

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 938**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/475** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2016 PCT/US2016/043622**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2017 WO17015584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2016 E 16828625 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3324969**

54 Título: **Una formulación lista para su uso para la inyección de liposoma de sulfato de vincristina**

30 Prioridad:

**22.07.2015 US 201562195711 P**

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

**02.03.2021**

73 Titular/es:

**SPECTRUM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
11500 South Eastern Avenue, Suite 240  
Henderson, NV 89052, US**

72 Inventor/es:

**MONTE, WILLIAM, T.;  
ABRA, ROBERT, MALCOLM;  
LUO, BING y  
ZHANG, YUANPENG**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 808 938 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

Una formulación lista para su uso para la inyección de liposoma de sulfato de vincristina

**Antecedentes**

5 Las formulaciones de liposomas de agentes quimioterapéuticos, como vincristina, puede proporcionar un beneficio clínico anticáncer significativo sobre sus formas no encapsuladas. Las formulaciones farmacéuticas de nanopartículas pueden permitir una retención prolongada del fármaco *in vivo*, semividas farmacocinéticas más largas y acumulación aumentada en los sitios tumorales, lo que puede traducirse en mejores resultados clínicos. Estas características pueden ser particularmente atractivas para medicamentos específicos del ciclo celular como la Vincristina, que interrumpe la unión de la tubulina durante la mitosis celular. La espectacular ventaja derivada de los liposomas se destaca en la capacidad de administrar potencialmente la inyección de liposoma de sulfato de vincristina (VSLI) sin un límite de dosis e incluso puede permitir la intensificación de la dosis. Mientras que la vincristina no encapsulada puede recetarse con un tope de dosis para evitar graves toxicidades limitantes de la dosis.

15 La efectividad de la formulación liposómica parece estar en la capacidad del liposoma para retener el agente terapéutico y mantener la estabilidad química del principio activo. Se cree que cuando se usan liposomas compuestos de esfingomielina-colesterol, como en VSLI, estos liposomas resistentes a la hidrólisis permiten tiempos de retención de fármacos terapéuticamente significativos (Webb *et al.*, "A cationic liposomal vincristine formulation with improved vincristine retention, extended circulation time and increased antitumour activity", Letters in Drug Design & Discovery, vol. 4, 2007, páginas 426-433). Sin embargo, la inestabilidad química de la vincristina puede limitar la estabilidad de la vida útil de VSLI. Los estudios de estabilidad para Marqibo® parecen mostrar que la degradación de VSLI se produjo dentro de las 24 horas de la constitución a temperatura ambiente. La etiqueta actual aprobada por la FDA exige la administración dentro de las 24 horas posteriores a la constitución. Como resultado de las limitaciones de estabilidad a largo plazo observadas con VSLI, se prepara en la farmacia justo antes de la administración.

25 Como resultado de la incapacidad de lograr una formulación lista para su uso nominalmente estable, ña inyección de liposomas de sulfato de vincristina (0,16 mg/ml) (VSLI) se constituye en la farmacia a partir de tres componentes del producto farmacológico suministrados como parte del kit Marqibo®. Los tres componentes del medicamento son la inyección de sulfato de vincristina, USP, (VSI), la inyección de liposoma de colesterol esfingomielina (SCLI) y la inyección de fosfato sódico (SPI). El kit de tres componentes se seleccionó como una forma de proporcionar una presentación con una vida útil adecuada de al menos 24 meses. La estabilidad del Kit puede regirse por el componente del Kit con la fecha de vencimiento más corta a 2-8 °C, p. ej., inyección de sulfato de vincristina.

30 Por lo tanto, puede ser deseable desarrollar una formulación lista para su uso para evitar la necesidad de compuestos multietapa en la farmacia; esto mejoraría la facilidad de administración de Marqibo y eliminaría la necesidad de adquirir equipos auxiliares, p. ej., baño de agua de constitución, y minimizar el potencial de errores en la preparación del medicamento. La estabilidad del producto está limitada por la degradación de la vincristina, principalmente la formación de N-desformilvincristina (NFV). Este parece ser el degradante individual más grande de VSLI y también de VSI, el componente del Kit Marqibo. El aumento de esta impureza con el tiempo hace que tanto el Kit Marqibo como el VSI tengan una fecha de caducidad de 24 meses.

40 La vincristina es un compuesto dimérico de indoldihidroindol aislado de las hojas de la planta *Vinca rosea*. El alcaloide está compuesto por un resto N-desmetil-N-formil-vindolina unido a una especie de velbanamina. Parece ser más estable en su forma de sal. Las sales se preparan fácilmente añadiendo una cantidad teórica de ácido a una solución de la base libre de alcaloides, sin embargo, como se señaló anteriormente, incluso las sales de vincristina tienen una estabilidad limitada; 24 meses a 4 °C. La N-desformilación del sulfato de vincristina es la vía de degradación prominente de la vincristina. La N-formamida se coloca en el nitrógeno N1 de un heterociclo de vindolina tenso y probablemente distiende la función carbonilo de la amida en una posición vulnerable al ataque nucleófilo o la hidrólisis. Otras vías de degradación menores incluyen transformaciones hidrolíticas de vincristina, tales como 4-desacetilación o pérdida del éster metílico a 18' seguido de descarboxilación.

50 Esta labilidad de la vincristina ha obstaculizado el desarrollo de formulaciones de vincristina sin encapsular estables que se remontan al innovador VSI USP, Eli Lilly. Lilly buscó desarrollar una formulación secada por congelación o liofilizada de inyección de sulfato de vincristina. La degradación de la vincristina parece haber llevado al abandono de estas presentaciones a favor de una solución lista para su uso que contenga sulfato de vincristina. La vincristina es sensible a estrés térmico, ácido y fotoestrés que conduce a la degradación de las especies de N-desformilvincristina, así como otras impurezas de sustancias relacionadas. La oxidación del aire puede contribuir y se ha demostrado que la esterilización por calor no es compatible con VSLI o VSI, debido a la formación de impurezas de degradación.

55 La complejidad estructural de la vincristina y la sensibilidad química a menudo impredecible del dímero ha sido una ruina para el uso de tipos comunes de excipientes típicamente para formulaciones farmacéuticas. Los científicos de Eli Lilly señalaron en su desarrollo de formulación de VSI que la presencia de iones cloruro debería minimizarse ya que podría tener "efectos nocivos sobre los dímeros de vinca oncolíticos". Los esfuerzos nocivos de los iones de cloruro en las formulaciones de medicamentos son raros. El cloruro sódico se usa ampliamente en formulaciones farmacéuticas para proporcionar las propiedades isotónicas deseadas. Un informe reivindica que la doxorubicina y la

vincristina se degradan rápidamente en cloruro de sodio acuoso al 0,45 % y mezclas de Ringer de 25 °C a 37 °C. El ion cloruro también se ha implicado en la inestabilidad del Timerosal, un antifúngico, en formulaciones oftálmicas que contienen cloruro sódico como un agente isotónico. Estas observaciones resaltan la sensibilidad química única y extrema de la vincristina.

5 La imposibilidad de encontrar una formulación lista para su uso para Marqibo® capaz de almacenamiento prolongado como resultado la búsqueda de una forma alternativa de administrar VSLI que conduzca al desarrollo del kit de tres viales. El proceso de constitución de tres viales para la administración de Marqibo® (con constitución en una farmacia) recibió la aprobación de comercialización de la FDA en agosto de 2012.

10 El desarrollo de una presentación lista para su uso sería una mejora significativa para la administración de Marqibo®. Los estudios se propusieron por Inex, innovador de Marqibo, para mejorar la estabilidad de la formulación de VSLI que usó liofilización, carga de ionóforo y/o plataformas de carga de liposomas de manganeso o sulfato de magnesio. Estas sugerencias se basaron en el uso de métodos de encapsulación de segunda generación que supuestamente eran más suaves o electroneutras hacia el liposoma en comparación con el método del gradiente de pH. Sin embargo, No se logró una formulación estable lista para su uso durante el desarrollo de Marqibo. Sigue existiendo la necesidad de  
15 una formulación de VSLI lista para su uso.

### Compendio

Solo las realizaciones que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas son parte de la invención.

20 Algunas realizaciones incluyen una composición de vincristina lista para su uso que comprende: una fase acuosa continua que comprende un primer tampón acuoso, una fase liposómica dispersa dentro del primer tampón acuoso y una solución acuosa estabilizadora encapsulada como carga dentro de la fase liposómica; en donde la solución acuosa estabilizadora comprende un segundo tampón acuoso y vincristina estabilizada disuelta en el mismo; en donde el segundo tampón acuoso comprende una sal que tiene al menos un soluto que puede transportarse fuera de la fase de liposoma y dejar un soluto cargado positivamente o ion hidronio en la solución acuosa estabilizadora, en donde el soluto cargado positivamente o el ion hidronio estabiliza la vincristina; y en donde la fase acuosa continua y la solución acuosa estabilizadora tienen una diferencia de pH de al menos 2 unidades de pH.  
25

30 Algunas realizaciones incluyen un método para estabilizar vincristina en un liposoma que comprende: dispersar una fase de liposoma dentro de una fase acuosa continua que comprende un primer tampón acuoso; en donde la fase de liposoma contiene una solución acuosa estabilizadora encapsulada dentro de la fase de liposoma; en donde la solución acuosa estabilizadora comprende un segundo tampón acuoso y vincristina estabilizada disuelta en el mismo; en donde el segundo tampón acuoso comprende una sal que tiene al menos un soluto que puede transportarse fuera de la fase de liposoma y dejar un soluto cargado positivamente o ion hidronio en la solución acuosa estabilizadora, en donde el soluto cargado positivamente o el ion hidronio estabiliza la vincristina; y en donde la fase acuosa continua y la solución acuosa estabilizadora tienen una diferencia de pH de al menos 2 unidades de pH.

35 Algunas realizaciones incluyen métodos para tratar el cáncer en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéutica de una composición que comprende, una fase acuosa continua que comprende un primer tampón acuoso, una fase liposómica dispersa dentro del primer tampón acuoso y una solución acuosa estabilizadora encapsulada como carga dentro de la fase liposómica; en donde la solución acuosa estabilizadora comprende un segundo tampón acuoso y vincristina estabilizada disuelta en el mismo; en donde el segundo tampón acuoso comprende una sal que tiene al menos un soluto que puede transportarse fuera de la fase de liposoma y dejar un soluto cargado positivamente o ion hidronio en la solución acuosa estabilizadora, en donde el soluto cargado positivamente o el ion hidronio estabiliza la vincristina; y en donde la fase acuosa continua y la solución acuosa estabilizadora tienen una diferencia de pH de al menos 2 unidades de pH.  
40

### Breve descripción de los dibujos

45 La FIGURA 1 es una representación de un mecanismo de encapsulación para la formulación de liposoma de sulfato de vincristina.

### Descripción detallada

50 En la presente memoria se describen composiciones y métodos relacionados con una formulación lista para su uso para inyección de liposoma de sulfato de vincristina con estabilidad mejorada. Algunas realizaciones se lograron reemplazando el tampón de ácido cítrico usado en la formulación actual de VSLI con un tampón de sulfato de amonio (AS) y creando un múltiplex de equilibrios de pH de la membrana liposómica que aumenta la concentración de las especies estables de sulfato de vincristina (véase la Figura 1). El sulfato de amonio junto con un tampón de pH externo complementario puede mitigar la degradación de la vincristina a N-desformilvincristina mientras se mantiene la integridad estructural y dinámica del liposoma de esfingomielin-colesterol. Esto puede permitir una carga y retención eficientes de vincristina a través de un método transmembrana. Algunas realizaciones se refieren a métodos para tratar diversos tipos de linfomas, tales como métodos para tratar formas recurrentes de linfoma no Hodgkiniano.  
55 Típicamente, una composición lista para su uso para estabilizar un fármaco de acuerdo con esta descripción, puede incluir una fase acuosa continua, una fase liposómica dispersa en la fase acuosa continua y una solución acuosa

estabilizadora encapsulada como carga dentro de la fase liposómica.

Una fase acuosa continua puede comprender un primer tampón acuoso. El primer tampón puede estabilizar la vincristina y puede ayudar a facilitar la encapsulación de la vincristina. Por ejemplo, una fase acuosa continua de pH neutro o alto, tal como el tampón fosfato externo representado en la FIGURA 1, puede permitir que la vincristina cruce la membrana del liposoma principalmente en forma de base libre. Por el contrario, la solución acuosa estabilizadora encapsulada en el liposoma tiene un pH suficientemente bajo para dirigir el equilibrio ácido-base de la vincristina de modo que la cantidad de vincristina neutra dentro del liposoma sea insignificante. Por ejemplo, esto se ilustra por el equilibrio entre la base libre de vincristina, sulfato de vincristina, amoníaco y sulfato de amonio representado en la solución interna de liposomas de la FIGURA 1. Esto puede proporcionar un gradiente de concentración de base libre de vincristina entre la fase acuosa continua, que puede tener una mayor concentración de base libre de vincristina y la solución acuosa estabilizadora encapsulada dentro del liposoma, que puede tener una concentración de base libre de vincristina insignificante. Este gradiente de concentración puede dirigir la migración de vincristina libre desde la fase acuosa continua que tiene una alta concentración de base libre de vincristina a la solución acuosa estabilizadora dentro de los liposomas, que tiene una concentración insignificante de vincristina neutra. También se cree que la carga de vincristina se debe a que la forma de sal de la vincristina no pasa típicamente a través de la barrera liposómica a la fase acuosa continua, pero la vincristina neutra puede pasar a través de la barrera liposómica a la solución acuosa estabilizadora dentro del liposoma.

En algunas realizaciones, la primera solución tampón acuosa incluye cualquier tampón que pueda tamponar la fase acuosa continua a un pH que proporcione vincristina principalmente neutra, tales como, pero no limitado a, una sal, un ácido o base combinado con un conjugado de un ácido o una base tales como, una base conjugada monoaniónica, una base conjugada dianiónica, una base conjugada trianiónica, una base conjugada, un ácido conjugado, o cualquier mezcla o combinación de los mismos. En algunas realizaciones, cualquier combinación de lo anterior puede existir en una mezcla valorada. En algunas realizaciones, el tampón es un tampón sulfato. En algunas realizaciones, el tampón es un tampón fosfato (p. ej., un tampón fosfato sódico), un tampón bicarbonato, un tampón borato, etc. En algunas realizaciones, la primera solución tampón acuosa puede ser el disolvente vehículo primario o el vehículo fluido de la fase liposómica.

El primer tampón acuoso puede estar presente a cualquier concentración adecuada. Por ejemplo, el primer tampón acuoso puede estar presente a una concentración que hace que el tampón sea aproximadamente isotónico, tales como una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 400 mM o aproximadamente 250 mM a aproximadamente 350 mM.

Un liposoma incluye al menos el significado más amplio entendido por un experto en la técnica y también incluye vesículas o nanopartículas compuestas por una bicapa de fase lamelar, tales como una bicapa lipídica. En algunas realizaciones, un liposoma o capa liposómica está formado por cualquier sustancia que sea sustancialmente insoluble en la primera solución tampón acuosa, incluyendo cualquier material conocido en la técnica para formar nanopartículas liposómicas. En algunas realizaciones, los liposomas comprenden cualquier material que pueda formar una vesícula compuesta por una bicapa lipídica en fase lamelar. Los liposomas pueden comprender lípidos tales como fosfolípidos (p. ej., fosfatidilcolinas), esfingolípidos (p. ej., esfingomiélin), glucolípidos, fosfoglicéridos, polietilenglicol, colesterol, etc. En algunas realizaciones, los liposomas comprenden lípidos y/o fosfolípidos de fosfatidilcolina pegilados y/o no pegilados. En algunas realizaciones, un componente lipídico de algunos liposomas comprende cualquier cola de ácido graso que pueda dar propiedades útiles a la bicapa lipídica del liposoma, p. ej., elasticidad mejorada, carga de fármacos mejorada, etc.

En algunas realizaciones, la nanopartícula o liposoma se usa para crear una barrera de disolvente o para crear un gradiente químico u osmótico. El liposoma o la nanopartícula pueden usarse para separar dos soluciones acuosas de pH sustancialmente diferente. La nanopartícula también puede usarse para separar dos soluciones acuosas de sustancialmente el mismo pH. En algunas realizaciones, la nanopartícula se usa para separar dos soluciones que comprenden tampones sustancialmente diferentes. El liposoma o la nanopartícula también pueden usarse para separar dos soluciones que comprenden tampones sustancialmente similares. En algunas realizaciones, el liposoma se usa para separar dos soluciones acuosas de pH sustancialmente diferente y que comprenden soluciones tampón sustancialmente diferentes. En algunas realizaciones, el gradiente formado por la separación de las dos soluciones acuosas puede aumentar la eficiencia de carga del liposoma o nanopartícula. En algunas realizaciones, la capa formada por el liposoma se describe como una fase de liposoma, fase liposómica o fase interna de nanopartículas.

Debe entenderse que la carga encapsulada incluye al menos el significado más amplio entendido por una persona experta en la técnica e incluye una fase acuosa que está separada de la fase acuosa circundante por una bicapa lipídica liposómica.

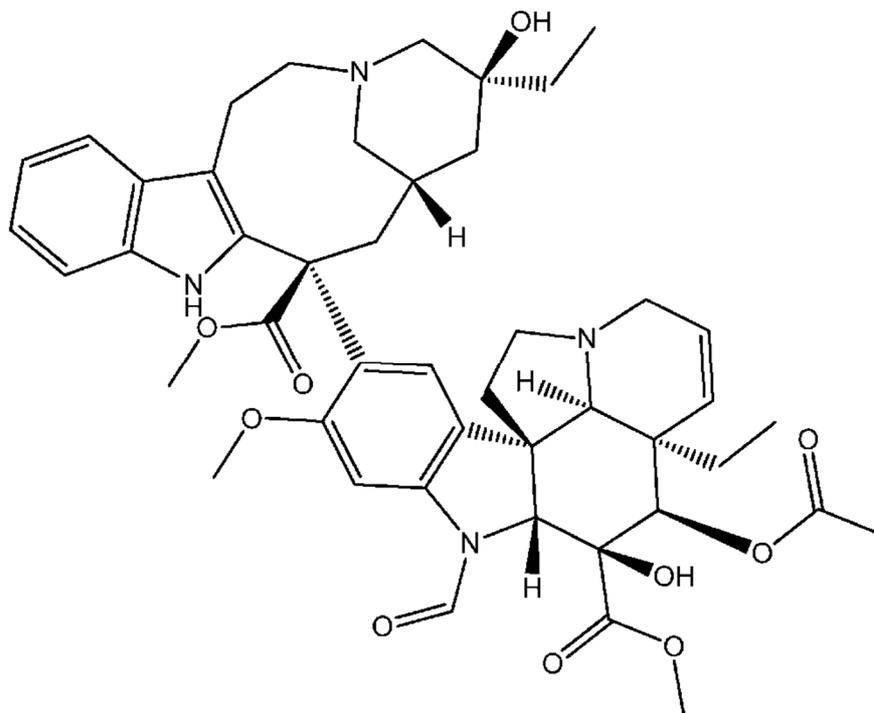
En algunas realizaciones, el liposoma encapsula una solución acuosa estabilizadora que puede comprender un segundo tampón acuoso y vincristina estabilizada disuelta en el mismo.

En algunas realizaciones, el segundo tampón acuoso comprende cualquier tampón que pueda tamponar el pH de la solución acuosa estabilizante que comprende una sal de amonio, p. ej., un tampón sulfato de amonio, un tampón citrato de amonio, un tampón fosfato de amonio, un tampón bicarbonato de amonio, un tampón carbonato de amonio,

un tampón borato de amonio, etc. Se cree que un tampón de amonio puede ayudar a estabilizar la vincristina al mantener la solución acuosa estabilizadora a un pH más bajo en el tiempo en comparación con otros tampones que inicialmente proporcionan un pH similar. Se cree que los tampones sin amonio pueden perder su capacidad de amortiguación con el tiempo. Una vez que se encapsula un medicamento en el liposoma, puede volverse altamente concentrado en el liposoma, creando equilibrios complejos de migración de iones, que si no está equilibrado puede contribuir a la degradación de la vincristina. Inesperadamente, los tampones de amonio pueden mantener un pH más estable que otros tampones con un pH inicialmente similar. Esto puede ser porque, para sistemas como el representado en la FIGURA 1, el amoniaco libre puede escapar a través de la barrera liposómica dejando un protón que estabiliza el pH interno del liposoma.

- 10 En algunas realizaciones, El agente terapéuticamente estabilizado es cualquier medicamento que pueda estabilizarse en la solución acuosa estabilizadora. En algunas realizaciones, el agente terapéuticamente estabilizado es un fármaco anticáncer tales como pero no limitado a la vincristina.

La vincristina puede estar representada por la siguiente fórmula estructural química:



- 15 La vincristina también puede estar representada por el nombre químico: (3aR,3a<sup>1</sup>R,4R,5S,5aR,10bR)-metil-4-acetoxi-3a-etil-9-((5S,7S,9S)-5-etil-5-hidroxi-9-(metoxicarbonil)-2,4,5,6,7,8,9,10-octahidro-1H-3,7-metano[1]azacicoundecino[5,4-b]indol-9-il)-6-formil-5-hidroxi-8-metoxi-3a,3a<sup>1</sup>,4,5,5a,6,11,12-octahidro-1H-indolizino[8,1-cd]carbazol-5-carboxilato.

- 20 En algunas realizaciones, la segunda solución tampón acuosa ayuda a estabilizar la vincristina disuelta dentro de la solución acuosa estabilizadora. En algunas realizaciones, un agente terapéuticamente activo es sustancialmente más estable en la solución acuosa estabilizadora que en el primer tampón acuoso. En algunas realizaciones, la vincristina es sustancialmente más estable en la solución acuosa estabilizadora que en el primer tampón acuoso.

- 25 La solución acuosa estabilizadora comprende un segundo tampón acuoso. El segundo tampón acuoso debe comprender una sal que tenga al menos un soluto que pueda transportarse fuera de la fase liposómica. Cuando el soluto se transporta fuera de la fase liposómica, deja un soluto cargado positivamente o ion hidronio en la solución acuosa estabilizadora. Por tanto, el soluto cargado positivamente o el ion hidronio pueden estabilizar la vincristina. Hay varias sales que pueden transportarse fuera de la fase liposoma y dejar un soluto o ion hidronio con carga positiva. Por ejemplo, las bases de carga neutra pueden transportarse fuera de las fases liposomas. Por tanto, para una sal de base neutra, tales como amoniaco, aminas, aminoácidos, fosfinas, etc., la base neutra, p. ej., amoniaco o una amina, puede transportarse fuera de la fase liposoma y el catión o el ion hidronio de la sal pueden permanecer en la solución acuosa estabilizadora. Los ejemplos de sales estabilizadoras adecuadas pueden incluir, pero no se limitan a., sales de amoniaco o sales de aminas, tales como metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, dietilamina, trietilamina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, etc.

- 35 En algunas realizaciones, el agente terapéuticamente activo se estabiliza sustancialmente mediante una sal de amonio en el segundo tampón acuoso. En algunas realizaciones, un tampón de sulfato de amonio reduce sustancialmente la

velocidad de degradación de vincristina a desformilvincristina. En algunas realizaciones, el sulfato de amonio protege sustancialmente la vincristina contra la desformilación. En algunas realizaciones, la presencia de iones amonio puede proteger sustancialmente la vincristina contra la desformilación. En algunas realizaciones, el principal contribuyente del ion amonio a la solución es el sulfato de amonio. En algunas realizaciones, cualquier tampón de sal de amonio puede contribuir a proteger la vincristina contra la desformilación.

El segundo tampón acuoso puede estar presente en la solución acuosa estabilizadora a un pH que puede ayudar a estabilizar la vincristina. En algunas realizaciones, el segundo tampón acuoso, tal como una sal de amonio, p. ej., sulfato de amonio, puede estar presente. La composición de la reivindicación 1, en donde la sal de amonio está presente en el segundo tampón acuoso a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, aproximadamente 200 mM a aproximadamente 400 mM, aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 250 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 300 mM a aproximadamente 350 mM o aproximadamente 250 mM a aproximadamente 350 mM.

En algunas realizaciones, la fase acuosa continua o el primer tampón acuoso tiene un pH de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 8,8 o aproximadamente pH 9, de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 6, de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 7, de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 8, de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 8,5, de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 8,8 o aproximadamente pH 9, de aproximadamente pH 7,2 a aproximadamente pH 7,8, de aproximadamente pH 7,4 a aproximadamente pH 7,8, de aproximadamente pH 7,8 a aproximadamente pH 8, de aproximadamente pH 8 a aproximadamente pH 8,2, de aproximadamente pH 8,2 a aproximadamente pH 8,8, de aproximadamente pH 8,4 a aproximadamente pH 8,8, aproximadamente pH 7,8, aproximadamente pH 7,4, aproximadamente pH 8 o cualquier pH limitado por o entre cualquiera de estos valores.

En algunas realizaciones, la solución acuosa estabilizadora o el segundo tampón acuoso tiene un pH de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 5,5, de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 4, de aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente pH 4,5, de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 5, aproximadamente pH 4 o cualquier pH limitado por o entre cualquiera de estos valores.

En algunas realizaciones, la diferencia de pH o  $\Delta$ pH entre la fase acuosa continua y la solución acuosa estabilizadora o el primer tampón acuoso y el segundo tampón acuoso es de aproximadamente 1 unidad de pH a aproximadamente 4 unidades de pH, de aproximadamente 2 unidades de pH a aproximadamente 3 unidades de pH, de aproximadamente 1,5 unidades de pH a aproximadamente 2,5 unidades de pH, de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5 unidades de pH, de aproximadamente 3 unidades de pH a aproximadamente 4 unidades de pH, de aproximadamente 3,8 unidades de pH, o cualquier diferencia limitada por o entre cualquiera de estos valores.

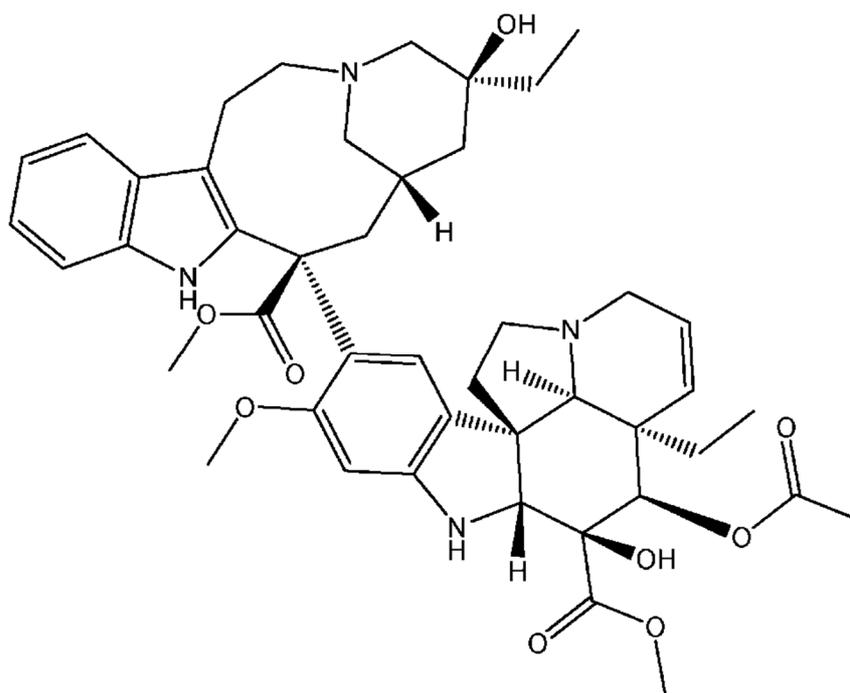
En algunas realizaciones, la  $\Delta$ pH puede ayudar a aumentar la eficiencia de encapsulación de liposomas. En algunas realizaciones, una  $\Delta$ pH útil para lograr una carga útil de liposomas es de aproximadamente 1 unidad de pH a aproximadamente 4 unidades de pH, de aproximadamente 2 unidades de pH a aproximadamente 3 unidades de pH, de aproximadamente 1,5 unidades de pH a aproximadamente 2,5 unidades de pH, de aproximadamente 2,5 unidades de pH a aproximadamente 3,5 unidades de pH, de aproximadamente 3 unidades de pH a aproximadamente 4 unidades de pH, de aproximadamente 3,8 unidades de pH, o cualquier diferencia limitada por o entre cualquiera de estos valores.

En algunas realizaciones, La carga del liposoma con principio activo puede describirse como carga potencial transmembrana. En algunas realizaciones, el potencial es creado por el gradiente de protones como se describió anteriormente, lo que conduce a la acumulación del agente terapéutico dentro del liposoma.

En algunas realizaciones, la combinación de la  $\Delta$ pH, los tampones empleados y el liposoma da como resultado un equilibrio tanto de las características necesarias para una buena carga del agente terapéuticamente activo como de las características que minimizan la degradación del agente terapéuticamente activo.

En algunas realizaciones, la composición descrita incluye un tampón de sulfato de amonio que puede crear un múltiplo de equilibrios de pH de la membrana de liposoma que da como resultado una mayor concentración de las especies estables de sulfato de vincristina (véase la FIGURA 1). El uso de la formulación de liposomas descrita de los equilibrios de sulfato de amonio junto con el control de migración de iones por un tampón de pH externo complementario mitiga sorprendentemente la degradación de vincristina a N-desformilvincristina (NFV), sin embargo, mantiene la integridad estructural y dinámica del liposoma para permitir una carga y retención eficientes de vincristina mediante un método transmembrana.

La N-desformilvincristina puede representarse mediante la fórmula estructural:



La N-desformilvincristina también puede estar representada por el nombre químico, (3aR,3a<sup>1</sup>R,4R,5S,5aR,10bS)-metil 4-acetoxi-3a-etil-9-((5S,7S,9S)-5-etil-5-hidroxi-9-(metoxicarbonil)-2,4,5,6,7,8,9,10-octahidro-1H-3,7-metano[1]azacicoundecino[5,4-b]indol-9-il)-5-hidroxi-8-metoxi-3a,3a<sup>1</sup>,4,5,5a,6,11,12-octahidro-1H-indolizino[8,1-cd]carbazol-5-carboxilato.

La NFV a veces puede formarse incluso cuando existe un gradiente (es decir, pH 4 interior y pH 7,5 exterior) o si el pH externo e interior es el mismo (es decir, pH 4). Esto puede implicar que las especies de vincristina, que pueden ser susceptibles a la reacción de desformilación irreversible, pueden formarse dentro del liposoma. Una posible especie es la vincristina neutra, que puede ser susceptible a las vías de degradación de la vincristina. Una ventaja de las composiciones descritas actualmente es su capacidad para minimizar la formación de especies de vincristina susceptibles de degradación dentro del liposoma.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un mamífero para el tratamiento del cáncer o para el tratamiento del cáncer recurrente. En algunas realizaciones, el cáncer incluye linfoma o leucemia. En algunas realizaciones, el mamífero puede haber sido sometido previamente a una terapia de tratamiento contra el cáncer.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria pueden incluirse en métodos para el tratamiento de una neoplasia en un mamífero. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria pueden incluirse en métodos para el tratamiento de formas recurrentes de una neoplasia en un mamífero. En algunas realizaciones, la composición descrita en el presente documento puede incluirse en un método para el tratamiento de diversos tipos de linfomas. En algunas realizaciones, la composición descrita en el presente documento puede administrarse para el tratamiento del linfoma no Hodgkiniano. En algunas realizaciones, la composición descrita en el presente documento puede administrarse para el tratamiento de la recurrencia del linfoma no Hodgkiniano.

El término neoplasia, como se emplea en esta memoria, incluye al menos el significado más amplio entendido por una persona de habilidad ordinaria en la técnica y también incluye cualquier crecimiento aberrante de células, tumores, derrames malignos, quistes, etc. Una cita de neoplasia puede contener una diversidad de tipos celulares, incluyendo sin limitación, células neoplásicas, células endoteliales o células inmunológicas tales como leucocitos, mielocitos, linfocitos, etc.

En algunas realizaciones, la neoplasia a tratar es un cáncer.

En algunas realizaciones donde la composición es inyección de liposoma de sulfato de vincristina (VLSI), la composición puede administrarse a un mamífero para el tratamiento del cáncer o cáncer recurrente. La composición puede administrarse a una dosis de aproximadamente 1 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 4 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 1,5 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 3 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 2 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 3 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 2 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 2,5 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 2 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 1,5 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 2,25 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 2,5 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 3 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 2,0 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 2,1 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 2,2 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 2,3 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 2,4 mg/m<sup>2</sup> o aproximadamente 1,9 mg/m<sup>2</sup>. En algunas realizaciones, VLSI se administra en combinación con otros

compuestos terapéuticos. En algunas realizaciones, VLSI se administra en combinación con otros medicamentos antineoplásicos.

### Ejemplo 1: Formulación de Marqibo dializada, de menor contenido de Fármaco Libre.

5 La estabilidad de la inyección de liposoma de sulfato de vincristina (VSLI) se refleja en su degradación a N-desformilvincristina (NFV). La VSLI cuando se constituye a partir de la formulación del kit de 3 viales, puede requerir la administración dentro de las 24 horas debido a la posible degradación de la vincristina. La preparación de VSLI también siempre logra  $\leq 5\%$  de vincristina libre. La vincristina libre estaría en el ambiente de tampón externo de pH 7,4. Sin embargo, se cree que la vincristina es más estable en su forma de sal (pKa 5,0 y 7,4) y a pH 7,4 los equilibrios serían menos favorables para la forma de sal en comparación con el pH 4,0 del interior del liposoma. Puede ser útil examinar en qué medida la vincristina libre contribuyó a la formación de NFV y su influencia en la estabilidad general de VSLI.

15 VSLI se preparó a partir de componentes equivalentes del kit Marqibo, es decir, VSI, SPI y SCLI. La vincristina libre (sin encapsular) se retiró por diálisis usando diversos tampones en condiciones de pH variantes. Las variantes se colocaron en estabilidad durante hasta 12 semanas y se analizaron para determinar los criterios clave de estabilidad de VSLI. Las variaciones examinaron la diálisis usando los siguientes tampones externos:

- a) Solución de sacarosa tamponada con fosfato, pH 7,4
- b) solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4
- c) soluciones de sacarosa tamponadas con fosfato, pH 4,0
- d) soluciones de sacarosa tamponadas con fosfato, pH 5,0

### 20 Preparación de VSLI libre de vincristina externa con Tampón externo pH 4.0-7.4

Se realizaron tres encapsulaciones de VSLI separadas de los componentes del kit (31 ml cada una) y se agruparon. Se retiró una muestra posterior a la carga para análisis y el volumen de muestra restante se dividió en cuatro porciones (~21,75 ml cada una). Estas muestras se colocaron en un Spectrapor N.<sup>o</sup> 1, 40 mm de ancho, Bolsas de membrana de diálisis MWCO de 6-8 kDa y dializadas contra un exceso de 20 volúmenes usando solución salina tamponada con fosfato (PBS) o soluciones de sacarosa tamponada con fosfato, pH 7,4 para cuatro intercambios de volumen durante un período de 24 horas a temperatura ambiente protegido de la luz. El PBS preparado contenía fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 130 mM, pH 7,4. La sacarosa tamponada con fosfato contenía 10 % (p/v) de sacarosa, fosfato sódico 20 mM, pH 7,4. Después de la diálisis, las muestras del mismo tampón se agruparon, se esterilizaron por filtración en condiciones asépticas utilizando filtros de jeringa desechables (Pall Acrodiscs, 0,2  $\mu$ m de tamaño de poro, membranas Supor) y se dividieron en alícuotas en tubos estériles individuales (4,2 ml) para cada punto de tiempo del estudio de estabilidad (0, 2, 4, 8, 12 semanas a 2-8 °C; 2, 4, 8, 12 semanas a temperatura ambiente y 2 semanas a 40 °C).

### 30 Preparación de VSLI libre de vincristina externa con Tampones externos pH 4 y 5

#### Evaluaciones preliminares a pequeña escala

35 Se realizó un estudio de prueba inicial para determinar si realmente se produjo diálisis de Marqibo en condiciones de pH bajo. Se preparó un total de 8 ml de producto VSLI a partir de viales del kit Marqibo como se describió anteriormente y el material posterior a la carga se dividió en partes alícuotas de 2 ml para diálisis en Spectrapor N.<sup>o</sup> 1, 20 mm de ancho, bolsas de membrana de diálisis MWCO de 6-8 kDa contra un exceso de 20 volúmenes usando soluciones SPI a pH 4, 5 o 6 para intercambios de cuatro volúmenes durante un período de veinticuatro horas a 2-8 °C, protegido de la luz. Las muestras posteriores a la diálisis se analizaron para determinar el contenido de vincristina libre (Tabla 1) y muestran que es posible la diálisis con tampón externo de pH bajo.

**Tabla 1. Efecto de la diálisis sobre el total y el porcentaje de fármaco libre para las variantes de Marqibo.**

Muestra	Fármaco total ( $\mu$ g/ml)	% de fármaco libre
Marqibo después de la diálisis a pH 4	166,7	0,4
Marqibo después de la diálisis a pH 5	161,7	0,2
Marqibo después de la diálisis a pH 6	165,4	0,3

#### Escalado de las variantes de diálisis

45 Se preparó una solución de 50 ml de producto VSLI a partir de un kit de viales Marqibo como se describe anteriormente. El volumen del producto posterior a la carga se dividió en dos y cada mitad se colocó en el Spectrapor N.<sup>o</sup> 1, 40 mm de ancho, bolsas de membrana de diálisis MWCO de 6-8 kDa y dializadas contra un exceso de 20 volúmenes usando soluciones de sacarosa tamponada con fosfato a pH 4 o 5 para intercambios de cuatro volúmenes durante un período de setenta y dos horas a 2-8 °C protegido de la luz. Se recogieron muestras posteriores a la diálisis, se esterilizaron por filtración y se alícuotaron en tubos estériles individuales (3,5 ml) para cada punto de

tiempo del estudio de estabilidad (0, 2, 4, 8, 12 semanas a 2-8 °C y 2, 4 semanas a temperatura ambiente).

Protocolo de análisis de estabilidad

5 En cada punto de tiempo de estabilidad, las muestras se analizaron para: pH (medidor de pH Beckman Phi 360), osmolalidad (osmómetro de presión de vapor Wescor Inc. Vapro 5520), tamaño de partícula, vincristina total y libre, e impurezas relacionadas con los fármacos.

Resultados

10 Los resultados de estabilidad de la retirada de vincristina libre del tampón externo de VSLI preparado a partir de la formulación de 3 viales se muestran en la Tabla 2. La retirada de vincristina libre no pareció mejorar la estabilidad de VSLI. En 4 semanas, la NFV se había duplicado en cantidad a 4 °C y en ocho semanas la tasa de degradación era >1,3 % de NFV/mes para todas las variantes de tampón y pH. La vincristina total disminuyó en paralelo a la formación de NFV. VSLI sin vincristina externa libre también siguió las características conocidas de degradación química de la vincristina donde el fármaco se degradaba más rápidamente a temperatura ambiente, duplicando el porcentaje de NFV en 2 semanas. Estas tasas de degradación son similares al 1,6 % de NFV/mes observado para la estabilidad del kit Marqibo de 3 frascos a 4 °C, lo que llevó a requerir la administración de VSLI dentro de las 24 horas posteriores a la constitución, debido a la degradación de la vincristina a NFV.

15 Los resultados de estos estudios de diálisis confirman que un factor de estabilidad de VSLI es la formación de N-desformilvincristina (NFV). La vida útil de VSLI estaría determinada por la rapidez con que la NFV aumentaría a niveles fuera del límite de especificación 3,0. La pérdida de vincristina total se correlacionó con el crecimiento observado de NFV. Las impurezas totales no aumentaron desproporcionadamente al crecimiento de NFV, que se incluye en la asignación de impurezas totales. No se observaron nuevas impurezas. Todas las variantes permanecieron dentro de los criterios permitidos de VSLI para pH, osmolalidad y el tamaño de partícula y la ausencia de tendencias hacia las especificaciones periféricas se observaron para estos criterios. Además, la sustitución de sacarosa como agente isotónico para manitol, que está presente en la formulación de 3 viales, no tuvo efecto sobre la tasa de degradación de la vincristina.

20 Adicionalmente los resultados mostrados en la Tabla 2 demostraron que la retirada de vincristina libre por diálisis usando tampones de pH 4 y pH 5 no alteró la integridad de la membrana del liposoma. La alteración de la magnitud del gradiente de ΔpH no provocó fugas del contenido del liposoma (como podría haberse esperado si el gradiente de carga de pH se hubiera comprometido). La vincristina libre permaneció constantemente baja en todas las variantes a lo largo del tiempo.

30 TABLA 2. Estabilidad de VSLI después de la diálisis del fármaco libre externo

Tampón Variante VSLI	pH	Estabilidad de Temperatura °C	Tiempo de estabilidad, semanas.	% de Fármaco Libre	% de Fármaco Total	% NFV	% NFV/mes
PBS	7,4	4	12	0,10	93,0	6,4	1,3
PBS	7,4	TA	12	0,22	76,1	22,8	6,7
Sacarosa-PB	7,4	4	12	0,08	93,0	6,5	1,3
Sacarosa-PB	7,4	TA	12	0,12	76,1	22,7	6,7
Sacarosa-PB	4,0	4	4	0,23	94,6	4,8	1,3
Sacarosa-PB	4,0	TA	4	0,37	88,6	10,3	8,1
Sacarosa-PB	5,0	4	8	0,18	94,5	4,9	1,4
Sacarosa-PB	5,0	TA	8	0,33	88,7	10,4	8,2

35 Los resultados de estos estudios de diálisis demuestran que la degradación externa libre de la vincristina no juega un papel importante en la determinación de la estabilidad observada de VSLI, aunque es probable que contribuya de manera menor a la estabilidad global de VSLI. Estos resultados muestran que se está produciendo degradación de la vincristina dentro del liposoma después de la constitución de VSLI preparada a partir del kit de 3 viales. Mantener un gradiente de ΔpH entre el interior y el exterior del liposoma o eliminar (o minimizar) el ΔpH de VSLI no mejora la estabilidad de la vincristina dentro del liposoma para la formulación de 3 viales.

**Ejemplo 2: Variantes de liposomas de VCR de sulfato de amonio.**

40 Marqibo se constituye incubando los componentes del kit Marqibo (VSI, SCLI y SPI) juntos en una farmacia. El sulfato de vincristina, una base débil, se carga en el liposoma mediante la acción de un gradiente transmembrana creado por el diferencial de pH del SCLI pH 4,0 interno y el tampón a pH 7,4 SPI externo del liposoma resultante. Durante el proceso de carga, solo la forma neutra de vincristina pasa a través de la membrana del liposoma y queda atrapada dentro del SCLI como la sal de citrato. Esta carga con tampón citrato proporciona más del 95 % de carga de vincristina. Sin embargo, una vez constituido, el citrato de vincristina interno es moderadamente inestable, de modo que en

24 horas el crecimiento de NFV se produce a pesar del pH 4,0 interno del liposoma, que debe mantener la vincristina como especie salina. De los anteriores experimentos de diálisis de fármacos libres descritos anteriormente, la degradación de la vincristina parece estar produciéndose dentro del liposoma y no desde el ambiente externo de vincristina a pH 7,4 o por la fuga de vincristina del liposoma. Es concebible que la capacidad de tamponamiento de citrato en el liposoma interior sea ineficiente y pueda permitir que los protones y los iones solutos migren a través de la membrana hasta un punto que desestabilice el tampón interno de pH 4,0 del liposoma. Para examinar esta posibilidad, el tampón citrato sódico del interior de los liposomas se reemplazó con una "batería de carga" alternativa. Se realizó una serie de experimentos donde el tampón interno de liposomas era una solución de sulfato de amonio (AS). El pH del sulfato de amonio 250 mM es de aproximadamente 5,5; sin embargo, dentro del liposoma, el equilibrio de disociación entre el amoníaco y la sal de amonio permite que las moléculas de amoníaco neutro crucen la membrana del liposoma disminuyendo eficazmente el pH interno como resultado de los iones de hidrógeno que quedan. El pH interno resultante es de aproximadamente 4. Este equilibrio puede mantener el sulfato de vincristina a medida que la sal se forma mejor que el equilibrio citrato-cítrico de sodio dentro del entorno de liposomas de Marqibo. En estos experimentos, el pH externo varió de 5,5 a 8 manteniendo un pH interno de aproximadamente 4,0 (como resultado del equilibrio amoníaco/amonio descrito anteriormente). La molalidad o capacidad de tampón se variaron entre 250 y 350 mM AS, y los componentes isotónicos que contribuyen a la osmolalidad general se variaron usando polioles y sales iónicas. En todos los experimentos, los liposomas estaban compuestos por esfingomielina y colesterol esencialmente en la misma composición que SCLI. El único cambio fue la sustitución del tampón de citrato con tampón de sulfato de amonio.

## 20 Procesos de la unidad de preparación de liposomas.

Este ejemplo describe los métodos generales usados para la producción de liposomas de esfingomielina-colesterol.

### Cálculos de preparación de ingredientes de liposomas diana.

Las membranas liposómicas Marqibo contienen esfingomielina (SM) y colesterol (CH) en la relación en peso 2,5:1 donde el producto final VSLI contiene 2,37 mg/ml SM.

25 En estos experimentos, se eligió una concentración diana para las variantes de liposomas no cargadas con fármaco a 43 mg/ml SM para que sea fácil de procesar y estar suficientemente concentrada para la etapa de carga del fármaco.

Los procesos de la unidad de preparación de liposomas son los siguientes: para una diana de 70 ml de producto final:

#### 1. Hidratación (Formación de liposomas)

30 Disolución de lípidos. Las materias primas lipídicas SM y CH se disuelven en etanol. Se usa suficiente etanol para dar una concentración final en la fase hidratada del 15,7 % (v/v). En el ejemplo anterior, se pesan 3 g de SM y 1,2 g de CH y se mezclan juntos y se disuelven en 13 ml de etanol de prueba 200. La disolución se logra calentando la mezcla de lípidos etanólicos en un recipiente sellado a 75 °C hasta obtener una solución etanólica transparente.

35 Hidratación acuosa. La solución lipídica preparada anteriormente se "hidrata" vertiendo rápidamente la solución lipídica etanólica en una fase acuosa que se ha equilibrado previamente a 65 °C en un baño de agua. En este ejemplo, se usaron 70 ml de fase acuosa que contenía solutos de interés que se encapsularán mediante la formulación de liposoma. Por ejemplo, sulfato de amonio 350 mM o sales relacionadas. La mezcla resultante se incubó durante 0,5-1 hora con agitación, para permitir que los lípidos se hidraten por completo. Cuando la solución etanólica de lípidos se mezcla con la fase acuosa, el disolvente de etanol se diluye rápidamente, exponiendo los lípidos al agua, esto da como resultado que los lípidos formen espontáneamente vesículas de liposomas con una distribución de tamaño heterogénea. La hidratación asegura que las moléculas de agua se asocien completamente a las porciones hidrófilas de las moléculas.

#### 2. Reducción de tamaño.

45 Después de la formación de los liposomas, las vesículas se dimensionan para crear una población de liposomas que tienen un diámetro de partícula uniforme y preferido (en este caso, aproximadamente 100 nm). Esto se logra mediante la extrusión de la suspensión de liposomas, creada en la Etapa 1 anterior, a través de membranas de tamaño de poro definido bajo presión. La extrusión se realiza a 65 °C y el paso de los liposomas a través de los poros de la membrana se ve facilitado por el etanol que queda de la hidratación. Como resultado de este tratamiento, los liposomas se ajustan aproximadamente al diámetro de los poros de la membrana usados. En estos estudios se usó una extrusora Lipex (Northern Lipids) capaz de contener un volumen total de 100 ml, y la suspensión de liposomas se pasó a través de membranas de policarbonato de 25 mm de diámetro con un tamaño de poro de 0,2 µm (tres pasadas) y 0,08 µm (cinco pasadas) usando nitrógeno gas a presiones de 100-400 psi. (Whatman Nucleopore Track-Etched Membranes). El tamaño de partícula de los liposomas se mide mediante un medidor de partículas ZetaPALS que usa dispersión de luz dinámica (Brookhaven Instruments Corporation).

#### 3. Intercambio de tampón externo.

55

En esta etapa, la fase acuosa externa (p. ej., solución de sulfato de amonio 350 mM) se intercambia por una solución de sacarosa al 10 % u otro tampón deseado, tales como SPI por diálisis o diafiltración; retirando simultáneamente el etanol. Este proceso establece un gradiente de liposomas (es decir, un tampón de sulfato de amonio dentro del liposoma y un tampón de sacarosa al 10 % en el exterior de los liposomas). El sulfato de amonio está altamente disociado en iones de amonio y sulfato en el medio acuoso. Como iones cargados, no pueden cruzar la membrana liposómica, sin embargo, los iones amonio también están en equilibrio con el agua y el amoníaco, que como un gas neutro puede atravesar la membrana del liposoma. Cuando una molécula de amoníaco sale del interior del liposoma, se deja atrás un protón; bajando el pH dentro de la membrana liposómica a aproximadamente 4. Esto establece un gradiente  $\Delta$ pH donde el interior del liposoma tiene un pH de aproximadamente 4,0 y el exterior es el pH del tampón de intercambio (p. ej., 7,4). Este gradiente se usa para cargar vincristina en los liposomas. El protocolo de diafiltración (para volúmenes de producto >50 ml) consiste en intercambios de 15 volúmenes de tampón utilizando un cartucho MidGee (modelo UFP-300-E-3MA, 300.000 MWCO) conectado a un sistema de diafiltración QuixStand (GE Healthcare Life Sciences). La diálisis (para volúmenes de producto <50 ml) consiste en colocar la suspensión de liposomas en una membrana porosa molecular Spectrum Spectrapore con MWCO 6-8000 y suspenderla en un exceso de 20 volúmenes de tampón a temperatura ambiente, el tampón externo se intercambia cuatro veces durante el transcurso de un día, incluyendo un intercambio que dura toda la noche. Después del intercambio externo del tampón, el contenido de SM de cada preparación posterior a la diafiltración se midió usando el ensayo de colina con fosfolípidos Stewart.

#### 4. Carga de fármaco.

La carga del fármaco se lleva a cabo usando la relación fármaco-lípido prescrita por VSLI para lograr el volumen total deseado. La mezcla de carga de VSLI está dirigida a 0,16 mg/ml de vincristina, 2,37 mg/ml SM (como la preparación de liposomas) y se ajustó al volumen total deseado con el tampón de liposomas externo que se utilizará para la variante experimental deseada. La carga se lleva a cabo mezclando el tampón externo, el medicamento y las soluciones de liposomas (preequilibradas a temperatura ambiente) e incubando la mezcla durante 10 minutos a 65 °C en un baño de agua con una mezcla suave. Después se retira la mezcla del baño de agua para enfriar a temperatura ambiente y se almacena a 2-8 °C.

#### 5. Filtración estéril y carga del vial

La suspensión de liposomas a granel cargada con fármaco puede esterilizarse mediante técnicas de esterilización liposómica convencionales, tales como la filtración en viales adecuados para el almacenamiento. La técnica aséptica/estéril se usan en todo momento y las operaciones se realizan en una Cabina de seguridad biológica tipo A/B3 Nunair Clase II. El producto a granel a temperatura ambiente se filtra a través de un diámetro estéril de 25 mm, Filtros de jeringa Acrodisc® de 0,2  $\mu$ m de tamaño de poro, membrana Supor® (Pall Corp.) usando una jeringa estéril de 10 ml con conexión Luer. El volumen se filtra en cantidades de 10 ml en recipientes receptores estériles.

Las preparaciones variantes de liposomas se realizaron atrapando diversas molaridades de AS como el tampón interno de liposomas. Los liposomas se prepararon usando los procesos descritos anteriormente. Los liposomas se prepararon con esfingomiélin (SM) y colesterol (CH) pesados, por duplicado, para un volumen de hidratación final de 70 ml a 43 mg/ml SM y una relación en peso SM/CH 2,5:1. Las mezclas de lípidos se disolvieron en 9,5 ml de etanol a 75 °C y se hidrataron vertiendo la solución de lípidos etanólicos en 70 ml de agua precalentada, solución de AS a 65 °C y mezcla durante treinta minutos produciendo una concentración final de etanol del 12 % v/v. Los liposomas formados de esta manera fueron dimensionados por extrusión secuencial en una extrusora Lipex (Northern Lipids) a través de membranas de policarbonato de tamaño de poro 0,2  $\mu$ m (tres pasadas) y 0,08  $\mu$ m (cinco pasadas). Después de la extrusión, cada preparación se diafiltró en una solución de sacarosa al 10 % (retirando simultáneamente cualquier etanol) usando 15 intercambios de volumen en un cartucho MidGee (modelo UFP-300-E-3MA, 300.000 MWCO) y soporte QuixStand (GE Healthcare Life Sciences). El contenido de SM de cada preparación posterior a la diafiltración se midió usando el ensayo de colina con fosfolípidos Stewart.

Las cargas de fármaco de prueba a pequeña escala usando los liposomas preparados anteriormente se llevaron a cabo usando tampón SPI ajustado a pH 5,5, 6,5 o 7,5 o sacarosa tamponada con fosfato a pH 5,5, 6,5 o 7,5. Se seleccionaron las variantes que cargan menos del 5 % de vincristina libre para aumentar la escala, que eran tampón SPI a pH 6,5, 7,5 y sacarosa tamponada con fosfato a pH 6,5. Se realizaron cargas a mayor escala para cada variante AS y tampón siguiendo el procedimiento de constitución descrito anteriormente. Las mezclas de liposomas encapsulados con fármaco resultantes se esterilizaron por filtración y se monitorizaron para determinar su estabilidad a las 0, 2, 4, 8, 12 semanas a 2-8 °C y a las 2, 4 semanas a temperatura ambiente.

Los experimentos exploratorios de sulfato de amonio a pequeña escala descritos en la sección experimental anterior examinaron la eficiencia de encapsulación de las variantes AS. Estos resultados sugieren que un tampón interior de sulfato de amonio, lo que da lugar a un pH interno del liposoma de aproximadamente 4,0 en condiciones de equilibrio, es capaz de cargar vincristina mejor cuando el pH del tampón externo fue 6,5 o mayor y sin emplear un poliol. Todas las variantes que usan un tampón externo de pH 5,5 cargan menos del 90 %; aparentemente proporcionando un gradiente de  $\Delta$  pH transmembrana insuficiente. Todas las variantes del tampón PBS cargaron al menos el 95 por ciento del fármaco, mientras que las variantes que usaron sacarosa tuvieron resultados mixtos; mostrando un intervalo más amplio del 89-95 % de encapsulación. Las variantes de capacidad de tamponamiento de 250 mM y 350 mM

mostraron tendencias de encapsulación similares con variaciones de pH y poliol. Todas las variantes que mostraron  $\geq 95$  % de carga se ampliaron y se evaluó su estabilidad.

5 Los resultados de estabilidad a las 24 semanas de los liposomas de sulfato de amonio aumentados se resumen en la Tabla 3. Todas las variantes mantuvieron el tamaño de partícula VSLI deseado y los criterios de osmolalidad. El pH y el porcentaje de vincristina libre también permanecieron consistentes durante el período de monitorización de estabilidad. El tampón de sulfato de amonio no alteró las características de permeabilidad del liposoma de colesterol de esfingomielina. Se observó una estabilidad mejorada sobre la formulación Marqibo de 3 viales con formulaciones de sulfato de amonio 250 mM y 350 mM con tampón PBS externo pH 7,5. Para estas variantes, se observaron tasas de degradación del 0,2 por ciento de NFV por mes a temperatura refrigerada. Esta tasa podría proyectar la vida útil de la formulación en aproximadamente un año. Además, las impurezas totales solo aumentaron proporcionalmente con cualquier aumento de % NFV. Las impurezas totales globales mantuvieron niveles muy por debajo de los criterios VSLI de menos del 6 %.

15 Los liposomas de sulfato de amonio con un tampón externo de pH 6,5 o donde el tampón contenía un agente isotónico de poliol, p. ej. sacarosa, dieron como resultado tasas de estabilidad inferiores en comparación con las variantes de pH 7,5. Las tasas de degradación para estas variantes variaron de 1,5-1,8 NFV por ciento/mes a temperatura refrigerada (Tabla 3); tasas similares al componente VSI de la formulación actual del kit a base de citrato de 3 viales (Tabla 2). Ambas variantes de 250 mM y 350 mM mostraron las mismas tendencias con los cambios de pH y agente osmótico. Adicionalmente, en todos los casos en los que se monitorizó la estabilidad a temperatura ambiente, se observó una rápida degradación de la vincristina. Solo las muestras refrigeradas proporcionaron características de estabilidad adecuadas con las formulaciones de sulfato de amonio.

20 Las formulaciones de 250 mM y 350 mM de sulfato de amonio y liposomas de vincristina SPI pH 7,4 muestran requisitos de vida útil preliminares adecuados para una formulación comercial lista para su uso y se seleccionaron para evaluación adicional.

25

**Tabla 3.** Compendio de la estabilidad de la variante de formulación de liposomas de sulfato de amonio a 4 °C

Contenido interno liposomas/tampón externo	de mM	pH	Estabilidad Temperatura °C	de	Tiempo estabilidad (semanas)	de	Tamaño parte (nm)	de	Osmolalidad (mmol/kg)	VS total (mg/ml)	% Libre	% NfV	% Imp total	% NfV/Mo
AS/SPI	250	6,5	4	24	93	543	159,88	1,22	11,15	11,87	1,47			
AS/SPI	250	7,5	4	24	94	550	176,75	2,35	3,29	4,27	0,23			
AS/sacarosa-PB	250	7,5	4	24	97	374	163,15	1,80	9,70	10,50	1,25			
AS/SPI	350	6,5	4	24	100	548	151,55	1,01	13,76	14,49	1,89			
AS/SPI	350	7,5	4	24	100	561	181,3	1,72	3,59	4,50	0,27			
AS/sacarosa PB	350	7,5	4	24	101	376	157,69	1,11	12,00	12,81	1,62			

SPI = tampón de inyección fosfato sódico (componente del kit Marqibo).

Sacarosa PB = 10 % de sacarosa en tampón fosfato (sin NaCl)

AS = sulfato de amonio

**Ejemplo 3: Encapsulación de liposomas VCR Sulfato de amonio y estabilidad con iones divalentes y polioles**

Se llevó a cabo una serie de experimentos para examinar si VSLI que contenía iones divalentes o polioles mejoraba la vincristina encapsulada.

5 Las preparaciones variantes de liposomas se hicieron con la misma composición lipídica que el producto Marqibo, encapsulando sulfato de amonio 200 mM con sulfato de magnesio 200 mM o sulfato de manganeso 200 mM; citrato sódico 200 mM y sulfato de magnesio 200 mM o sulfato de manganeso 200 mM. Cada una de estas preparaciones se diafiltró en sacarosa al 10 % y la concentración de lípidos se ensayó como se describió previamente. Además, los liposomas se prepararon atrapando sulfato de amonio 250 mM con 5 % de manitol-20 mM PB pH 7,4, SPI pH 7,4 y  
 10 SPI pH 7,0 en el liposoma. Se intentó cargar el fármaco para cada variante de incubación a los 10 minutos (condición convencional) o 30 minutos a 65 °C durante 10 minutos.

Los resultados de los experimentos exploratorios a pequeña escala se muestran en la Tabla 6. Los resultados de carga de fármaco cuando Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> se incluyeron en el tampón interior del liposoma y se incubaron durante 10 (condición convencional) o 30 minutos a 65 °C mostraron una carga menos eficiente en comparación con la constitución del kit estándar de 3 viales. Se observaron las mejores tasas de carga de 6-8 % de fármaco libre con incubaciones durante diez minutos, con la excepción de la variante de citrato-Mg, que mostró un 21 % de fármaco libre. La presencia de los iones metálicos divalentes parece dar como resultado la interrupción del equilibrio del gradiente de pH o el colapso de la permeabilidad de la membrana.

Tabla 6. Carga de fármacos para muestras que contienen iones metálicos.

Muestra	Carga 10 min, % de fármaco libre	Carga 30 min, % de fármaco libre
Marqibo (control, 2 ml)	1	2
AS/Mg <sup>2+</sup>	6	52
AS/Mn <sup>2+</sup>	7	55
Cit/Mg <sup>2+</sup>	21	80
Cit/Mn <sup>2+</sup>	8	54

La variante de sulfato de amonio con MgSO<sub>4</sub>, que mostró un 6 % de medicamento libre después de la carga, se amplió y se monitorizó para estabilidad. Al aumentar la escala, esta variante de formulación reafirmó la pobre eficiencia de carga de liposomas observada previamente en presencia de un ion divalente; se observó un 38 % de fármaco libre después de la constitución (Tabla 7). Esta variante de gradiente mixto se procesó adicionalmente mediante re-dialización para retirar la vincristina libre externa. La variante post dializada se monitorizó después para determinar la estabilidad. Durante 5 semanas de monitorización, los niveles de fármaco libre se mantuvieron constantes, lo que  
 25 demuestra que no se produjeron más fugas del fármaco desde el liposoma. Sin embargo, se observó una rápida degradación de NFV y pérdida de VCR; dando como resultado un 12,2 % de NFV a las 5 semanas. Esto fue 62 veces más rápido que la formulación de liposomas AS SPI 250 mM pH 7,4 (Figura 7). Estos resultados demostraron que VSLI que contiene sulfato divalente no proporciona una estabilidad mejorada de vincristina encapsulada.

La formulación de AS con manitol mostró una tasa de degradación del 0,17 % NFV/Mes en comparación con una formulación que no contiene poliol al 0,14 % NFV/Mes (Tabla 7). Sin embargo, su encapsulación de solo el 93,4 % de vincristina fue menos eficiente que aquellas formulaciones sin un poliol.

Tabla 7. Estabilidad de VSLI para las variantes AS adicionales a las 20 semanas.

Variantes AS	pH	Estabilidad de Temperatura °C	Tiempo de estabilidad, semanas	% de fármaco libre	% de Fármaco Total	% NFV	% NFV/Mo
AS/MgSO <sub>4</sub> 200 mM	7,4	4	5	38,1*		22,4	14,4
AS/Manitol-PB 250 mM	7,39	4	20	6,92	95,36	2,88	0,17
AS/SPI 250 mM	7,39	4	20	2,85	95,32	3,44	0,27
AS/SPI 250 mM	7,01	4	20	2,03	93,85	4,97	0,55

\*Después de una mala carga inicial, la variante se dializó para retirar el VSI libre, de modo que T = 0 tenía un 2,81 % de NF

35 Realizaciones

Realización 1. Una composición que comprende: una fase acuosa continua que comprende un primer tampón acuoso, una fase liposómica dispersa dentro del primer tampón acuoso y una solución acuosa estabilizadora encapsulada como carga dentro de la fase liposómica; en donde la solución acuosa estabilizadora comprende un segundo tampón

- 5 acuoso y vincristina estabilizada disuelta en el mismo; en donde el segundo tampón acuoso comprende una sal que tiene al menos un soluto que puede transportarse fuera de la fase de liposoma y dejar un soluto cargado positivamente o ion hidronio en la solución acuosa estabilizadora, en donde el soluto cargado positivamente o el ion hidronio estabiliza la vincristina; y en donde la fase acuosa continua y la solución acuosa estabilizadora tienen una diferencia de pH de al menos 2 unidades de pH.
- 10 Realización 2. Un método para estabilizar la vincristina en un liposoma que comprende: dispersar una fase de liposoma dentro de una fase acuosa continua que comprende un primer tampón acuoso; en donde la fase de liposoma contiene una solución acuosa estabilizadora encapsulada como carga dentro de la fase de liposoma; en donde la solución acuosa estabilizadora comprende un segundo tampón acuoso y vincristina estabilizada disuelta en el mismo; en donde el segundo tampón acuoso comprende una sal que tiene al menos un soluto que puede transportarse fuera de la fase de liposoma y dejar un soluto cargado positivamente o ion hidronio en la solución acuosa estabilizadora, en donde el soluto cargado positivamente o el ion hidronio estabiliza la vincristina; y en donde la fase acuosa continua y la solución acuosa estabilizadora tienen una diferencia de pH de al menos 2 unidades de pH.
- 15 Realización 3. La composición o método de la realización 1 o 2, en donde el segundo tampón acuoso comprende una sal de amonio.
- Realización 4. La composición o método de la realización 1, 2 o 3, en donde el primer tampón acuoso comprende una solución de tampón fosfato.
- Realización 5. La composición o método de la realización 1, 2, 3 o 4, en donde la fase de liposoma comprende un liposoma de esfingomielina-colesterol.
- 20 Realización 6. La composición o método de la realización 1, 2, 3, 4 o 5, en donde el segundo tampón acuoso comprende sulfato de amonio.
- Realización 7. La composición o método de la realización 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en donde la vincristina comprende sulfato de vincristina.
- 25 Realización 8. La composición o método de la realización 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, en donde el pH de la solución acuosa estabilizadora es de aproximadamente 3 a aproximadamente 5.
- Realización 9. La composición o método de la realización 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en donde el pH de la fase acuosa continua es de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.
- Realización 10. La composición de la realización 9, en donde el pH de la fase acuosa continua es de aproximadamente 7 a aproximadamente 8,8.
- 30 Realización 11. La composición de la realización 10, en donde el pH de la fase acuosa continua es de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,8.
- Realización 12. La composición o método de la realización 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11, en donde el liposoma es resistente a la hidrólisis.
- 35 Realización 13. La composición o método de la realización 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, en donde la vincristina es más estable en la solución acuosa estabilizadora que en la fase acuosa continua.
- Realización 14. La composición o método de la realización 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13, en donde la relación de la fase acuosa continua y la solución acuosa estabilizadora es tal que la mezcla de las dos fases daría como resultado una fase acuosa combinada con un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8,8.
- 40 Realización 15. La composición o método de la realización 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14, en donde la sal de amonio está presente en el segundo tampón acuoso a una concentración de aproximadamente 150 mM a aproximadamente 350 mM.
- Realización 16. La composición o método de la realización 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, en donde la sal de amonio es sulfato de amonio.
- 45 Realización 17. Un método para tratar el cáncer en un mamífero que comprende la administración de una cantidad terapéutica de la composición de la realización 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16, al mamífero que lo necesita.
- Realización 18. El método de la realización 17, en donde el cáncer es linfoma, leucemia o mieloma.
- Realización 19. Un método para tratar una recurrencia de cáncer en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero la composición de la realización 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16.
- 50 Realización 20. El método de la realización 19, en donde la recaída del cáncer es un linfoma, leucemia o mieloma.

Realización 21. El método de la realización 17, 18, 19 o 20, en donde el mamífero ha experimentado previamente al menos un régimen de combinación de múltiples agentes.

Realización 22. El método de la realización 17, 18, 19, 20 o 21, que comprende además la administración conjunta de al menos otro agente quimioterapéutico

5 Realización 23. El método de la realización 17, 18, 19, 20, 21 o 22, en donde el mamífero es un humano.

Realización 24. Un método para proteger la vincristina contra la desformilación que comprende mezclar vincristina con un tampón de sal de amonio.

Realización 25. El método de la realización 23, en donde la vincristina se administra a una dosis de aproximadamente 1,5 mg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 2,5 mg/m<sup>2</sup>

10 A menos que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como el peso molecular, condiciones de reacción, etcétera usadas en la memoria descriptiva y las reivindicaciones deben entenderse estando modificadas en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se  
15 buscan obtener mediante las realizaciones de la presente descripción. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe al menos interpretarse a la luz del número de dígitos significativos informados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo ordinarias. A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la presente descripción son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se  
20 informan con la mayor precisión posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, inherentemente contiene ciertos errores necesariamente resultantes de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba. En una realización, los términos "aproximadamente" y "de forma aproximada" se refieren a parámetros numéricos dentro del 10 % del intervalo indicado.

25 Los términos "un", "una", "el/la" y referentes similares usados en el contexto de la descripción de las realizaciones de la presente descripción (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse para abarcar tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. La recitación de intervalos de valores en la presente memoria solo pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, cada valor individual se incorpora a la memoria descriptiva como  
30 si se mencionara en la presente memoria individualmente. Todos los métodos descritos en la presente memoria pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (p. ej., "tal como") proporcionado en la presente memoria tiene la intención de iluminar mejor las realizaciones de la presente descripción y no plantea una limitación en el alcance de la presente descripción. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como que indica ningún elemento no reivindicado esencial para la práctica de las realizaciones de la  
35 presente descripción.

Las agrupaciones de elementos o realizaciones alternativas descritos en la presente memoria no deben interpretarse como limitaciones. Cada miembro del grupo puede hacerse referencia y reivindicarse individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos encontrados en la presente memoria. Se anticipa que  
40 uno o más miembros de un grupo pueden incluirse o eliminarse de, un grupo por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produce tal inclusión o eliminación, se considera que la memoria descriptiva contiene el grupo como modificado, cumpliendo así la descripción escrita de todos los grupos Markush utilizados en las reivindicaciones adjuntas.

45 Ciertas realizaciones se describen en este documento, incluyendo el mejor modo conocido por el inventor para llevar a cabo las realizaciones de la presente descripción. Por supuesto, las variaciones de estas realizaciones descritas serán evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. El inventor espera que los artesanos expertos empleen tales variaciones según sea apropiado, y el inventor tiene la intención de que las realizaciones de la presente descripción se practiquen de otra manera que la específicamente descrita en la presente memoria. Por consiguiente, esta descripción incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia mencionada en las  
50 reivindicaciones adjuntas a la misma según lo permitido por la ley aplicable. Por otra parte, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos que cae dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas está incluida en la presente descripción a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o se contradiga claramente por el contexto.

55 Las realizaciones específicas descritas en la presente memoria pueden estar limitadas adicionalmente en las reivindicaciones que usan el lenguaje que consiste en o que consiste esencialmente en. Cuando se usa en las reivindicaciones, ya sea como presentada o agregado por enmienda, la frase de transición "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en las reivindicaciones. La frase de transición "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reclamación a los materiales o etapas especificados y aquellos que no

afectan materialmente la característica o características básicas y novedosas. Las realizaciones de esta descripción así reivindicadas se describen inherente o expresamente y se habilitan en la presente memoria.

5 Para concluir, debe entenderse que las realizaciones descritas en la presente memoria son ilustrativas de los principios de la presente descripción. Otras modificaciones que pueden emplearse están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por tanto, a modo de ejemplo, pero no de limitación, pueden utilizarse configuraciones alternativas de las realizaciones de la presente descripción de acuerdo con las enseñanzas de la presente memoria. Por consiguiente, la presente descripción no se limita a eso precisamente como se muestra y describe.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de vincristina lista para su uso que comprende;  
una fase acuosa continua que comprende un primer tampón acuoso,  
una fase liposómica dispersa dentro del primer tampón acuoso y  
5 una solución acuosa estabilizadora encapsulada como carga dentro de la fase de liposomas;  
en donde la solución acuosa estabilizadora comprende un segundo tampón acuoso y vincristina estabilizada disuelta en el mismo;  
en donde el segundo tampón acuoso comprende una sal de amonio; y  
10 en donde la fase acuosa continua y la solución acuosa estabilizadora tienen una diferencia de pH de al menos 2 unidades de pH y además en donde el pH de la fase acuosa continua es de 7 a 9.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la fase de liposoma comprende un liposoma de esfingomielina-colesterol.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la vincristina comprende sulfato de vincristina.
4. La composición de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero.
- 15 5. La composición de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero, en donde el cáncer es linfoma, leucemia o mieloma.
6. La composición de la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero en donde la vincristina se administra a una dosis de 1,5 mg/m<sup>2</sup> a 2,5 mg/m<sup>2</sup>.
7. La composición de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una recurrencia de cáncer en un mamífero.
- 20 8. La composición de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una recurrencia de cáncer en un mamífero en donde la recurrencia de cáncer es un linfoma, leucemia o mieloma.
9. La composición de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una recurrencia de cáncer en un mamífero en donde el mamífero ha experimentado previamente al menos un régimen de combinación de múltiples agentes.
10. Un método para estabilizar la vincristina en un liposoma que comprende:  
25 dispersar una fase de liposoma dentro de una fase acuosa continua que comprende un primer tampón acuoso;  
en donde la fase de liposoma contiene una solución acuosa estabilizadora encapsulada dentro de la fase de liposoma;  
en donde la solución acuosa estabilizadora comprende un segundo tampón acuoso y vincristina estabilizada disuelta en el mismo;  
30 en donde el segundo tampón acuoso comprende una sal de amonio; y  
en donde la fase acuosa continua y la solución acuosa estabilizadora tienen una diferencia de pH de al menos 2 unidades de pH y además en donde el pH de la fase acuosa continua es de 7 a 9.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el primer tampón acuoso comprende una solución de tampón fosfato.
12. El método de la reivindicación 10, en donde la fase de liposoma comprende un liposoma de esfingomielina-colesterol.  
35
13. El método de la reivindicación 10, en donde la vincristina comprende sulfato de vincristina.

**FIG. 1** Mecanismo de encapsulación para VSLI Sulfato de Amonio

