

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 460**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2015 PCT/JP2015/080316**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16068160**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2015 E 15855798 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3213755**

54 Título: **Nuevo método de producción de lipoplejo para administración local y fármaco antitumoral que utiliza lipoplejo**

30 Prioridad:

30.10.2014 JP 2014221062

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

04.03.2021

73 Titular/es:

**DELTA-FLY PHARMA, INC. (100.0%)
37-2, Nishikino, Miyajima Kawauchi-cho
Tokushima-shi, Tokushima 771-0116, JP**

72 Inventor/es:

**ISHIDA, TATSUHIRO;
ESHIMA, KIYOSHI y
FUKUSHIMA, MASAKAZU**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 809 460 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

Nuevo método de producción de lipoplejo para administración local y fármaco antitumoral que utiliza lipoplejo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo método para producir un lipoplejo usado para el tratamiento de metástasis peritoneales de cáncer pancreático mediante administración tópica, en donde la composición comprende un lipoplejo que consiste en dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina, un lípido catiónico y ARN de horquilla corta (ARNhc) capaz de inhibir la expresión de timidilato sintasa a través de ARNi (TS-ARNhc), en donde la fosfatidilcolina es 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), palmitoil-oleoil fosfatidilcolina (POPC), o 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC), y en donde el lípido catiónico es cloruro de 0,0'-ditetradecanoil-N-(a-trimetilamonioacetil)dietaanolamina (DC-6-14).

15 **Técnica anterior**

Los liposomas están compuestos de fosfolípidos que constituyen las membranas celulares de los organismos, tienen alta biocompatibilidad y pueden administrar medicamentos y principios activos mientras los protegen de enzimas degradantes *in vivo*. Por consiguiente, los liposomas han llamado la atención como herramientas útiles para los sistemas de administración de fármacos.

Mientras tanto, las moléculas de ARNi que inducen la interferencia de ARN (denominadas en lo sucesivo, "ARNi") han llamado la atención como herramientas útiles para el tratamiento de tumores y otros fines, y se ha desarrollado una amplia variedad de moléculas de ARNi que son capaces de inhibir el crecimiento tumoral. Además, se ha desarrollado un método para usar complejos compuestos de moléculas de ARNi y mezclas lipídicas (es decir, lipoplejos) para administrar moléculas de ARNi como principios activos a células tumorales (Qixin Leng et al., Drug Future, septiembre de 2009; 34 (9): 721; Sherry Y., Wu et al., The AAPS Journal, Vol. 11, n.º 4, diciembre de 2009; y B. Ozpolat et al., Journal of Internal Medicine 267; 44-53, 2009).

En el pasado, los presentes inventores desarrollaron moléculas de ARNi dirigidas a timidilato sintasas (denominadas en lo sucesivo, "TS"), que están implicadas con el crecimiento tumoral (documento WO 2010/113844). Se informó que la administración de dichas moléculas de ARNi a los tumores mediante, por ejemplo, administración intravenosa con el uso de complejos (lipoplejos) incluidos en una mezcla de lípidos catiónicos de una formulación dada permitiría inhibir el crecimiento de tumores que muestran expresión de TS. También informaron que el uso de dichos lipoplejos en combinación con agentes quimioterapéuticos daría como resultado la mejora de la eficacia de direccionamiento tumoral, así como la mejora de los efectos antitumorales de las moléculas de ARNi en un grado significativo (documento WO 2012/161196).

40 **Sumario de la invención**40 **Objetivos a alcanzar mediante la invención**

De acuerdo con una técnica convencional de producción de lipoplejos, un método para preparar una mezcla lipídica ha comprendido una etapa de disolución de un componente, tal como un fosfolípido, en un disolvente orgánico, tal como cloroformo o ciclohexano, de antemano. En un método de producción industrial que implica el uso de un disolvente orgánico, tal como cloroformo o ciclohexano, sin embargo, ha sido necesario proporcionar instalaciones a gran escala, tales como instalaciones para el manejo de materiales peligrosos o aparatos a prueba de explosión. En el pasado, también, la producción de lipoplejos había requerido un proceso complicado que comprendía preparar una solución acuosa de moléculas de ARNi, preparar por separado una mezcla lipídica y luego mezclar la solución acuosa con la mezcla lipídica antes de la administración a un paciente con cáncer en un servicio de medicina ambulatoria de un hospital, requiriendo dicho proceso gran trabajo.

Dadas las circunstancias anteriores, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método industrial para la producción de lipoplejos que permita la producción fácil y simultánea de polvos generadores de lipoplejos que producen lipoplejo simplemente mediante suspensión en un disolvente tal como agua. Esto evitaría la necesidad de un proceso complicado de producción de lipoplejos en el que se generaría una mezcla lipídica mediante el uso de una gran cantidad de un disolvente orgánico, tal como cloroformo o ciclohexano, y se sometería a liofilización, y la mezcla lipídica resultante se dispersaría en un disolvente, tal como agua, después de lo cual la dispersión resultante se mezclaría luego con una solución acuosa de moléculas de ARNi.

Es otro objetivo de la presente invención eliminar la necesidad de un proceso complicado de preparación de lipoplejos que requiere un trabajo extenso en un servicio de medicina ambulatoria de un hospital.

65 **Medios para alcanzar los objetivos**

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios concentrados para alcanzar los objetivos anteriores. Como

resultado, se ha logrado producir un producto de lipoplejos liofilizado mediante la disolución de dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina y un lípido catiónico en etanol altamente biotolerante y no explosivo, la adición de la solución de alcohol gota a gota a una solución de moléculas de ARNi con agitación y, la liofilización de la solución y eliminación de etanol de la misma. Por lo tanto, se descubrió que un paciente con cáncer podría tratarse eficazmente mediante la mezcla del producto liofilizado resultante del lipoplejo reivindicado obtenido en un tampón adecuado y la administración tópica del mismo a un órgano diana afectado por metástasis peritoneal de cáncer pancreático. La presente invención se basa en dichos hallazgos.

La presente invención es como se divulga en las reivindicaciones.

Esta descripción incluye parte o todo el contenido como se divulga en la solicitud de patente japonesa n.º 2014-221062, que es un documento de prioridad de la presente solicitud.

Efectos de la invención

La presente invención puede proporcionar un método industrial para la producción de lipoplejos que permita la producción fácil y simultánea de polvos generadores de lipoplejos que producen lipoplejo simplemente mediante suspensión en un disolvente tal como agua. Esto evitaría la necesidad de un proceso complicado de producción de lipoplejos que comprenda generar una mezcla lipídica con el uso de una gran cantidad de un disolvente orgánico, tal como cloroformo o ciclohexano, que se someta a liofilización, dispersar la mezcla lipídica resultante en un disolvente, tal como agua, y luego mezclar la dispersión resultante con una solución acuosa de moléculas de ARNi.

De acuerdo con la presente invención, también, se puede eliminar la necesidad de un proceso complicado de preparación de lipoplejos que requiere un trabajo extenso en un servicio de medicina ambulatoria de un hospital.

Con el uso del lipoplejo reivindicado de la presente invención, las moléculas de ARNi capaces de inhibir el crecimiento tumoral también pueden administrarse eficazmente a células tumorales.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de la comparación de las propiedades físicas (es decir, diámetro de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta) de una preparación convencional, nueva preparación (1) y nueva preparación (2): la preparación convencional preparada mediante la disolución de una mezcla lipídica que consiste en DOPC, DOPE y DC-6-14 obtenida mediante una técnica conocida en un disolvente orgánico (ciclohexano/etanol (95/5 (v/v))), liofilización de la solución resultante, dispersión del producto liofilizado resultante en agua para preparar una solución y mezcla de una solución acuosa de moléculas de ARNi con ella; y la nueva preparación (1) y la nueva preparación (2) obtenidas mediante el método de acuerdo con la presente invención: la nueva preparación (1) preparada mediante la disolución de una mezcla lipídica que consiste en DOPC, DOPE y DC-6-14 en un disolvente orgánico (ciclohexano/etanol (95/5 (v/v))), liofilización de la solución resultante y disolución homogénea del producto liofilizado resultante en etanol para preparar una solución, adición de la solución resultante gota a gota a una solución homogénea de moléculas de ARNi con agitación, liofilización de la solución resultante y dispersión del producto liofilizado resultante en agua; y la nueva preparación (2) preparada mediante la disolución homogénea de lípidos (es decir, DOPC, DOPE y DC-6-14) en etanol para preparar una solución homogénea, disolución de la solución homogénea resultante gota a gota en una solución acuosa homogénea de moléculas de ARNi con agitación para preparar una solución de agua/etanol, liofilización de la solución de agua/etanol resultante y dispersión del producto liofilizado resultante en agua.

La Figura 2 muestra fotografías que demuestran los resultados de la comparación de la capacidad de retención de TS-ARNhc de una preparación convencional obtenida mediante una técnica conocida, la nueva preparación (1) obtenida mediante el método de la presente invención y la nueva preparación (2) obtenida mediante el método de la presente invención.

La Figura 3 muestra un gráfico que demuestra los resultados de la comparación y el análisis de los efectos inhibidores en el gen diana tumoral (ARNm de TS) mediante RT-PCR en tiempo real lograda mediante la administración intraperitoneal de la preparación convencional obtenida mediante una técnica conocida, la nueva preparación (1) obtenida mediante el método de la presente invención y la nueva preparación (2) obtenida mediante el método de la presente invención para modelos de ratón con metástasis peritoneal de cáncer gástrico (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$).

La Figura 4 muestra un gráfico que demuestra los resultados de la cuantificación de la actividad luciferasa de grupos de modelos de ratón con metástasis peritoneal de cáncer gástrico sometidos a la administración intraperitoneal de la preparación convencional, la nueva preparación (1) y la nueva preparación (2), respectivamente, así como el grupo de control (es decir, efectos inhibidores del crecimiento tumoral) (***: $P < 0,005$).

La Figura 5-1 muestra fotografías que muestran los resultados del análisis usando IVIS de los efectos inhibidores del crecimiento tumoral de la administración del lipoplejo portador de TS-ARNhc (es decir, la nueva preparación (2)) solo, Paclitaxel solo y el lipoplejo portador de TS-ARNhc (es decir, la nueva preparación (2)) en combinación con Paclitaxel en modelos de ratón con metástasis peritoneal de cáncer de ovario.

La Figura 5-2 muestra un gráfico que muestra los resultados de la cuantificación del crecimiento tumoral en la

cavidad abdominal basada en los datos de imagen mostrados en la Figura 5-1. La Figura 5-3 muestra los resultados mostrados en la Figura 5-2 en forma de un gráfico logarítmico.

La Figura 5-4 muestra un gráfico que muestra los efectos de prolongación de la vida observados en el grupo de control, el grupo sometido a la administración del lipoplejo portador de TS-ARNhc (es decir, la nueva preparación (2)) solo, el grupo sometido a la administración de Paclitaxel solo, y el grupo sometido a la administración de Paclitaxel en combinación con el lipoplejo portador de TS-ARNhc (es decir, la nueva preparación (2)) en experimentos con animales que se muestran en la Figura 5-1.

La Figura 5-5 muestra un gráfico que muestra un cambio en la concentración de TS-ARNhc en la ascitis y en la sangre analizada mediante RT-PCR después de la administración intraperitoneal del lipoplejo portador de TS-ARNhc (es decir, la nueva preparación (2)) a un modelo de ratón con metástasis peritoneal de cáncer de ovario.

La Figura 6-1 muestra un gráfico que muestra los resultados de la cuantificación usando IVIS del crecimiento tumoral analizado basada en los datos de imagen de modelos de ratón con metástasis peritoneal de cáncer de páncreas sometidos a la administración del lipoplejo portador de TS-ARNhc (es decir, la nueva preparación (2)) solo, Paclitaxel solo y el lipoplejo portador de TS-ARNhc (es decir, la nueva preparación (2)) en combinación con Paclitaxel. La Figura 6-2 muestra los resultados mostrados en la Figura 6-1 en forma de un gráfico logarítmico.

La Figura 6-3 muestra un gráfico que muestra los efectos de prolongación de la vida observados en modelos de ratón con metástasis peritoneal de cáncer de páncreas resultantes de la administración del lipoplejo portador de TS-ARNhc (es decir, la nueva preparación (2)) solo, administración de Paclitaxel solo, y administración del lipoplejo portador de TS-ARNhc (es decir, la nueva preparación (2)) en combinación con Paclitaxel.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

El lipoplejo de la presente invención comprende una mezcla lipídica que consiste en dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina y un lípido catiónico y una molécula de ARNi, o es un complejo que consiste en ellos.

La "fosfatidilcolina" que se puede usar en la presente invención tiene una o más características seleccionadas de (i) a (iii) a continuación:

- (i) la fosfatidilcolina comprende al menos una cadena de ácido graso insaturado que contiene un doble enlace carbono-carbono;
- (ii) la fosfatidilcolina comprende al menos una cadena de ácido graso insaturado que contiene un doble enlace carbono-carbono en forma cis; y
- (iii) la fosfatidilcolina tiene una temperatura de transición de fase baja (por ejemplo, inferior a 0 °C, inferior a -10 °C o inferior a -20 °C).

Por lo tanto, la "fosfatidilcolina" reivindicada incluye 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), palmitoil-oeoil fosfatidilcolina (POPC) y 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC), siendo preferible DOPC.

El "lípido catiónico" que se puede usar en la presente divulgación puede ser cualquier sustancia seleccionada entre cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dietanolamina (DC-6-14), cloruro de N,N-dioleoil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dimetil-(2,3-dioleoiloxi)propilamina (DODMA), y un derivado de cualquiera de los mismos. El lípido catiónico reivindicado es DC-6-14.

El lipoplejo de la presente invención comprende una mezcla lipídica que consiste en DOPE, DOPC y DC-6-14.

La proporción de DOPE, fosfatidilcolina (DOPC) y un lípido catiónico (DC-6-14) en el lipoplejo se puede determinar dentro de un intervalo de relación molar de 2 a 4:1 a 3:4 a 6. La proporción de DOPE:DOPC:DC-6-14 es preferentemente 3:2:5.

Un tamaño de partícula del lipoplejo de la presente invención es de 200 nm a 2000 nm, y preferentemente de aproximadamente 400 nm a 700 nm. El potencial zeta del lipoplejo de la presente invención es de 30 a 60 mV, y preferentemente de aproximadamente 30 a 40 mV.

El lipoplejo de la presente invención se puede preparar mediante el método que comprende las siguientes etapas.

De manera específica, un producto liofilizado de una mezcla de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y un lípido catiónico o cada ingrediente del mismo se disuelve en alcohol.

Los ejemplos de alcoholes que se pueden usar incluyen etanol y metanol, siendo el etanol, que tiene una alta biotolerancia, el reivindicado. La fosfatidiletanolamina, la fosfatidilcolina y un lípido catiónico se pueden usar en cualquier forma. Por ejemplo, dicha sustancia se puede usar en forma de polvo.

La fosfatidiletanolamina, la fosfatidilcolina y un lípido catiónico pueden disolverse por separado en alcohol por adelantado, y dichas sustancias se fraccionan por separado y se mezclan para ajustar la cantidad de la mezcla

resultante al nivel dado. Como alternativa, un producto liofilizado de una mezcla lipídica que consiste en fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y un lípido catiónico en la cantidad dada descrita anteriormente puede disolverse en alcohol.

5 Las cantidades de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y un lípido catiónico en una mezcla de alcohol pueden ser cada una de 1 a 100 mM, y preferentemente de 10 a 80 mM.

La fosfatidiletanolamina, la fosfatidilcolina y un lípido catiónico se pueden disolver en etanol con calentamiento. Por ejemplo, el calentamiento se puede llevar a cabo de 35 °C a 60 °C, y preferentemente de 40 °C a 50 °C.

10 Posteriormente, la solución de alcohol resultante se añade gota a gota a una solución de moléculas de ARNi (por ejemplo, una solución acuosa de moléculas de ARNi en agua) con agitación, y la solución resultante se liofiliza luego para obtener un producto liofilizado del lipoplejo. Es preferible que una solución de alcohol se mezcle con una solución de moléculas de ARNi de 1 a 3:7 a 9.

15 El producto liofilizado puede mezclarse adicionalmente con una solución acuosa, tal como un tampón, para obtener una suspensión de lipoplejo, y la suspensión resultante se puede administrar a un organismo. Un tampón puede estar en forma de una solución acuosa que se puede administrar a un organismo. Por ejemplo, se puede usar solución salina fisiológica o un líquido de hidratos de carbono. La mezcla se lleva a cabo preferentemente durante 1 a 15 minutos, y más preferentemente aproximadamente 5 minutos, mediante agitación con el uso de un mezclador vórtex u otro medio. Mediante la realización de la agitación de dicha manera, se puede ajustar un tamaño de partícula del lipoplejo al nivel de interés descrito anteriormente.

25 En el método para producir el lipoplejo reivindicado de acuerdo con la presente invención, no es necesario el uso de cloroformo o ciclohexano con alta toxicidad y explosividad. Por consiguiente, no es necesario proporcionar una instalación a prueba de explosiones altamente segura en la planta de fabricación. Como el etanol con alta biotolerancia se usa selectivamente, también, la administración del mismo a un paciente no plantearía ningún problema incluso en presencia de una cantidad muy pequeña de un disolvente restante.

30 De acuerdo con la presente invención, además, un lipoplejo se puede preparar fácilmente en un ámbito médico, tal como un servicio de medicina ambulatoria de un hospital. De manera específica, un vial de inyección o similar lleno con el producto liofilizado del lipoplejo se puede proporcionar a un ámbito médico, tal como un servicio de medicina ambulatoria de un hospital, para que se pueda preparar una solución del lipoplejo a administrar (es decir, una dispersión de agua) en el momento del uso simplemente mediante la adición de un tampón al mismo en un servicio de medicina ambulatoria de un hospital antes de la administración a un paciente.

35 El lipoplejo de la presente invención se usa para administración tópica a un paciente. En la presente invención, "administración tópica" no está destinada a la administración sistémica mediante inyección intravenosa u otro medio. Los ejemplos de administración tópica incluyen, pero sin limitación, intraperitoneal, intratorácica, intramuscular, hipodérmica, endodérmica, intraocular, intracerebral, intratecal, intravaginal, intrarrectal, intraorgánica y aplicación a la epidermis. La expresión "administración tópica" se refiere preferentemente a la administración intracavitaria, y más preferentemente a la administración intratorácica o intraperitoneal.

45 El lipoplejo de la presente invención comprende, como principio activo, una molécula de ARNi, tal como ARNip o ARNhc, capaz de inhibir la expresión de genes que codifican factores expresados en células tumorales e implicados con el crecimiento de células tumorales a través del ARNi. Los ejemplos de "genes que codifican factores expresados en células tumorales e implicados con el crecimiento de células tumorales" incluyen, pero sin limitación, genes que codifican factores reguladores del crecimiento, tales como la timidilato sintasa, VEGF, EGFR, PDGF, HGF, Wint, Bcl-2 y survivina, y enzimas implicadas en la síntesis de ácidos nucleicos, tales como ribonucleótido reductasa y ADN polimerasa. La información genética sobre estos genes se divulga en bases de datos conocidas de GenBank y similares, y el ARNip o ARNhc se puede diseñar y sintetizar basándose en dicha información genética. El ARNhc que se describe en detalle a continuación se puede usar como ARNhc que puede inhibir la expresión de timidilato sintasa a través del ARNi. Como alternativa, se puede usar un agente quimioterapéutico contra el cáncer como principio activo.

55 En el lipoplejo de la presente invención, una molécula de ARNi puede estar contenida en una porción hueca encerrada por una bicapa lipídica de una mezcla lipídica, o puede estar unida a la superficie de la membrana externa de una bicapa lipídica. Una molécula de ARNi se une preferentemente a la superficie de la membrana externa de una bicapa lipídica. Una molécula de ARNi se puede unir a la superficie de la membrana externa de una bicapa lipídica mediante el método descrito anteriormente.

60 El lipoplejo de la presente invención se usa como agente antitumoral.

El lipoplejo de acuerdo con una realización de la presente invención comprende ARNhc que puede inhibir la expresión de timidilato sintasa (denominada en lo sucesivo "TS") a través de ARNi.

65 El ARNhc que puede inhibir la expresión de TS de acuerdo con la presente invención ejerce actividad de ARNi

específica de TS dirigiéndose al ARNm de TS y, por lo tanto, puede inhibir notablemente la expresión de TS. La expresión "ARNm dirigido" usado en el presente documento se refiere a la situación en la que una cadena antisentido de ARNhc descrita en detalle a continuación se puede hibridar en condiciones rigurosas con el ARNm diana.

5 Las condiciones rigurosas se pueden determinar basándose en la temperatura de fusión (Tf) para ácidos nucleicos a la que se forma un híbrido de acuerdo con una técnica convencional. En condiciones rigurosas, por ejemplo, las condiciones de lavado que permiten el mantenimiento de la hibridación comprenden generalmente "SSC 1x, SDS al 0,1 %, 37 °C", más estrictamente "SSC 0,5x, SDS al 0,1 %, 42 °C", y, aún más estrictamente, "SSC 0,1x, SDS al 0,1 %, 65 °C".

10 De acuerdo con la presente invención, el ARNhc comprende una cadena de sentido que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de nucleótidos de ORF que codifica TS o una parte de la misma y una cadena antisentido que hibrida en condiciones rigurosas con la cadena de sentido. La expresión "secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia de nucleótidos de ORF o una parte de la misma" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es idéntica a una secuencia de nucleótidos obtenida mediante sustitución de timina con uracilo en la secuencia de nucleótidos de ORF o una parte de la misma.

15 La cadena de sentido consiste en 15 a 25 nucleótidos y, preferentemente, en 19 nucleótidos. Mientras que la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido es preferentemente la misma que la secuencia de nucleótidos de ORF que codifica TS, puede ser sustancialmente la misma secuencia; es decir, una secuencia homóloga. De manera específica, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido puede ser diferente de la secuencia de nucleótidos de ORF mediante sustitución, eliminación, inserción y/o adición de uno o más; es decir, 1 a 3 nucleótidos, preferentemente 1 o 2 nucleótidos y, más preferentemente, 1 nucleótido.

20 La cadena antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse en condiciones rigurosas con la cadena de sentido. Siempre que se pueda hibridar en condiciones rigurosas, la cadena antisentido puede comprender un emparejamiento incorrecto, que incluye una sustitución, eliminación, inserción y/o adición de 1 a 3 nucleótidos, preferentemente 1 o 2 nucleótidos y, más preferentemente, 1 nucleótido. La cadena antisentido consiste preferentemente en una secuencia de nucleótidos completamente complementaria a la cadena de sentido.

25 Las secuencias de nucleótidos de la cadena de sentido y la cadena antisentido se pueden seleccionar basándose en la secuencia de nucleótidos que codifica TS conocida (GenBank: CR601528.1). Se conocen varios métodos para seleccionar dichas secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, se puede usar el sistema de soporte de diseño de ARNip (Takara Bio Inc.).

30 En la presente invención, los ejemplos de cadenas de sentido incluyen aquellas que consisten en las secuencias de nucleótidos indicadas a continuación, aunque las cadenas de sentido no están limitadas a ellas: 5'-GUAACACCAUCGAUCAUGA-3' (SEQ ID NO: 1); 5'-GAAUACAGAGAUUGGAAU-3' (SEQ ID NO: 3); y 5'-CGAUGAUGAUGAUGAGUGU-3' (SEQ ID NO: 5).

35 En la presente invención, el ARNhc comprende preferentemente: la cadena de sentido 5'-GUAACACCAUCGAUCAUGA-3' (SEQ ID NO: 1) y la cadena antisentido 5'-UCAUGAUCGAUGGUGUJAC-3' (SEQ ID NO: 2); la cadena de sentido 5'-GAAUACAGAGAUUGGAAU-3' (SEQ ID NO: 3) y la cadena antisentido 5'-AUUCCAUAUCUCUGUAUUC-3' (SEQ ID NO: 4); o la cadena de sentido 5'-CGAUGAUGAUGAUGAGUGU-3' (SEQ ID NO: 5) y la cadena antisentido 5'-ACACUCUACAUCAUGAUCG-3' (SEQ ID NO: 6).

40 En la presente invención, el ARNhc comprende más preferentemente la cadena de sentido que consiste en la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 y la cadena antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2.

45 Una cadena de sentido y una cadena antisentido están conectadas entre sí a través de un enlazador, se pliegan cuando el enlazador forma un bucle, y la cadena antisentido y la cadena de sentido se hibridan entre sí para formar una porción bicatenaria. Siempre que un enlazador incluido en la molécula de ARNhc pueda conectar la cadena de sentido con la cadena antisentido y formar una estructura de tallo-bucle, puede ser un enlace polinucleotídico o no polinucleotídico. Un enlazador es preferentemente, pero sin limitarse en particular a, un enlazador polinucleotídico que consiste en 2 a 22 nucleótidos conocidos en la técnica. Los ejemplos específicos del mismo incluyen UAGUGCUCUGGUUG (SEQ ID NO: 7), UUCAAGAGA, CCACC, CUCGAG, CCACACC, UUCAAGAGA, AUG, CCC y UUCG, siendo preferible UAGUGCUCUGGUUG (SEQ ID NO: 7).

50 En la presente invención, el ARNhc comprende un saliente que consiste en dos o más nucleótidos en el extremo 3'.

55 En la presente invención, el término "saliente" se refiere a un nucleótido añadido al extremo 3' de la cadena antisentido que no tiene un nucleótido capaz de unirse de manera complementaria a una posición correspondiente de la cadena de sentido. Si una cadena antisentido no tiene un saliente en el extremo 3', el grado de inhibición de la expresión de TS causada por el ARNhc disminuye en aproximadamente un 40 % a un 60 %, en comparación con un caso en el que una cadena antisentido tiene un saliente. Los tipos y números de nucleótidos que constituyen el saliente no están

particularmente limitados. Por ejemplo, se pueden usar secuencias que consisten en 1 a 5, preferentemente 1 a 3, y más preferentemente 1 o 2 nucleótidos. Ejemplos específicos incluyen TTT, UU y TT, siendo preferible UU.

5 En la presente invención, un ARNhc preferible es un ARN monocatenario que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

La cadena de sentido o antisentido puede tener el extremo 5' fosforilado, y puede comprender trifosfato (ppp) unido al extremo 5', según la necesidad.

10 El lipoplejo que tiene ARNhc de la presente invención puede comprender ARNip o ARNhc que puede inhibir la expresión de "genes que codifican factores expresados en células tumorales e implicados con el crecimiento de células tumorales" a través de ARNi, además de ARNhc que puede inhibir la expresión de TS. Se puede usar ARNip o ARNhc como se define anteriormente. El ARNhc que puede inhibir la expresión de TS y otro ARNip o ARNhc pueden estar presentes en el mismo lipoplejo o en lipoplejos separados.

15 Tal como se describe en detalle en los ejemplos más adelante, el lipoplejo que tiene ARNhc es capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales a través de la administración tópica del mismo y, en consecuencia, se puede usar para el tratamiento del cáncer.

20 Los cánceres que se pueden tratar con el uso del agente antitumoral de la presente invención son aquellos que exhiben altos niveles de expresión de TS. Los candidatos para el tratamiento son metástasis peritoneales de cáncer de páncreas.

25 El agente antitumoral de la presente invención puede comprender adicionalmente, además de un lipoplejo, un excipiente, un aglutinante, un disgregante, un lubricante, un diluyente, un solubilizante, un agente de suspensión, un agente isotonzante, un regulador de pH, un tampón, un estabilizante, un colorante, un agente aromatizante, un agente para mejorar el olor, histidina u otras sustancias que generalmente se usan en la producción de productos farmacéuticos.

30 Los ejemplos de excipientes incluyen lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, maltosa, manitol, eritritol, xilitol, maltitol, inositol, dextrano, sorbitol, albúmina, urea, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa cristalina, ácido silícico, metilcelulosa, glicerina, alginato de sodio, goma arábiga y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de lubricantes incluyen talco purificado, estearato, borato de sodio, polietilenglicol y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de aglutinantes incluyen jarabe simple, solución de glucosa, solución de almidón, solución de gelatina, alcohol polivinílico, éter polivinílico, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, goma laca, metilcelulosa, etilcelulosa, agua, etanol, fosfato potásico y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de disgregantes incluyen almidón deshidratado, alginato de sodio, agar en polvo, laminarina en polvo, bicarbonato sódico, carbonato de calcio, ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitano, lauril sulfato de sodio, monoglicérido de ácido esteárico, almidón, lactosa y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de diluyentes incluyen agua, alcohol etílico, macrogol, propilenglicol, alcohol isoestearílico etoxilado, alcohol isoestearílico polioxilado, ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitano y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de estabilizantes incluyen piro-sulfito sódico, ácido etilendiaminotetraacético, ácido tioglicólico, ácido tioláctico y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de agentes de isotonicidad incluyen cloruro de sodio, ácido bórico, glucosa, glicerina y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de reguladores del pH y tampones incluyen citrato sódico, ácido cítrico, acetato sódico, fosfato sódico y una mezcla de los mismos.

45 El agente antitumoral de la presente invención se administra mediante administración tópica. Las formas de administración tópica son como se definieron anteriormente. La composición de la presente invención se puede preparar en cualquiera de las diversas formas de dosificación adecuadas para la administración tópica, tal como una inyección, una suspensión, una emulsión o un aerosol. El agente antitumoral de la presente invención se puede proporcionar en forma liofilizada, y se puede añadir un tampón adecuado (por ejemplo, solución salina fisiológica) en el momento de su uso.

50 Los efectos del agente antitumoral de la presente invención se pueden evaluar mediante la administración del agente antitumoral a células o tejidos que se originan de cualquiera de los cánceres descritos anteriormente y a un individuo afectado por cualquiera de los cánceres descritos anteriormente, la comparación del tamaño del tumor resultante con el tamaño del tumor en células o tejidos y en un individuo al que no se le ha administrado el agente antitumoral (o antes de la administración), y utilizando la contracción o extinción del tumor como indicador. Como alternativa, los efectos del agente antitumoral de la presente invención se pueden evaluar mediante la administración del agente antitumoral a células o tejidos que se originan de cualquiera de los cánceres descritos anteriormente y a un individuo afectado por cualquiera de los cánceres descritos anteriormente, y la determinación de la tasa de supervivencia mejorada (es decir, efectos que prolongan la vida) y la reducción o desaparición de un derrame pleural o ascitis, en comparación con un individuo al que no se le ha administrado el agente antitumoral.

65 El agente antitumoral de la presente invención se puede usar en combinación con quimioterapia contra el cáncer existente o un agente quimioterapéutico contra el cáncer. La quimioterapia contra el cáncer o un agente quimioterapéutico contra el cáncer que se puede usar en combinación con el agente antitumoral de la presente

invención no está particularmente limitado, siempre que pueda modificar las condiciones del tumor, de modo que el lipoplejo de la presente invención pueda invadir fácilmente el tejido tumoral. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer existentes incluyen agentes antitumorales que tienen acción inhibitoria de la despolimerización de microtúbulos, tales como Taxol® (Bristol-Myers Squibb) y Taxotere® (Sanofi-Aventis), que son eficaces para pacientes con metástasis peritoneal de cáncer gástrico y cáncer de ovario y agentes antitumorales que comprenden derivados de desoxicitidina, tales como Gemcitabine® (Eli Lilly) que es eficaz para el tratamiento del cáncer pancreático y la metástasis peritoneal del cáncer pancreático.

El agente antitumoral de la presente invención se puede usar en combinación con otros agentes quimioterapéuticos convencionales contra el cáncer, además de o en lugar de los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer descritos anteriormente. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos contra el cáncer incluyen ciclofosfamida, N-óxido de mostaza nitrogenada, ifosfamida, melfalán, busulfán, mitobronitol, carbocuna, tiotepa, ranimustina, nimustina, temozolomida, carmustina, pemetrexed disódico, metotrexato, ribósido de 6-mercaptopurina, mercaptopurina, doxilfluridina, carmofur, citarabina, ocfosfato de citarabina, enocitabina, fludarabina, pemetrexed, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, docetaxel, clorhidrato de irinotecán y capecitabina. Se pueden usar uno o una pluralidad de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer seleccionados a partir de los mismos. Como en el caso del agente quimioterapéutico contra el cáncer descrito anteriormente, el ARNhc se puede administrar eficazmente a células tumorales cuando el agente quimioterapéutico contra el cáncer se usa en combinación con el agente antitumoral de la presente invención. Los efectos antitumorales logrados de este modo pueden ser notablemente mayores que los logrados con el uso del agente quimioterapéutico contra el cáncer o el agente antitumoral de la presente invención solo.

Mientras el agente antitumoral de la presente invención se administre en combinación con el agente quimioterapéutico contra el cáncer existente, estos agentes se pueden proporcionar en forma de un "producto combinado".

El agente antitumoral de la presente invención se puede preparar en forma de un "producto combinado" en combinación con el agente quimioterapéutico contra el cáncer existente. Dicho "producto combinado" puede ser un fármaco compuesto que contiene el agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico contra el cáncer existente como principios activos. Además, se puede producir, empaquetar y distribuir un solo envase (un kit de formulación) que contiene el agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico contra el cáncer existente adecuado para la administración combinada.

La expresión "administración combinada" puede referirse no solo a la administración simultánea del agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico contra el cáncer existente, sino también a la administración del agente antitumoral de la presente invención y el agente quimioterapéutico contra el cáncer existente a determinados intervalos. La ruta de administración y los medios para la administración del agente antitumoral de la presente invención pueden ser iguales o diferentes a los del agente quimioterapéutico contra el cáncer existente.

La dosis y la frecuencia de administración del agente antitumoral de la presente invención pueden variar dependiendo de factores, tales como la edad y el peso corporal de un paciente y la gravedad de una enfermedad. El agente antitumoral se puede administrar a una sola dosis seleccionada apropiadamente dentro del intervalo de 0,0001 mg a 100 mg en términos de la cantidad de ARNhc por kg del peso corporal, de 1 a 3 veces al día o cada 1 a 21 días.

La dosis del agente quimioterapéutico contra el cáncer existente puede variar dependiendo de factores, tales como un tipo de sustancia química como principio activo, la edad y el peso corporal de un paciente, y la gravedad de la enfermedad. El agente quimioterapéutico contra el cáncer existente se puede administrar a una sola dosis seleccionada apropiadamente del intervalo de 0,0001 mg a 1000 mg por kg del peso corporal, de 1 a 3 veces al día o cada 1 a 14 días. Cuando el agente quimioterapéutico contra el cáncer existente es Paclitaxel, por ejemplo, se puede administrar a una dosis diaria de 500 a 1000 mg por vía intraperitoneal o intravenosa cada 1 a 21 días. Cuando el agente quimioterapéutico contra el cáncer existente es un hidrato de sodio pemetrexed, se puede administrar a una dosis diaria de 500 a 1000 mg por vía intravenosa cada 1 a 21 días. Cuando el agente quimioterapéutico contra el cáncer existente es TS-1, que es un agente antitumoral oral 5-FU, se puede administrar 1 a 3 veces al día, todos los días o cada 2 o 3 días. El agente quimioterapéutico contra el cáncer existente se puede administrar a dosis y frecuencias menores cuando se usa en combinación con el agente antitumoral de la presente invención en comparación con un caso en el que se administra solo. Esto puede evitar o retrasar el desarrollo de efectos secundarios que pueden producirse por la administración de los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer existentes. Los ejemplos de efectos secundarios incluyen, pero sin limitación, supresión de médula ósea, anemia hemolítica, síndrome de coagulación intravascular diseminada, insuficiencia hepática fulminante, deshidratación, enteritis, neumonía intersticial, estomatitis, úlcera del tracto gastrointestinal, hemorragia del tracto gastrointestinal, perforación del tracto gastrointestinal, insuficiencia renal aguda, síndrome mucocutáneo ocular, necrosis epidérmica tóxica, trastorno psiconeurótico, pancreatitis aguda, rhabdomiólisis y anosmia.

La presente invención también se refiere a un método para usar en el tratamiento de metástasis peritoneales de cáncer pancreático mediante administración tópica usando el agente antitumoral de la presente invención. En el método de la presente invención, la vía de administración es la tópica y las dosificaciones del agente antitumoral de la presente invención y los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer existentes son como se describieron anteriormente.

Ejemplos

5 En lo sucesivo, la presente invención se describe con mayor detalle con referencia a los ejemplos a continuación, aunque la presente invención no se limita a estos ejemplos. Solo los ejemplos que divulgan una composición para usar en el tratamiento de metástasis peritoneal de cáncer de páncreas mediante administración tópica están dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Preparación de lipoplejo

10 Los reactivos descritos a continuación se usaron en el Ejemplo 1. Dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE): Nippon Fine Chemical Co., Ltd. 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC): Nippon Fine Chemical Co., Ltd. Cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamoniocetil)dietafolamina (DC-6-14): Pharmaron Etanol: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Cloruro de sodio: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

15 (ARNhc dirigido a TS)

20 El ARNhc dirigido a TS (denominado en lo sucesivo "TS-ARNhc") que tiene la secuencia dada a continuación se sintetizó basándose en un ARNhc conocido capaz de inhibir la expresión de TS que se ha confirmado que tiene efectos antitumorales (véase el documento WO 2012/161196).

TS-ARNhc: 5'-GUAACACCAUCGAUCAUGAUAGUGCUCUCCUGGUUGUCAUGAUCGAUGGUGUUAC UU-3' (SEQ ID NO: 8)

25 (1) Preparación de lipoplejo (nueva preparación) mediante el método de la presente invención

(1-1) Preparación de lipoplejo (es decir, nueva preparación (1)) a partir de un producto liofilizado de una mezcla lipídica

30 El Presome DF1 (una mezcla lipídica que comprende DOPE, DOPC y DC-6-14 en una relación molar de 3:2:5, fabricado por Nippon Fine Chemical Co., 100 mg) se pesó y se disolvió en 1,842 ml de etanol a temperatura ambiente para obtener una solución de una mezcla lipídica en etanol.

A 66,2 μ l de agua libre de ribonucleasa, se añadieron 3,8 μ l de TS-ARNhc 300 μ M para obtener una solución acuosa de TS-ARNhc.

35 Posteriormente, se añadieron gradualmente gota a gota 30 μ l de la solución de una mezcla lipídica en etanol a 70 μ l de la solución acuosa de TS-ARNhc con agitación lenta, para obtener una solución de lipoplejo en etanol/agua.

40 La solución resultante de lipoplejo en etanol/agua se congeló a -40 °C o menos y luego se liofilizó usando un liofilizador de vacío (LABCONCO FZ-4.5, Asahi Life Science Co., Ltd.).

Al producto liofilizado resultante, se añadieron 100 μ l de solución salina fisiológica preparada con agua libre de ribonucleasa (una solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9 % v/p), y la mezcla se agitó usando un PresentMixer2013 durante 10 segundos para obtener un lipoplejo (la cantidad de TS-ARNhc: 20 μ g/100 μ l).

45 En lo sucesivo, el lipoplejo así obtenido se indica como "nueva preparación (1)".

(1-2) Preparación de lipoplejo (nueva preparación (2)) a partir de polvos lipídicos de DOPE, DOPC y DC-6-14

50 Se pesaron polvos de DOPE (55,8 mg), DOPC (78,6 mg) y DC-6-14 (66,0 mg), se añadió 1 ml de etanol a cada uno, y las mezclas se calentaron luego a 40 °C para obtener soluciones que contenían DOPE 75 mM, DOPC 100 mM y DC-6-14 100 mM, respectivamente.

55 A 4,777 μ l de etanol, se añadieron 9,172 μ l de la solución DOPE 75 mM, 4,586 μ l de la solución DOPC 100 mM y 11,465 μ l de la solución DC-6-14 100 mM para obtener una solución de la mezcla lipídica en etanol que contiene DOPE, DOPC y DC-6-14 en una relación molar de 3:2:5.

Posteriormente, se añadieron gradualmente gota a gota 30 μ l de la solución de una mezcla lipídica en etanol a 70 μ l de la solución acuosa de TS-ARNhc con agitación lenta para obtener una solución de lipoplejo en etanol/agua.

60 La solución resultante de lipoplejo en etanol/agua se liofilizó de la misma manera que en (1-1), a esto se le añadió solución salina fisiológica preparada con agua libre de ribonucleasa, y la mezcla se agitó luego para obtener un lipoplejo (la cantidad de TS-ARNhc: 20 μ g/100 μ l).

65 En lo sucesivo, el lipoplejo así obtenido se indica como "nueva preparación (2)".

(2) Preparación de lipoplejo mediante una técnica conocida

5 Se pesaron polvos de DOPE (0,51 mg), DOPC (0,36 mg) y DC-6-14 (0,76 mg), y dichos polvos se mezclaron y disolvieron en 1,0 ml de una mezcla de ciclohexano/etanol (95 %/5 % (v/v)). Posteriormente, la solución resultante se liofilizó, se eliminaron ciclohexano y etanol, se añadieron 50 µl de solución salina fisiológica, la mezcla se agitó vigorosamente usando un mezclador vórtex durante 10 minutos para preparar una suspensión y se introdujeron en la misma 50 µl de una solución acuosa que contenía TS-ARNhc (0,4 µg/µl), para obtener un lipoplejo (la cantidad de TS-ARNhc: 20 µg/100 µl).

10 En lo sucesivo, un lipoplejo así obtenido se denomina "preparación convencional".

Ejemplo 2: Comparación de equivalencia de propiedades físicas de lipoplejos

15 Con el uso de un Zetasizer Nano ZS (Malvern), se midieron el diámetro de partícula (d. nm), el índice de polidispersidad (Pdl) y el potencial zeta (mV) de la nueva preparación (1) y la nueva preparación (2) obtenidas en el Ejemplo 1, así como de la preparación convencional.

Los resultados se muestran en la Figura 1.

20 Los resultados demuestran que no hay diferencias significativas en términos de propiedades físicas entre la preparación convencional obtenida mediante una técnica conocida, la nueva preparación (1) o la nueva preparación (2) obtenidas mediante el método de la presente invención y que el complejo previo obtenido mediante una técnica conocida no es diferente del complejo previo obtenido mediante el método de la presente invención en términos de propiedades físicas.

25 Ejemplo 3: Evaluación de la capacidad de retención de TS-ARNhc de lipoplejo

Los reactivos descritos a continuación se usaron en el Ejemplo 3.

Tris: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Ácido bórico: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

30 EDTA·2Na: Sigma-Aldrich Agarosa: Sigma-Aldrich

Bromuro de etidio (EtBr): Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

35 La nueva preparación (1), la nueva preparación (2) y la preparación convencional preparada en el Ejemplo 1 se evaluaron en términos de capacidad de retención de ARNhc.

40 Se pesaron Tris (5,4 g), ácido bórico (2,75 g) y EDTA·2Na (0,185 g), y se añadió agua destilada para ajustar la cantidad de la solución a 1 litro. Por lo tanto, se preparó tampón TBE. Se añadió tampón TBE (40 ml) a 0,4 g de agarosa, se disolvió completamente la agarosa mediante ebullición, se añadieron a la misma 4 µl de EtBr 1 mg/ml, se introdujo el resultante en una placa de gel y la temperatura volvió a la temperatura ambiente para preparar gel de agarosa al 1 %.

45 La placa de gel se montó en un aparato de electroforesis (PLUS-2, CIMA Biotech), la preparación convencional, la nueva preparación (1) y la nueva preparación (2) se diluyeron cada una 10 veces y se aplicaron en gel de agarosa, se añadió tampón TBE a un tanque electroforético, y luego se realizó la electroforesis a 100 V durante 15 minutos. Después, se observó la banda de TS-ARNhc usando un AE-9000N E-Graph (ATTO Corporation). La evaluación se realizó de la misma manera 1 día y 3 días después de la preparación de los lipoplejos.

Los resultados se muestran en la Figura 2.

50 Inmediatamente después de la producción de la preparación convencional, la nueva preparación (1) y la nueva preparación (2), no se observó ninguna banda en la misma posición que en el caso del TS-ARNhc libre. Es decir, sustancialmente no había TS-ARNhc libre en las muestras que contenían lipoplejo. Además, no se observó ninguna banda en la misma posición que en el caso de TS-ARNhc 3 días después de la producción. Por lo tanto, se confirmó que la preparación convencional, la nueva preparación (1) y la nueva preparación (2) podían retener TS-ARNhc 3 días después de su producción.

55 Los resultados demuestran que no existe una diferencia significativa en términos de la capacidad de retención de ARNhc entre el lipoplejo obtenido mediante una técnica convencional y el lipoplejo obtenido mediante el método de la presente invención.

60 Ejemplo 4: Evaluación de los efectos inhibidores de lipoplejo en el gen diana de un tumor mediante administración intraperitoneal (RT-PCR en tiempo real)

Los reactivos descritos a continuación se usaron en el Ejemplo 4.

Reactivos de transcripción inversa TaqMan®: Life Technologies

65 FastStart Universal Probe Master (ROX): Roche

Universal ProbeLibrary n.º 64: Roche

Universal ProbeLibrary n.º 60: Roche Cebador directo para ARNm de TS: Life Technologies

Secuencia de nucleótidos: 5'-CCC CTT CTT CTC TGG TGG A-3' (SEQ ID NO: 9)

Cebador inverso para ARNm de TS: Life Technologies Secuencia de nucleótidos: 5'-AGG AGT TGC TGT GGT TTA TCA AG-3' (SEQ ID NO: 10)

5 Cebador directo para ARNm de GAPDH: Life Technologies

Secuencia de nucleótidos: 5'-CTC TGC TCC TCC TGT TCG AC-3' (SEQ ID NO: 11)

Cebador inverso para ARNm de GAPDH: Life Technologies Secuencia de nucleótidos: 5'-ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC-3' (SEQ ID NO: 12)

10 La nueva preparación (1), la nueva preparación (2) y la preparación convencional preparadas en el Ejemplo 1 se evaluaron mediante RT-PCR en tiempo real en términos de efectos inhibidores en el gen diana del tumor.

Se cultivaron células humanas MKN-45 de cáncer gástrico (RIKEN, Japón) y se trasplantaron intraperitonealmente en ratones BALB/c nu/nu (5 semanas de edad, machos) a 5×10^6 células/ratón. Los pesos corporales de los ratones se determinaron el día del trasplante y 6 días después, y los ratones cuyo peso corporal había disminuido (es decir, los ratones en los que se considera que las células trasplantadas se injertaron) se sometieron al experimento como modelos de ratón para diseminación peritoneal de MKN45.

20 La preparación convencional, la nueva preparación (1) o la nueva preparación (2) se administraron por vía intraperitoneal a diferentes modelos de ratón de tal manera que se administrarían 20 µg de TS-ARNhc a cada ratón por día, y dicha administración se llevó a cabo tres veces en total (es decir, 7, 9 y 11 días después del trasplante celular). Se extrajeron los tumores de los modelos de ratón 13 días después del trasplante celular, se homogeneizaron los tumores con el uso de un Multi-beads shocker® (Yasui Kikai Corporation), y luego se extrajo el ARN con el uso de un Mini Kit RNeasy® (QIAGEN).

25 La concentración de ARN en el extracto de ARN resultante se midió usando NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific), el extracto se diluyó con agua libre de ribonucleasa para ajustar la concentración de ARN a 1 µg/7,7 µl, y luego se llevó a cabo la transcripción inversa con el uso de reactivos de transcripción inversa TaqMan® (a 16 °C durante 30 minutos, 42 °C durante 30 minutos y 85 °C durante 5 minutos).

30 A 5 µl de la solución de ADNc resultante, se añadieron 15 µl de la mezcla de PCR para TS o la mezcla de PCR para GAPDH descrita a continuación, RT-PCR en tiempo real (con un ciclo de 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante 10 minutos repitiéndose 40 veces, 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto) con el uso de StepOnePlus™ (Life Technologies). Luego se midieron el nivel de ARNm de TS y el nivel de ARNm de GAPDH.

35

Mezcla de PCR para TS (10 muestras)

ROX	100 µl
Sonda universal n.º 64	0,45 µl
Cebador directo para ARNm de TS	1,8 µl
Cebador inverso para ARNm de TS	1,8 µl
Agua libre de ribonucleasa	45,95 µl
Total	150 µl

Mezcla de PCR para GAPDH (10 muestras)

ROX	100 µl
Sonda universal n.º 60	0,45 µl
Cebador directo para ARNm de GAPDH	1,8 µl
Cebador inverso para ARNm de GAPDH	1,8 µl
Agua libre de ribonucleasa	45,95 µl
Total	150 µl

40 Los resultados se muestran en la Figura 3. En la Figura 3, el nivel de ARNm de TS medido mediante RT-PCR en tiempo real y corregido para el nivel de ARNm de GAPDH se indica como el "nivel de expresión de ARNm de TS" en relación con el nivel (es decir, 100 %) designado para el grupo de control de modelos de ratones a los que se les había administrado una solución de sacarosa al 9 % sin lipoplejo.

45 En todos los grupos sometidos a la administración de la preparación convencional, la nueva preparación (1) y la nueva

preparación (2), los niveles de expresión de ARNm de TS disminuyeron significativamente en aproximadamente un 30 %, en comparación con el grupo de control. Por lo tanto, se encontró que el lipoplejo obtenido mediante una técnica convencional y el lipoplejo obtenido mediante el método de la presente invención eran capaces de suprimir la expresión del gen diana del tumor que se había extendido al peritoneo en un grado significativo. También se encontró que no había habido una diferencia significativa en dichos efectos entre el lipoplejo obtenido mediante una técnica convencional y el lipoplejo obtenido mediante el método de la presente invención.

Ejemplo 5: Evaluación de los efectos inhibidores de lipoplejo en el gen diana de un tumor mediante administración intraperitoneal

(Sistemas de imagen *in vivo*: IVIS)

Los reactivos descritos a continuación se usaron en el Ejemplo 5.

Luciferina: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

PBS: Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.

(ARNhc dirigido a luciferasa (Luc))

El ARNhc dirigido a Luc (en lo sucesivo denominado "Luc-ARNhc") tiene la secuencia que se muestra a continuación. Luc-ARNhc: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAUAGUGCUCCUGGUUGUCGAAGUACUCAGCGUAAG UU-3' (SEQ ID NO: 13)

En el Ejemplo 5, se prepararon lipoplejos portadores de Luc-ARNhc con el uso de ARNhc dirigido a luciferasa (Luc-ARNhc) de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que se usó Luc-ARNhc en lugar de ARNhc, y los efectos inhibitorios de la nueva preparación (1), la nueva preparación (2) y la preparación convencional en el gen diana del tumor se evaluaron mediante IVIS.

Las células humanas de cáncer gástrico que expresan luciferasa NCI-N87 (NCI-N87-Luc, Summit Pharmaceuticals International Corporation) se cultivaron y se trasplantaron intraperitonealmente en ratones BALB/c nu/nu (5 semanas de edad, machos, Japón SLC, Inc.) a 4×10^6 células/ratón para preparar modelos de ratón para diseminación peritoneal de NCI-N87-Luc.

La preparación convencional, la nueva preparación (1) o la nueva preparación (2) se administraron por vía intraperitoneal a diferentes modelos de ratón de tal manera que se administrarían 20 μ g de Luc-ARNhc a cada ratón por día, y dicha administración se llevó a cabo cinco veces en total (es decir, 8, 11, 14, 17 y 20 días después del trasplante celular). La luciferina se disolvió con PBS a una concentración de 7,5 mg/ml, se administraron 10 μ l de luciferina por vía intraperitoneal 7, 10, 13, 16, 19 y 22 días después del trasplante celular, y se observó la actividad luciferasa del tumor usando IVIS (Xenogen, Alameda, CA, EE.UU.). Para el grupo de control se emplearon modelos de ratón a los que no se habían administrado lipoplejos, pero a los que se había añadido una solución de sacarosa al 9 %.

Con el uso de datos de imágenes que demuestran los resultados, se proporciona un gráfico que demuestra los resultados de cuantificación de la actividad luciferasa en la cavidad abdominal (Figura 4).

En el grupo de control, se observó un aumento en la actividad luciferasa con el transcurso del tiempo. Esto indica el crecimiento tumoral en la cavidad abdominal. En los grupos sometidos a administración intraperitoneal de la preparación convencional, la nueva preparación (1) y la nueva preparación (2) que portan Luc-ARNhc, se observó una disminución significativa en la actividad luciferasa después de la primera administración. Durante el experimento (hasta 22 días después del trasplante celular), la actividad luciferasa no aumentó nuevamente (Figura 4).

Si bien se usó Luc-ARNhc dirigido a luciferasa en el Ejemplo 5, sería poco probable que dicho Luc-ARNhc afectara el crecimiento del tumor. De hecho, los pesos tumorales de los grupos de ratones se midieron 24 días después del trasplante celular, y no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Por lo tanto, se encontró que la administración de lipoplejo portador de Luc-ARNhc inhibe selectivamente la actividad luciferasa del tumor. Los resultados demuestran que la actividad de TS-ARNhc del lipoplejo obtenido mediante una técnica convencional es la misma que la del nuevo lipoplejo de acuerdo con el método de la presente invención.

Ejemplo 6: Evaluación de los efectos terapéuticos de lipoplejo (nueva preparación (2)) en la diseminación peritoneal del cáncer de ovario mediante administración intraperitoneal

Se evaluaron los efectos terapéuticos del lipoplejo portador de TS-ARNhc (es decir, la nueva preparación (2)) preparada de la misma manera que en el Ejemplo 1 en la diseminación peritoneal del cáncer de ovario.

Las células humanas de cáncer de ovario que expresan luciferasa OVCAR-3 (OVCAR-3-luc, Pharmaron) se cultivaron y se trasplantaron intraperitonealmente en ratones BALB/c nu/nu (hembras de 6 a 8 semanas de edad, Beijing HFK BioTechnology Co., Ltd.) a $1,5 \times 10^7$ células/ratón para preparar modelos de ratón para la diseminación peritoneal de

OVCAR-3-luc.

5 En el Ejemplo 6, el lipoplejo (nueva preparación (2)), Paclitaxel (Taxol, Pharmaron), o el lipoplejo (nueva preparación (2)) en combinación con Paclitaxel se administraron a diferentes modelos de ratón. Se administró una solución de sacarosa al 9 % al grupo de control.

10 El lipoplejo (nueva preparación (2)) se administró intraperitonealmente a modelos de ratón de tal manera que se administrarían 20 µg de TS-ARNhc a cada ratón por día, y dicha administración se realizó cuatro veces en total (es decir, 8, 11, 14, y 17 días después del trasplante celular). Paclitaxel se administró por vía intraperitoneal al grupo relevante de modelos de ratón cuatro veces en total (es decir, 8, 11, 14, y 17 días después del trasplante celular) a 15 mg/kg.

15 La luciferina se disolvió con PBS a una concentración de 7,5 mg/ml, se administraron 10 µl de luciferina por vía intraperitoneal 7, 14, 21, y 26 días después del trasplante celular, y se observó la actividad luciferasa del tumor usando IVIS.

20 Los resultados se muestran en la Figura 5-1. Con el uso de los datos de imagen mostrados en la Figura 5-1, se proporciona un gráfico que demuestra los resultados de cuantificación de la actividad luciferasa en la cavidad abdominal (Figura 5-2) y un gráfico logarítmico de la misma (Figura 5-3).

25 En el grupo de control, se observó un aumento en la actividad luciferasa con el transcurso del tiempo. Esto indica crecimiento tumoral en la cavidad abdominal. En los grupos sometidos a administración intraperitoneal del lipoplejo portador de TS-ARNhc, se suprimió un aumento en la actividad luciferasa, en comparación con el grupo de control. Esto indica que el crecimiento tumoral se suprimió en la cavidad abdominal. Además, los mayores efectos inhibidores del crecimiento tumoral se observaron en el grupo sometido a administración de lipoplejo en combinación con Paclitaxel.

La Figura 5-4 muestra los períodos de supervivencia de los modelos de ratón.

30 En comparación con el grupo de control, se observaron efectos significativamente marcados que prolongan la vida en el grupo sometido a administración de lipoplejo en combinación con Paclitaxel.

35 La Figura 5-5 muestra los resultados de la medición mediante RT-PCR de un cambio en la concentración de TS-ARNhc en la sangre y la ascitis de modelos de ratón sometidos a administración del lipoplejo.

Los resultados demuestran una larga semivida de aproximadamente 8 horas en la ascitis, mientras que TS-ARNhc no se había filtrado a la sangre.

40 Ejemplo 7: Evaluación de los efectos terapéuticos de lipoplejo (nueva preparación (2)) en la diseminación peritoneal del cáncer de páncreas mediante administración intraperitoneal

Se evaluaron los efectos terapéuticos del lipoplejo portador de TS-ARNhc (es decir, la nueva preparación (2)) preparada de la misma manera que en el Ejemplo 1 en la diseminación peritoneal del cáncer de páncreas.

45 Las células humanas de cáncer de páncreas que expresan luciferasa PANC-1 (PANC-1-luc, Pharmaron) se cultivaron y se trasplantaron intraperitonealmente en ratones BALB/c nu/nu (hembras de 6 a 8 semanas de edad, Beijing HFK BioTechnology Co., Ltd.) a $1,0 \times 10^7$ células/ratón para preparar modelos de ratón para la diseminación peritoneal de PANC-1-luc.

50 En el Ejemplo 7, el lipoplejo (nueva preparación (2)), Paclitaxel (Taxol, Pharmaron), o el lipoplejo (nueva preparación (2)) en combinación con Paclitaxel se administraron a diferentes modelos de ratón. Se administró una solución de sacarosa al 9 % al grupo de control.

55 El lipoplejo (nueva preparación (2)) se administró intraperitonealmente a modelos de ratón de tal manera que se administrarían 20 µg de TS-ARNhc a cada ratón por día, y dicha administración se realizó cuatro veces en total (es decir, 8, 11, 14, y 17 días después del trasplante celular). Paclitaxel se administró por vía intraperitoneal al grupo relevante de modelos de ratón cuatro veces en total (es decir, 8, 11, 14, y 17 días después del trasplante celular) a 10 mg/kg.

60 La luciferina se disolvió con PBS a una concentración de 7,5 mg/ml, se administraron 10 µl de luciferina por vía intraperitoneal 7, 14, 21 y 25 días después del trasplante celular, y se observó la actividad luciferasa del tumor usando IVIS.

65 Se proporciona un gráfico que demuestra la actividad luciferasa en la cavidad abdominal cuantificada basándose en los datos de imagen obtenidos con el uso de IVIS (Figura 6-1) y un gráfico logarítmico del mismo (Figura 6-2).

En el grupo de control, se observó un aumento en la actividad luciferasa con el transcurso del tiempo. Esto indica crecimiento tumoral en la cavidad abdominal. En los grupos sometidos a la administración del lipoplejo (nueva preparación (2)), Paclitaxel (Taxol, Pharmaron), o el lipoplejo (nueva preparación (2)) en combinación con Paclitaxel, se suprimió un aumento en la actividad luciferasa, en comparación con el grupo de control. Esto indica que el crecimiento tumoral se suprimió en la cavidad abdominal. En particular, se observaron efectos marcados de supresión tumoral en el grupo sometido a administración de Paclitaxel y en el grupo sometido a administración de lipoplejo en combinación con Paclitaxel.

La Figura 6-3 muestra los períodos de supervivencia de los modelos de ratón.

En comparación con el grupo de control, se observaron efectos significativamente marcados que prolongan la vida en el grupo sometido a administración de lipoplejo en combinación con Paclitaxel.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, los lipoplejos se pueden producir con el uso exclusivo de un disolvente que tiene alta biotolerancia sin el uso de un disolvente orgánico que sea altamente tóxico o altamente explosivo, tal como el cloroformo o el ciclohexano. Por consiguiente, la presente invención es óptima para métodos de producción industrial para preparaciones farmacéuticas. En entornos médicos, tal como un servicio de medicina ambulatoria de un hospital, se pueden evitar procesos complicados para la preparación de fármacos que comprenden preparar por separado dispersiones de agua de mezclas lipídicas y soluciones acuosas de moléculas de ARNi y luego mezclarlas. Además, se puede preparar un líquido para administrar a un paciente mediante la adición de solución salina fisiológica o un líquido de hidratos de carbono al polvo de lipoplejo y la agitación suave de la mezcla. Por consiguiente, el trabajo y el coste necesarios para la preparación de fármacos en un servicio de medicina ambulatoria de un hospital se pueden reducir en gran medida.

Además, se realiza una administración tópica que es adecuada para un propósito de administración dado, tal como administración intraperitoneal para pacientes con metástasis peritoneal de cáncer pancreático (es decir, un estado cerca de la etapa final del cáncer relevante). Por lo tanto, se pueden administrar moléculas de ARNi de manera eficaz a la célula tumoral diana, y el crecimiento tumoral se puede inhibir de manera eficaz. Se espera que la presente invención haga contribuciones significativas en el campo de la administración de fármacos y el tratamiento del cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Delta-Fly Pharma, Inc.

<120> Un nuevo método para producir un liposoma para administración local y un agente antitumoral con el liposoma

<130> PH-6198-PCT

<150> JP 2014-221062

<151> 30/10/2014

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 1

guaacaccau cgaucauga 19

<210> 2

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

ES 2 809 460 T3

	<400> 2 ucaugaucga ugguguuac	19
5	<210> 3 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido sintético	
15	<400> 3 gaaucacagag auauggaau	19
20	<210> 4 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido sintético	
30	<400> 4 auuccauauc ucuguauuc	19
35	<210> 5 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido sintético	
45	<400> 5 cgaucaugau guagagugu	19
50	<210> 6 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido sintético	
60	<400> 6 acacucuaca ucaugaucg	19
65	<210> 7 <211> 15 <212> ARN <213> Artificial	
70	<220> <223> oligonucleótido sintético	
75	<400> 7 uagugcuccu gguug	15
80	<210> 8 <211> 55 <212> ARN <213> Artificial	
85	<220> <223> oligonucleótido sintético	

ES 2 809 460 T3

<400> 8
 gaaacaccau cgaucaugau agugcuccug guugucauga ucgauggugu uacuu 55

5 <210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 9
 ccccttctc tctggtgga 19

15 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 10
 aggagttgct gtggtttatc aag 23

25 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 11
 ctctgctcct cctgttcgac 20

35 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> cebador

<400> 12
 acgaccaaat ccggtgactc 20

45 <210> 13
 <211> 55
 <212> ARN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 13
 cuuacgcuga guacuucgau agugcuccug guugucgaag uacucagcgu aaguu 55

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un lipoplejo que comprende dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina, un lípido catiónico y moléculas de ARNi, que comprende las etapas de:
- 5 (a) disolver dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina y un lípido catiónico en etanol, en donde la fosfatidilcolina es 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC), palmitoil-oeoil fosfatidilcolina (POPC), o 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfolina (DEPC), y en donde el lípido catiónico es cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dietanolamina (DC-6-14);
- 10 (b) añadir la solución de alcohol obtenida en (a) gota a gota a una solución de moléculas de ARNi en agua con agitación; y
- (c) liofilizar la solución obtenida en (b).
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fosfatidilcolina es DOPC.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa (a) comprende disolver y mezclar DOPE, DOPC y DC-6-14 en etanol.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además la etapa (d) de mezclar en un tampón el producto liofilizado obtenido en la etapa (c).
5. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de metástasis peritoneal de cáncer de páncreas mediante administración tópica, en donde la composición comprende un lipoplejo que consiste en dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina, un lípido catiónico y ARN de horquilla corta (ARNhc) capaz de inhibir la expresión de timidilato sintasa a través de ARNi (TS-ARNhc),
- 25 en donde la fosfatidilcolina es 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC), palmitoil-oeoil fosfatidilcolina (POPC), o 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfolina (DEPC), y en donde el lípido catiónico es cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonioacetil)dietanolamina (DC-6-14).
6. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la fosfatidilcolina es DOPC.
7. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la mezcla lipídica consiste en DOPE, DOPC y DC-6-14.
8. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende DOPE, DOPC y DC-6-14 en una relación molar de 3:2:5.
9. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde el ARNhc consiste en la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 8.
10. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, que se usa en combinación con un agente quimioterapéutico contra el cáncer.
11. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde el lipoplejo se produce mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
12. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, que es una formulación liofilizada, y en donde la formación liofilizada se mezcla con un tampón antes de la administración tópica al paciente.
13. Un producto combinado para usar en administración tópica dirigido al tratamiento de metástasis peritoneal de un cáncer de páncreas, que comprende la composición farmacéutica para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12 y un agente quimioterapéutico contra el cáncer.
14. El producto combinado para usar de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el agente quimioterapéutico contra el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un agente antitumoral que tiene acción inhibitoria de la despolimerización de microtúbulos, un derivado de desoxicitidina y un agente antitumoral que tiene acción inhibitoria de TS.
15. El producto combinado para usar de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde el agente quimioterapéutico contra el cáncer es Paclitaxel.

Fig. 1

Muestra	Diámetro de partícula (nm)	Índice de polidispersidad	Potencial zeta (mV)
Preparación convencional	488,9 ± 73,7	0,484 ± 0,100	33,3 ± 2,2
Nueva preparación (1)	623,4 ± 55,9	0,548 ± 0,034	36,2 ± 2,5
Nueva preparación (2)	651,5 ± 66,5	0,529 ± 0,014	34,7 ± 1,2

Fig. 2

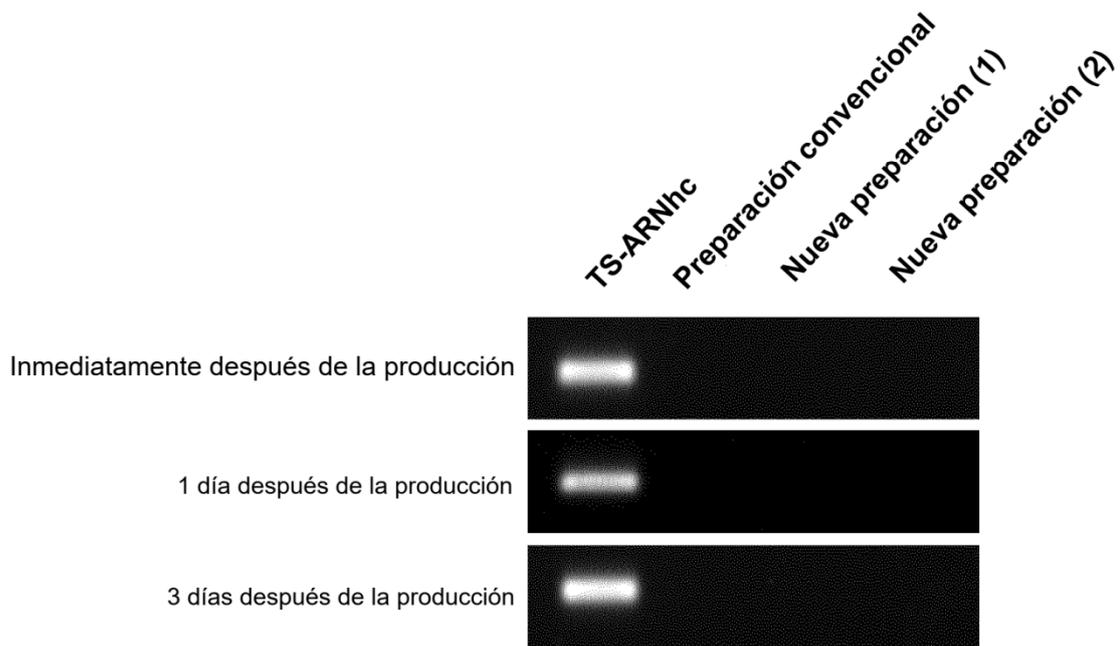


Fig. 3

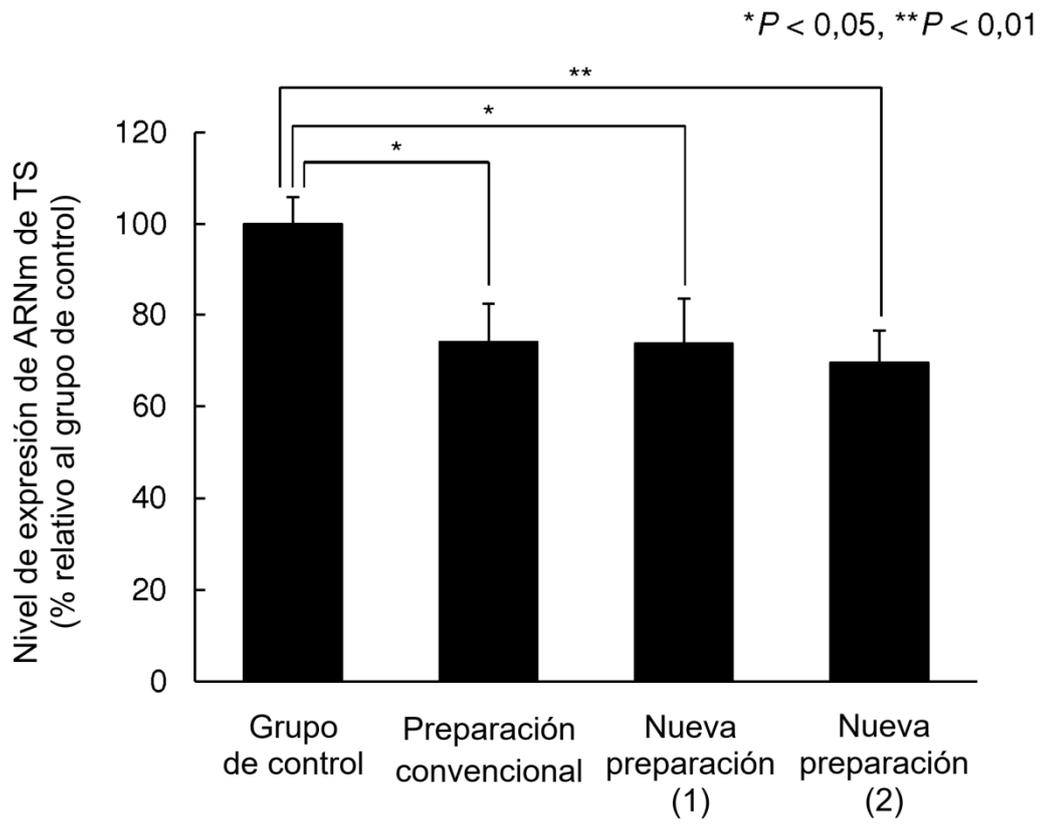


Fig. 4

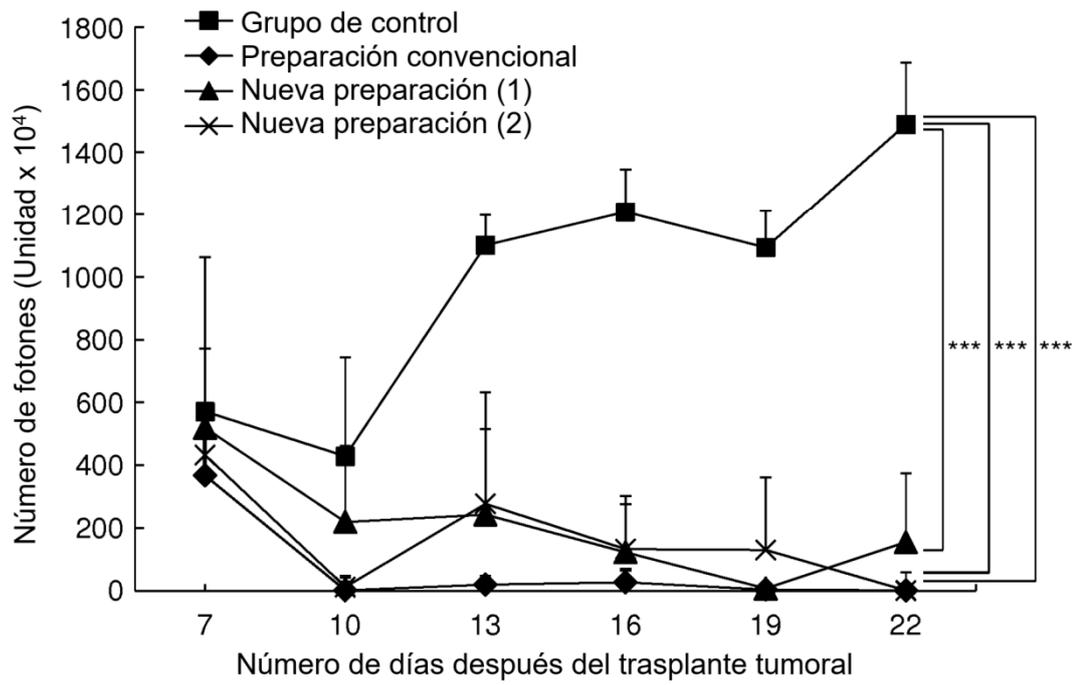


Fig. 5-1

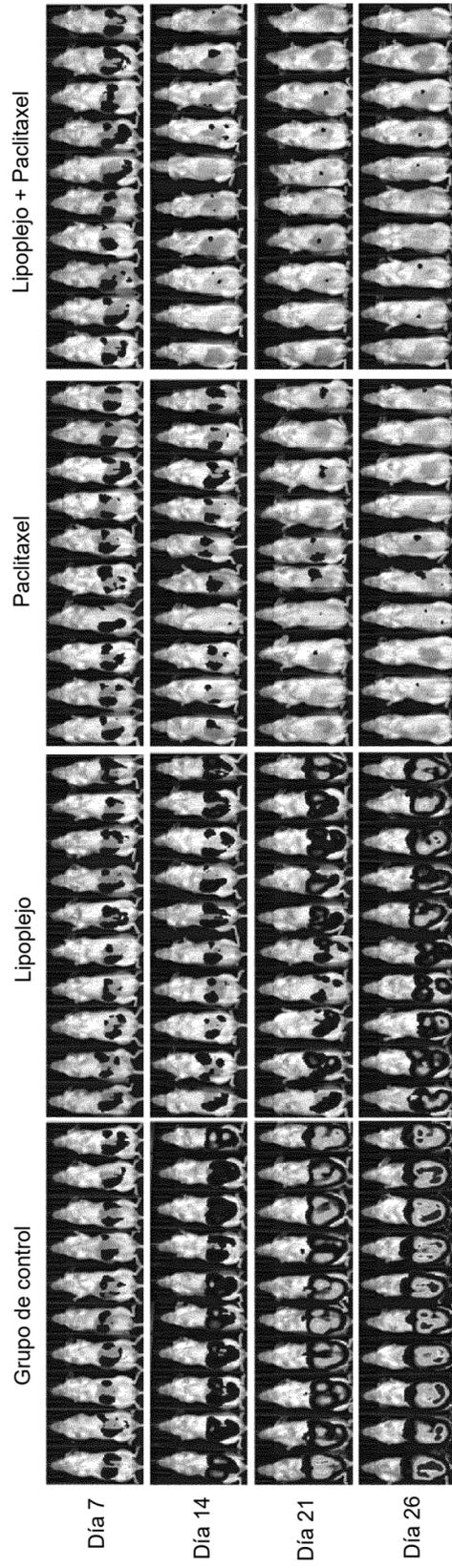


Fig. 5-2

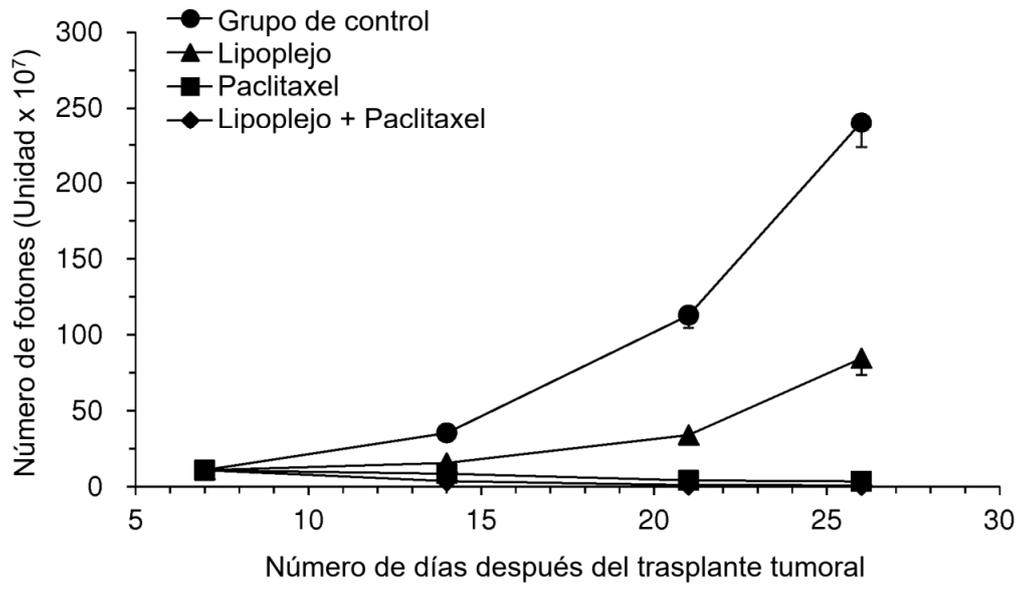


Fig. 5-3

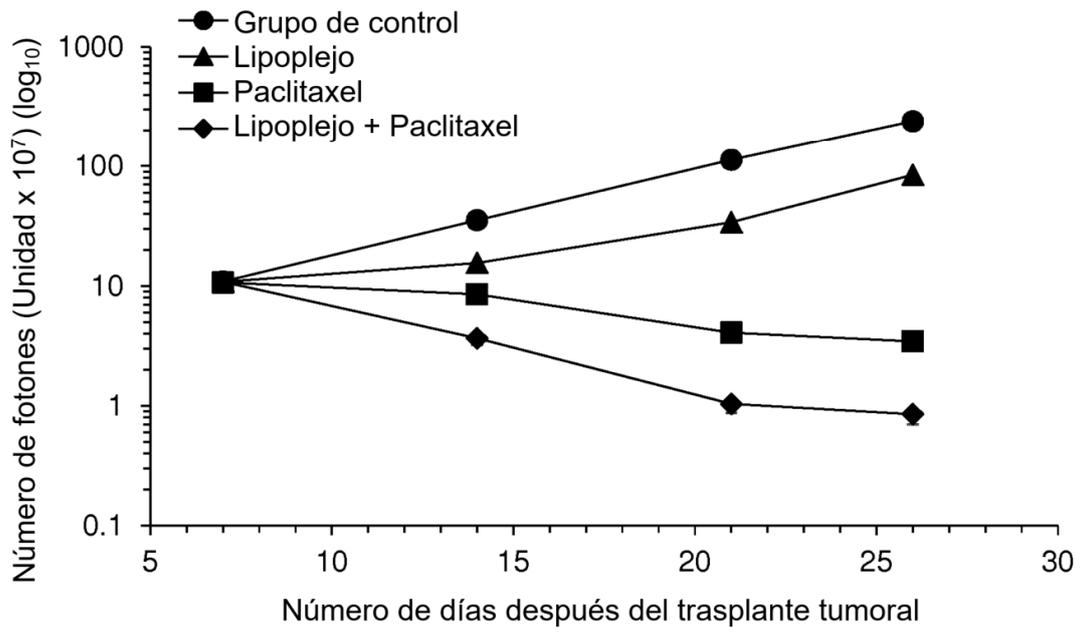
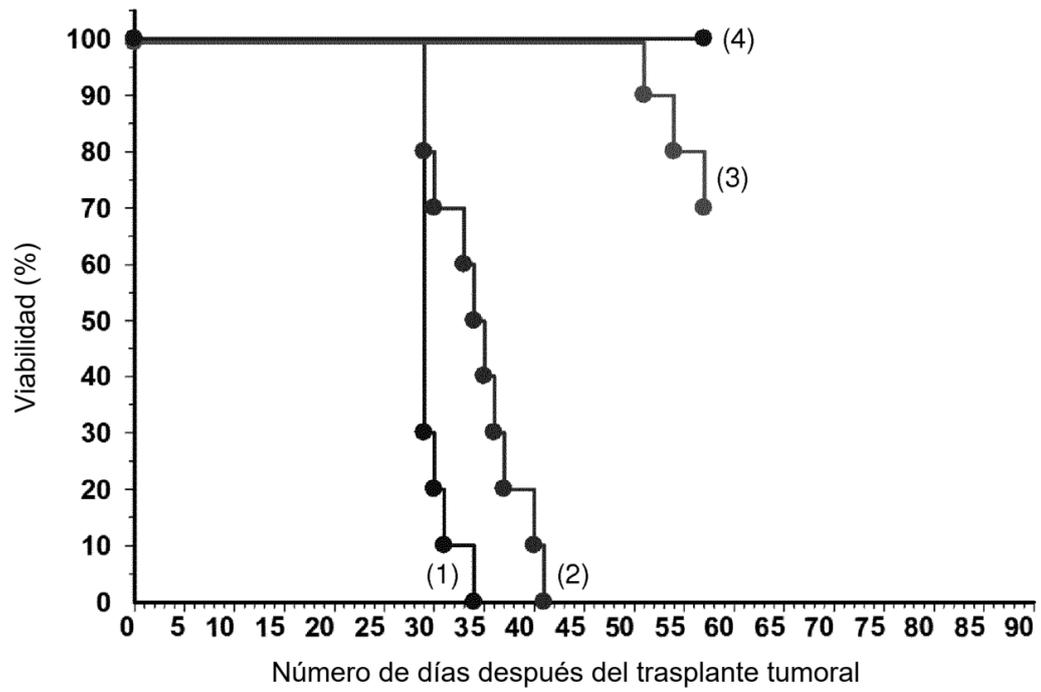


Fig. 5-4



- (1) Grupo de control
- (2) Lipoplejo
- (3) Paclitaxel
- (4) Lipoplejo + Paclitaxel

Fig. 5-5

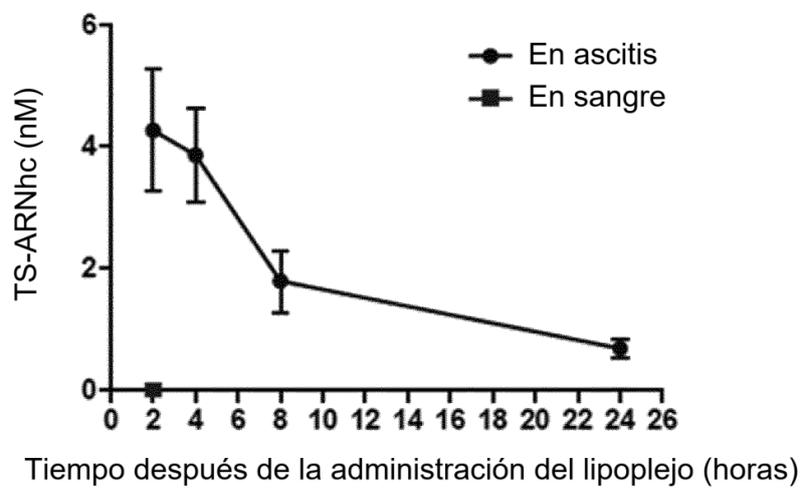


Fig. 6-1

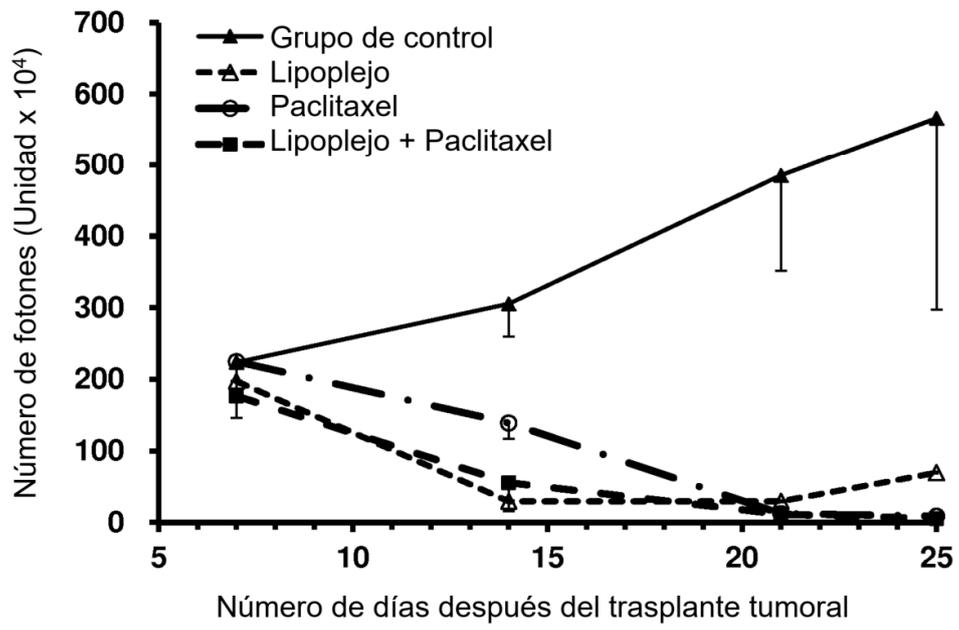


Fig. 6-2

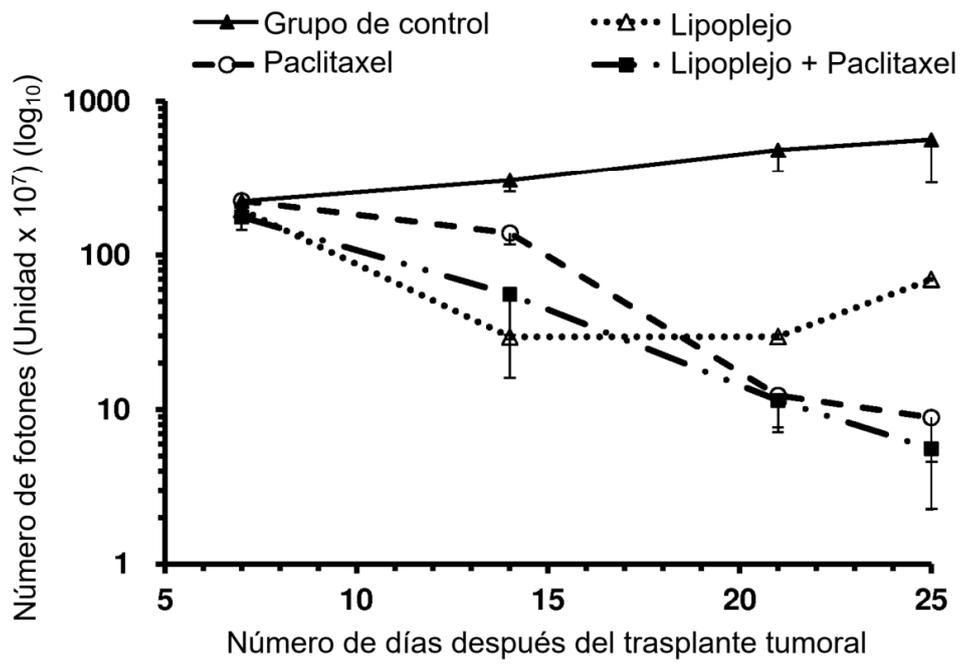
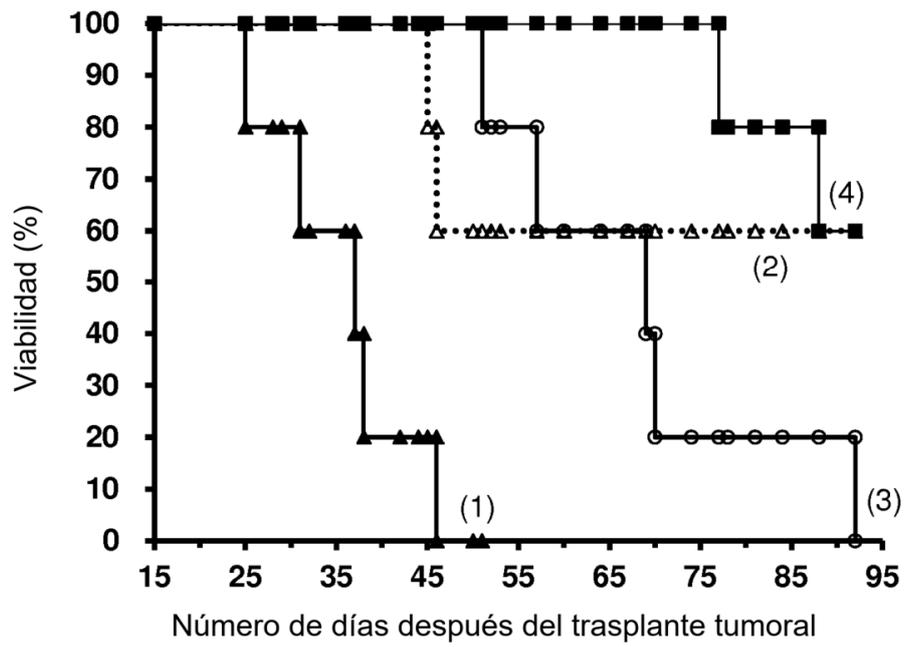


Fig. 6-3



- (1) Grupo de control
- (2) Lipoplejo
- (3) Paclitaxel
- (4) Lipoplejo + Paclitaxel