriormente, antes o después de la obtención de los tamaños deseados, se puede elevar el pH, por ejemplo, a  
60 7 o 7,5, añadiendo un tampón adecuado, tal como un tampón de fosfato sódico. La elevación del pH externo crea un gradiente de pH a través de la membrana liposomal, con lo que se promueve la carga y retención eficientes del fármaco.

Los liposomas preparados de acuerdo con estos procedimientos se pueden almacenar durante períodos de tiempo sustanciales antes de cargar el fármaco y administrarlo a un paciente. Por ejemplo, los liposomas se pueden deshidratar, almacenar y luego rehidratar, cargar con uno o varios alcaloides de vinca y administrar. La deshidratación se puede realizar, por ejemplo, usando aparatos estándar de liofilización-secado, esto es, se deshidratan en condiciones de baja presión. También, los liposomas se pueden congelar, por ejemplo en nitrógeno líquido, antes de la deshidratación. Se  
65

## ES 2 333 400 T3

pueden añadir azúcares al medio liposomal, por ejemplo, al tampón que contiene los liposomas, antes de la deshidratación, con lo que se promueve la integridad del liposoma durante la deshidratación. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n.º. 5.077.056 o n.º. 5.736.155.

5 En numerosas realizaciones, los liposomas vacíos se formulan primeramente en tampón de pH bajo y luego se manipulan de una o varias maneras para obtener liposomas del tamaño deseado. Entre los procedimientos para clasificar los liposomas a los tamaños deseados están incluidas la sonicación en baño o con sonda, o la homogeneización. Preferiblemente, después de tales tratamientos, los liposomas tienen un tamaño de entre aproximadamente 0,05 y 0,45 micrómetros. Muy preferiblemente, los liposomas son de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,2 micrómetros. Los liposomas de estos tamaños se pueden luego esterilizar por filtración. También la distribución del tamaño de partícula se puede controlar por discriminación del tamaño de partícula con haz de láser o procedimientos similares. Además, los procedimientos para reducir el tamaño de los liposomas a una distribución de tamaños bien definida son bien conocidos, por ejemplo, mediante uno o varios ciclos de extrusión de los liposomas a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño o una membrana cerámica asimétrica.

15

### VI. Preparación de alcaloides de vinca encapsulados en liposoma

Para cargar los alcaloides de vinca y/u otros fármacos en los liposomas se pueden utilizar varios procedimientos. Entre tales procedimientos están incluidos, por ejemplo, la técnica de encapsulación y un procedimiento de carga de potencial de transmembrana. Generalmente, a continuación de tales procedimientos los alcaloides de vinca están presentes en aproximadamente de 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,5 mg/ml. Preferiblemente, los alcaloides de vinca están presentes en aproximadamente de 0,15 a 0,2 mg/ml.

25 En una técnica de encapsulación, los componentes fármaco y liposoma se disuelven en un disolvente orgánico en el que todas las especies son miscibles y se concentran a una película. Se añade luego un tampón a la película seca y se forman liposomas que tienen incorporado el fármaco en las paredes de las vesículas. Alternativamente, se puede poner el fármaco en un tampón y añadirlo a la película seca de sólo componentes lipídicos. De esta manera, el fármaco quedará encapsulado en el interior del liposoma. El tampón que se usa en la formación de los liposomas puede ser cualquier solución tampón biológicamente compatible, por ejemplo, solución salina isotónica, solución salina tamponada con fosfato, u otros tampones de baja fuerza iónica. Los liposomas resultantes que comprenden los alcaloides de vinca se pueden dimensionar como se ha indicado antes.

30 La carga de potencial de transmembrana ha sido descrita detalladamente en las patentes U.S. n.º. 4.885.172, n.º. 5.059.421, n.º. 5.171.578 y n.º. 5.837.282 (que da cuenta de la carga ionófora), cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia. En resumen, el procedimiento de carga de transmembrana se puede usar esencialmente con cualquier fármaco que pueda existir en estado cargado cuando se disuelve en un medio acuoso apropiado. Preferiblemente, el fármaco será relativamente lipófilo de manera que se repartirá en las membranas de liposoma. Se crea un potencial de transmembrana a través de las bicapas de los liposomas o complejos de proteína-liposoma y el fármaco se carga en el liposoma mediante el potencial de transmembrana. El potencial de transmembrana se genera creando un gradiente de concentración para una o varias especies cargadas (por ejemplo, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y/o H<sup>+</sup>) a través de las membranas. Este gradiente de concentración se genera produciendo liposomas que tienen el medio interno y el medio externo diferentes y tiene un gradiente de protones asociado. La acumulación de fármaco puede producirse de una manera predicha por la ecuación de Henderson-Hasselbach.

45

Los procedimientos preferidos para preparar alcaloides de vinca encapsulados en liposoma para uso en la presente invención se discuten en, por ejemplo, las patentes U.S. n.º. 5.741.516, n.º. 5.814.335 y n.º. 5.543.152, cada una de las cuales está cedida a Inex Pharmaceuticals Corp. y se incorpora aquí por referencia. En una realización preferente, los alcaloides de vinca liposomales se preparan antes del uso con un kit que proporciona 3 o más viales. Al menos uno de los viales contiene una solución de vincristina que contiene, por ejemplo, 1 mg/ml, 2 mg/ml o 5 mg/ml de sulfato de vincristina en un tampón que contiene, por ejemplo, 100 o 200 mg/ml de manitol (obtenible de, por ejemplo, SP Pharmaceuticals LLC, Albuquerque, NM; se pueden usar también otros excipientes que son farmacéuticamente aceptables y en los que la vincristina permecece estable durante largos períodos de tiempo) y acetato sódico con pH ajustado a 3,5-5,5 o, preferiblemente, a pH de 4,5 a 4,7. Uno de los viales contiene una solución que contiene liposomas que comprenden esfingomiélin y colesterol (cada uno de los cuales es asequible comercialmente de, por ejemplo, NEN Life Sciences, Avanti Polar Lipids, etc.) y en suspensión en un tampón de citrato 300 mM a, por ejemplo, pH 4,0. Otro vial u otros viales contiene(n) un tampón de fosfato alcalino (por ejemplo, pH 9,0) tal como fosfato sódico dibásico, 14,2 mg/ml (20 ml/vial).

60 En otras realizaciones preferentes, se usa un kit que contiene 2 viales que contienen componentes que se pueden usar para formular la vincristina encapsulada en liposoma reivindicada, o un kit que contiene 1 vial que contiene una preparación estable de liposomas que contienen vincristina precargada. Tales preparaciones estables se pueden hacer por varias rutas, incluidas, no limitativamente, mediante (1) una preparación hidratada almacenada a temperatura ambiente o refrigerada y que contiene una o varias modificaciones o componentes para intensificar la estabilidad química, por ejemplo, antioxidantes; (2) una preparación hidratada que se congeló y que incluye un excipiente adecuado para proteger frente al daño inducido por congelación/descongelación; o (3) una preparación liofilizada. Típicamente, cualquiera de los kits descritos contiene instrucciones para uso y para limpieza de materiales de desecho.

65

## ES 2 333 400 T3

Para preparar los liposomas, cada una de las soluciones de sulfato de vincristina y liposoma se añade a un vial estéril y se mezclan entre sí, en una relación de concentración apropiada, por ejemplo, 0,01/1,0 a 0,2/1,0 (peso de alcaloide de vinca/peso de lípido). La mezcla se mezcla, por ejemplo, invirtiendo varias veces el vial. Después de la formación de los liposomas en un tampón de pH bajo y, antes o después de reducir los liposomas al tamaño adecuado, los liposomas se introducen en un tampón de pH más alto, por ejemplo, en un tampón de fosfato sódico, con lo que se crea un gradiente de pH a través de la superficie del liposoma. En realizaciones preferentes, el medio externo de los liposomas tiene un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5. Los liposomas y los alcaloides de vinca se pueden mezclar durante un tiempo suficiente para conseguir la relación deseada de alcaloide/lípido. La mezcla se puede seguir mezclando, por ejemplo, invirtiendo los viales varias veces, y calentar a temperaturas entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 80°C, preferiblemente entre aproximadamente 60°C y aproximadamente 65°C durante aproximadamente 5, 10 o más minutos. Tal tratamiento causa que más de aproximadamente 90% de la vincristina quede atrapado dentro del liposoma. En otras realizaciones, estas etapas se realizan a gran escala y se suministra vincristina liposómica cargada, por ejemplo, a la farmacia de un hospital, en formato dispuesto para ser administrada. Tales formulaciones a gran escala se pueden preparar con materiales de partida diferentes a los descritos para el kit; en particular, los tampones pueden ser diferentes.

### VII. *Liposomas que seleccionan dianas*

En ciertas realizaciones, es deseable que los liposomas de la invención seleccionen dianas usando restos selectores de dianas específicos para un tipo de célula o tejido. Se ha descrito anteriormente cómo hacer que los liposomas seleccionen dianas usando varios restos selectores de dianas, tales como ligandos, receptores de células de superficie, glicoproteínas, vitaminas (por ejemplo, riboflavina) y anticuerpos monoclonales (véanse, por ejemplo, patentes U.S. n.º. 4.957.773 y 4.603.044, cuya doctrina se incorpora aquí por referencia). Los restos selectores pueden comprender la proteína entera o fragmentos de ella.

Generalmente, el mecanismo de la capacidad de identificar dianas requiere que los agentes selectores estén situados en la superficie del liposoma de manera que el resto selector esté disponible para interactuar con la diana, por ejemplo, un receptor de células de superficie. El liposoma se diseña para incorporar una porción conectora en la membrana en el momento de formación del liposoma. La porción conectora debe tener una porción lipófila que está firmemente embebida y anclada en la membrana. Debe tener también una porción hidrófila que es químicamente accesible sobre la superficie acuosa del liposoma. La porción hidrófila se selecciona que sea químicamente adecuada con el agente selector de manera que la porción y el agente formen un enlace químico adecuado. Por tanto, la porción conectora usualmente se extiende desde la superficie liposomal y está configurada para situar correctamente el agente selector de la diana. En algunos casos, es posible unir directamente el agente selector de diana a la porción conectora, pero, en muchos casos, es más adecuado usar una tercera molécula para que actúe como "puente molecular". El puente une la porción conectora y el agente selector de dianas fuera de la superficie de liposoma, por lo que el agente selector de dianas queda libremente disponible para que interactúe con la diana celular.

Se pueden usar procedimientos estándar para acoplar los agentes selectores de dianas. Por ejemplo, se puede usar fosfatidiletanolamina, que se puede activar para la unión de agentes selectores de dianas, o compuestos lipófilos derivatizados, tales como bleomicina derivatizada lipídica. Se pueden construir liposomas para diana de anticuerpo usando, por ejemplo, liposomas que incorporan proteína A (véase Renneisen y otros, *J. Bio. Chem.*, 265:16337-16342 (1990) y Leonetti y otros, *Proced. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 87:2448-2451 (1980)). Se describen otros ejemplos de conjugación de anticuerpo en la solicitud de patente U.S. n.º. serial 08/316.394, presentada el 30 de septiembre de 1994, cuya doctrina se incorpora aquí por referencia. Los ejemplos de restos selectores de diana pueden incluir también otras proteínas, específicas para componentes celulares, incluidos antígenos asociados con neoplasmas o tumores. Las proteínas usadas como restos selectores de dianas se pueden unir a los liposomas mediante enlaces covalentes (Véase Heath, *Covalent Attachment of Proteins to Liposomes*, 149 *Methods in Enzymology* 11-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Entre otros procedimientos de selección de dianas está incluido el sistema de biotina-avidina.

### VIII. *Administración de alcaloide de vinca encapsulados en lípido*

Los alcaloides de vinca encapsulados en liposoma se pueden administrar por cualquiera de varias vías, incluidas la parenteral, intravenosa, sistémica, local, intratumoral, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, por inhalación o por cualquier procedimiento de administración. En realizaciones preferentes, las composiciones farmacéuticas se administran intravenosamente por inyección. En una realización, se infunden al paciente por vía intravenosa los alcaloides encapsulados en liposoma (único agente) a través de un tubo intravenoso a lo largo de, por ejemplo, 30 min, 60 min, 90 min o más. En realizaciones preferentes se usa una infusión de 60 min. Tales infusiones se pueden realizar periódicamente, por ejemplo, una vez cada 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 o 28 días o períodos más largos, preferiblemente una vez cada 7-21 días y, muy preferiblemente, una vez cada 14 días. Tal como se usa aquí, se considera que cada administración de un alcaloide de vinca liposómico es una "ciclo" de tratamiento.

La formulación adecuada para uso en la presente invención se puede encontrar, por ejemplo, en la obra *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa, 17ª. Ed. (1985). Con frecuencia, las composiciones intravenosas comprenderán una solución de los liposomas en suspensión en un vehículo aceptable, tal como un vehículo acuoso. Se puede usar cualquiera de varios vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada,

## ES 2 333 400 T3

solución salina al 0,4%, solución salina isotónica al 0,9%, glicina al 0,3%, dextrosa al 5% y otras similares, y pueden incluir glicoproteínas para intensificar la estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina. Frecuentemente se usará solución salina tamponada normal (NaCl 135-150 mM). Estas composiciones se pueden esterilizar por técnicas convencionales de esterilización tales como filtración. Las composiciones pueden contener sustancias coadyuvantes farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tampón y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, humectantes, etc., por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, etc. Estas composiciones se pueden esterilizar usando técnicas a las que se ha hecho referencia antes, o se pueden producir en condiciones estériles. La concentración de los liposomas en el vehículo puede variar. Generalmente, la concentración será de aproximadamente 20-200 mg/ml, aunque las persona expertas pueden variar la concentración para optimizar el tratamiento con diferentes componentes de liposomas o para pacientes particulares. Por ejemplo, la concentración se puede aumentar para disminuir la carga de fluido asociada con el tratamiento.

La cantidad de alcaloides de vinca administrada se escoge para que sea superior a la dosis terapéutica mínima pero inferior a la dosis tóxica. La elección de la cantidad por dosis depende de varios factores tales como la historia médica del paciente, el uso de otras terapias y la naturaleza de la enfermedad. En ciertas realizaciones, se da inicialmente una dosis baja que se puede incrementar sobre la base de la respuesta y/o tolerancia del paciente a la dosis inicial. Por ejemplo, se pueden administrar concentraciones de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,4 mg/m<sup>2</sup> (esto es, mg de alcaloide de vinca, vincristina, por m<sup>2</sup> de la superficie corporal) o más altas. En realizaciones preferentes, se administra a los pacientes una dosis de 2,0 mg/m<sup>2</sup>, que corresponde a una dosis de lípido de aproximadamente 40 mg/m<sup>2</sup> o aproximadamente 1,1 mg/kg de lípido y 0,05 mg/kg de vincristina para un paciente medio de 70 kg, o aproximadamente de 3 a aproximadamente 6 mg de vincristina por dosis.

Los pacientes típicamente recibirán al menos 2 ciclos de este tratamiento y potencialmente más dependiendo de la respuesta del paciente al tratamiento. En regímenes de un solo agente, el total de ciclos es determinado por el paciente y el médico sobre la base de respuestas y toxicidad observadas. Hasta 12 ciclos de tratamiento, una vez cada 14 días, han demostrado respuestas satisfactorias del paciente. En ciertos casos se puede justificar un número mayor. Análogamente, el número de ciclos de tratamiento usando lipo-CHOP será determinado por el paciente y el médico.

A causa de que las dosificaciones de vincristina están limitadas por la neurotoxicidad en seres humanos, a veces es útil coadministrar la vincristina liposomal con un tratamiento para la neurotoxicidad. El tratamiento puede ser profiláctico o terapéutico. Un ejemplo es la administración de la gabepentina Neurotin<sup>MC</sup> (Parke-Davis), o neurotonina, para el tratamiento del dolor neuropático, por ejemplo, se administran 100-200 mg de Nerontin<sup>MC</sup> 3 veces al día a un paciente adulto. Si mejora el dolor neuropático, se pueden continuar los tratamientos con vincristina liposomal. A causa de que este tipo de tratamiento profiláctico o terapéutico pretende sólo tratar efectos secundarios de la vincristina liposomal, es considerado separadamente de las terapias de combinación que se consideran seguidamente.

Esta invención está basada en parte en el sorprendente descubrimiento de que, a diferencia de los alcaloides de vinca en forma libre, los alcaloides de vinca encapsulados en liposoma se pueden administrar sin un tope de la dosificación total. Por ejemplo, mientras que la forma libre de vincristina se administra típicamente con un tope de 2,0 mg, la vincristina encapsulada en liposoma se puede administrar a una dosificación constante de, preferiblemente, 2,0 mg/m<sup>2</sup>. Así, para un paciente típico de una superficie de 1,5 a 3,0 m<sup>2</sup>, se puede administrar una dosis de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 6,0 mg de vincristina.

### IX. Terapias de combinación

En numerosas realizaciones, los alcaloides de vinca encapsulados se administrarán en combinación con uno o varios compuestos o terapias adicionales. Por ejemplo, se pueden coadministrar múltiples alcaloides de vinca, o se pueden administrar uno o varios alcaloides de vinca más junto con otro compuesto terapéutico tal como ciclofosfamida, dextrorubicina, prednisona, otros alcaloides tales como taxanos, camptotecinas, y/o podofilinas, otros agentes quimioterapéuticos tales como fármacos antisentido o vacunas antitumorales. En una realización preferente, se coadministra vincristina encapsulada en liposoma con ciclofosfamida, dextrorubicina y prednisona. En ciertas realizaciones se cargan múltiples compuestos en los mismos liposomas. En otras realizaciones se forman individualmente alcaloides de vinca encapsulados en liposoma y posteriormente se combinan con otros compuestos para una sola coadministración. Alternativamente, ciertas terapias se administran secuencialmente en un orden predeterminado, tal como en CHOP o lipo-CHOP. La vincristina encapsulada en liposoma se puede formular también en una combinación de CVP o ciclofosfamida-vincristina-prednisona.

Los alcaloides de vinca encapsulados en liposoma también se pueden combinar con agentes antitumorales tales como anticuerpos monoclonales, incluidos, no limitativamente, Oncolym<sup>MC</sup> (Techniclone Corp. Tustin, CA) o Rituxan<sup>MC</sup> (IDEC Pharmaceuticals), Bexxar<sup>MC</sup> (Coulter Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) o IDEC-Y2B8 (IDEC Pharmaceuticals Corporation). Además, los alcaloides de vinca encapsulados en liposoma se pueden administrar junto con uno o varios tratamientos no moleculares tales como radioterapia, trasplantes de médula ósea, terapia con hormonas, cirugía, etc.

En una realización preferente, los alcaloides encapsulados en liposoma se administran en combinación con un compuesto o terapia anticancerosa que proporciona una mejora aumentada o sinérgica en la reducción de un tumor basada en el mecanismo de acción y perfiles de toxicidad que no se solapan. En particular, los alcaloides de vinca

## ES 2 333 400 T3

liposomales se pueden suministrar con un taxano que opcionalmente puede ser también un taxano liposomal. Si bien se cree que los alcaloides de vinca despolarizan microtúbulos y que los taxanos estabilizan microtúbulos, se ha encontrado que los dos compuestos actúan sinérgicamente empeorando el crecimiento de un tumor, presumiblemente porque ambos están implicados en la inhibición de la dinámica de los microtúbulos. Véase Dumontet, C. y Sikic, B.I. (1999) J. Clin. Onc. 17(3) 1061-1070. Las formulaciones liposomales de los alcaloides de vinca de acuerdo con la presente invención disminuirán por ello significativamente la toxicidad neurológica y mieloide asociadas con la administración secuencial de los alcaloides de vinca en forma libre y taxanos.

Junto con los procedimientos de la presente invención se pueden usar otras terapias de combinación conocidas por los expertos en la especialidad.

### Ejemplos

Los ejemplos siguientes se ofrecen para ilustrar, no para limitar, la invención reivindicada.

#### Ejemplo 1

##### *Preparación de vincristina encapsulada en liposoma*

Se preparó vincristina encapsulada en liposoma (inyección de sulfato de vincristina en liposoma) usando un kit de 6 viales. Los viales 1 y 2 contenían una solución de sulfato de vincristina (1 mg/ml de Vincasar PFS®, SP Pharmaceuticals LLC, Albuquerque, NM) en solución tampón que comprendía manitol y acetato sódico, pH 4,5-4,7; el vial 3 contenía liposomas vacíos (100 mg/ml., liposomas de esfingomielina/colesterol en una relación de entre aproximadamente 60/40 y 50/50, o más preferiblemente de 55/45% mol/% mol) en tampón que comprendía citrato 300 mM a pH 4,0; los viales 4 y 5 contenían un tampón de fosfato alcalino (14,2 mg/ml de fosfato sódico dibásico hepta-hidratado) y el vial 6 estaba vacío, vial estéril. Los anteriores liposomas vacíos se prepararon usando películas delgadas y técnicas de extrusión estándar como se describe en la patente U.S. n.º. 5.741.516.

Se extrajeron 4 ml de sulfato de vincristina de los viales 1 y 2 y se añadieron al vial estéril 6. Seguidamente se extrajeron 0,8 ml de liposomas de esfingomielina/colesterol del vial 3 y se añadieron al vial 6. Se invirtió el vial 6 cinco veces para mezclar los materiales. Se añadieron al vial 6 20 ml de la solución de fosfato sódico de los viales 4 y 5. Se invirtió nuevamente cinco veces el vial 6, sin sacudir, para mezclar los materiales. Luego se calentó el vial 6 en baño de agua a 60-65°C durante 5 minutos y, al cabo de este tiempo, se invirtió nuevamente el vial 6 cinco veces. El vial se volvió luego a calentar durante 5 minutos y se invirtió cinco veces más.

El producto final contenía 0,16 mg/ml de sulfato de vincristina y 3,2 mg/ml de total de lípidos.

#### Ejemplo 2

##### *Vincristina encapsulada en liposoma en procedimientos de NHL reaparecido*

Se incluyeron en este estudio 50 pacientes con linfoma ahodgkinianos (NHL) y 1 con linfoma bioblástico de adulto (ALL). Cada paciente tenía como mínimo 16 años de edad, no tenía VIH ni cualquier otra infección seria, tampoco enfermedad alguna del sistema nervioso central, y tenía una función renal normal; los neutrófilos eran como mínimo 0,5K y las plaquetas como mínimo 50K. Cada paciente recibió hasta 12 dosis de 2,0 mg/ml de vincristina liposomal intravenosa una vez cada 14 días. Los liposomas usados comprendían esfingomielina y colesterol.

#### Resultados

Se evaluaron 35 de los 51 pacientes. La edad media de estos pacientes era de 62 años (intervalo 16-86 años) y 21 de los pacientes eran hombres. 12 de los pacientes tenían NHL folicular, 7 lo tenían transformado, 11 de célula grande difusa, 3 de célula de manto, 1 linfocito NK, y uno ALL. El grado clínico era alto en 16 de los 35 pacientes y la B2 microglobulina era mayor que 3,0 mg/ml en 19 de los 35 pacientes. El número de regímenes terapéuticos previos era 3 (intervalo 3-10). 18 de los 35 pacientes eran refractarios al régimen inmediatamente anterior al de vincristina encapsulada en liposoma. Los 35 habían recibido anteriormente administración de vincristina. Para los 35 pacientes con NHL, 14 pacientes exhibieron una respuesta completa o parcial, con un índice global de respuesta de 40% (intervalo de confianza de 95%: 24%-58%). En la Tabla 1 se muestran las respuestas de acuerdo con el grado clínico.

## ES 2 333 400 T3

TABLA 1

	Poco activo	Transformado	Agresivo	Transformado o agresivo
n° de pacientes	10	7	17	24
n°. de quienes responden (respuesta completa o parcial)	1	5	8	13
% de respuesta completa o parcial	10	71	47	54
Intervalo de confianza de 95%	1-45	29-96	23-72	33-74.

### Conclusiones

La duración media de la respuesta era de 4 meses. El hecho de que la mitad de los pacientes que responden mantienen la respuesta al menos 4 meses después del tratamiento es una respuesta sorprendente, inesperada y clínicamente admirable para un grupo heterogéneo de pacientes a los que previamente se les habría dado un pronóstico muy malo.

Los resultados anteriores demuestran que se pueden administrar dosis completas de vincristina liposómico en NHP reaparecido, con buena actividad, incluso en poblaciones fuertemente pretratadas.

Además, la vincristina liposómica demostró toxicidad significativamente menos inespecífica que la vincristina libre. La neurotoxicidad periférica es el efecto tóxico más frecuente y limitativo de la dosis de la vincristina libre. Usualmente, los efectos neuropáticos comienzan en adultos que reciben una dosis total de 5 a 6 mg (2-3 dosis de vincristina libre) y generalmente son significativos después de una dosis acumulativa de 15-20 mg (8-10 dosis de vincristina libre). Significativamente, en el presente estudio, un paciente típico recibió 3-5 mg en una dosis sola y se suministraron dosis acumulativas de hasta 37 mg, no dando ningún paciente neurotoxicidad periférica significativa inducida por vincristina liposomal. Incluso dosis totales más altas son probablemente tolerables. Estas dosis más altas son muy deseables para el tratamiento de NHL y representan un avance significativo y sorprendente en el tratamiento de esta enfermedad.

### *Ejemplo en desacuerdo con la invención. Uso de alcaloides de vinca liposomales como tratamiento de primera línea de linfomas*

Este ejemplo ilustra el uso de los alcaloides de vinca liposómicos como tratamiento de primera línea en combinación con otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de pacientes que presentan linfomas, en particular linfoma ahodgkinianos (de grado bajo o de grado intermedio). Los pacientes que presentan NHL transformado o agresivo pueden recibir este tratamiento mejorado de combinación en un tratamiento de primera línea, o el médico puede preferir un tratamiento de único agente, Onco TCS<sup>MC</sup>, como se describe en los ejemplos anteriores. El régimen de terapia de combinación que se presenta seguidamente se aprovecha del sorprendente resultado de que se pueden administrar dosis mucho más altas de vincristina cuando se suministran en los liposomas de la presente invención, con una toxicidad notablemente reducida.

El régimen de combinación preferido es un régimen de CHOP mejorado ("lipo-CHOP") que comprende: Ciclofosfamida, Hidroxi-aunorubicina (desoxirrubicina), Onco TCS<sup>MC</sup> y Prednisona. Un ciclo de tratamiento dura aproximadamente 5 días y los ciclos se repiten aproximadamente cada 21-28 días. En ciclo ejemplar está constituido por:

Ciclofosfamida (750 mg/m<sup>2</sup> IV, 1d)

Hidroxi-aunorubicina (50 mg/m<sup>2</sup> IV, 1dl)

OncoTCS<sup>MC</sup> (2,0 mg/m<sup>2</sup> IV, 1d (no necesario tope)

Prednisona (100 mg PO día x 5 días)

## ES 2 333 400 T3

Los tratamientos se realizan con las mismas intervenciones de enfermería requeridas para el tratamiento estándar con CHOP.

Es de esperar que los pacientes que reciben el tratamiento mejorado con CHOP tengan una mejora significativa de tratamiento estándar con CHOP en los grados de remisión completa, períodos de remisión/tiempo hasta reaparición después de tratamiento y tiempos medios de supervivencia.

*Ejemplo en desacuerdo con la invención. Tratamiento de linfomas con un agente único vincristina liposómico*

En otro estudio se trataron con un agente único, vincristina liposómica, como se describe en el Ejemplo 2, 50 pacientes que presentaban diferentes clases de linfoma. Los resultados se presentan en el cuadro siguiente:

	Primera recidiva desde RC	Refractaria primaria	Post- TAMO	>2 recidivas	Población del estudio multicentros
Número de pacientes evaluables	11	11	10	26	36
nº de RC	4	0	0	0	0
nº de RP	4	0	2	10	12
Índice de respuesta global (%)	73	0	20	38	33
Intervalos de confianza al 95% (%)	39 a 95	0 a 28	1 a 32	20 a 59	

neurotoxicidad de grado 3 a 4, 18%, no hay muertes tóxicas.

RC = respuesta completa

RP = respuesta parcial

Refractaria primaria significa que no se observó respuesta al tratamiento inicial

TAMO = trasplante autólogo de médula ósea.

De nuevo, estos resultados demuestran que un tratamiento con un único agente vincristina liposomal es un tratamiento excelente para linfomas. Estos resultados sugieren fuertemente un papel de la vincristina liposomal en lipo-CHOP y para el tratamiento de primera línea con agente único de linfomas.

Ejemplo 5

*Estudios adicionales*

5 La Figura 1 muestra resultados de un ensayo clínico realizado usando los procedimientos descritos en esta memoria, que demuestran que los presentes procedimientos son particularmente eficaces en el tratamiento de las formas poco activa, transformada, reaparecida y agresiva tras trasplante de médula ósea (TMO) de linfoma ahodgkinianos.

Ejemplo 6

10

*Respuesta a vincristina liposómica por número de regímenes anteriores*

15 La Figura 2 muestra resultados que revelan el número de pacientes evaluables con NHL agresivo recidivante, el número de tales pacientes que presentaban una respuesta o remisión completa (RC), una respuesta o remisión parcial (RP), el porcentaje que presentaba una RC o una RP y el intervalo de confianza del 95% para cada valor porcentual. Estos datos corresponden a pacientes que han recibido un tratamiento previo, dos o más tratamientos previos y, de la última categoría, aquellos que respondieron al tratamiento inmediatamente anterior al estudio y aquellos que no respondieron al tratamiento anterior.

20 Este estudio demuestra que los presentes procedimientos son inusualmente eficaces para tratar cada categoría de pacientes.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 333 400 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de vincristina encapsulada en liposoma para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un cáncer recidivante en un ser humano, siendo el mencionado cáncer recidivante un linfoma o leucemia, y siendo la composición farmacéutica para un ser humano que previamente ha sido sometido a al menos un tratamiento quimioterapéutico.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, siendo el mencionado cáncer recidivante un linfoma ahodgkinianos.
- 10 3. El uso de la reivindicación 2, siendo el linfoma ahodgkiniano un miembro seleccionado del grupo constituido por linfoma ahodgkinians de grado bajo, linfoma ahodgkiniano de grado intermedio, linfoma folicular, linfoma de células grandes, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma de linfocitos NK y linfoma linfoblástico agudo.
- 15 4. El uso de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el mencionado liposoma diestearoilfosfatidilcolina.
- 5 5. El uso de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el mencionado liposoma esfingomiolina.
- 20 6. El uso de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el mencionado liposoma además colesterol.
7. El uso de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo el mencionado liposoma un gradiente de pH.
- 25 8. El uso de la reivindicación 7, siendo el gradiente de pH. tal que el pH es más bajo en el interior del mencionado liposoma que en el exterior del mencionado liposoma.
9. El uso de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el mencionado, como mínimo único, tratamiento quimioterapéutico la administración de un alcaloide de vinca en forma libre.
- 30 10. El uso de las reivindicaciones 1 a 9, siendo el mencionado alcaloide de vinca en forma libre un miembro seleccionado del grupo constituido por vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina.
11. El uso de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo el mencionado, al menos único, tratamiento terapéutico la administración de un régimen de combinación que contiene antraciclina.
- 35 12. El uso de la reivindicación 11, siendo la mencionada antraciclina doxorubicina.
13. El uso de las reivindicaciones 1 a 12, habiendo presentado el mencionado ser humano una respuesta parcial o una respuesta completa al mencionado tratamiento quimioterapéutico antes de la recidiva del mencionado cáncer.
- 40 14. El uso de las reivindicaciones 1 a 13, siendo la mencionada recidiva una segunda recidiva.
15. El uso de las reivindicaciones 1 a 14, siendo la mencionada composición farmacéutica que comprende vincristina encapsulada en liposoma para administración sistémica por administración intravenosa.
- 45 16. El uso de las reivindicaciones 1 a 15, siendo la mencionada composición farmacéutica que comprende vincristina encapsulada para coadministración con al menos un agente quimioterapéutico adicional.
- 50 17. El uso de las reivindicaciones 1 a 16, siendo la mencionada composición farmacéutica que comprende vincristina encapsulada para coadministración con al menos un agente antitumoral adicional.
18. El uso de la reivindicación 17, siendo el mencionado agente antitumoral adicional un anticuerpo monoclonal.
- 55 19. El uso de la reivindicación 17, siendo el mencionado agente antitumoral adicional un fármaco antisentido o una vacuna antitumoral.
20. El uso de las reivindicaciones 1 a 19, siendo la mencionada composición farmacéutica que comprende vincristina para administración a una dosificación de entre aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,4 mg/m<sup>2</sup> al mencionado ser humano.
- 60 21. El uso de las reivindicaciones 3 a 20, siendo la mencionada composición farmacéutica que comprende vincristina para administración al mencionado paciente una vez cada 7-21 días.
22. El uso de la reivindicación 21, siendo la mencionada composición farmacéutica que comprende vincristina para administración al mencionado paciente una vez cada 14 días.
- 65 23. El uso de las reivindicaciones 1 a 22, siendo el mencionado cáncer recidivante un linfoma.

## ES 2 333 400 T3

24. El uso de las reivindicaciones 1 a 22, siendo el mencionado cáncer recidivante una leucemia.

25. El uso de las reivindicaciones 1 a 19 y de las reivindicaciones 21 a 24, siendo la mencionada composición farmacéutica que comprende vancristina para administración a una dosificación de aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 o 2,4 mg/m<sup>2</sup>.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	POCO ACTIVO	TRANSFORMADO	LINFOMA RECIDIVANTE	REFRACTARIO AGRESIVO	AGRESIVO POST-BMT
EVALUABLE	18	16	37	11	10
RC/RP	1	5	18	0	2
% de respuesta	6	31	49	0	20
Intervalo de confianza de 95%	0-28	11-59	32-66	0-28	1-32

FIG. 1.

	1 Rx	> 2 Rx	>2, respuesta a último Rx	>2, Falla a último Rx
EVALUABLE	11	26	8	18
RC	4	--	--	--
RP	4	10	3	7
% de respuesta	73	38	38	39
Intervalo de confianza de 95%	39-95	20-59	9-76	17-64

FIG. 2.