

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 059**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127	(2006.01)
A61K 31/663	(2006.01)
A61K 31/704	(2006.01)
A61K 38/20	(2006.01)
A61K 35/15	(2015.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61K 35/17	(2015.01)
A61K 47/55	(2007.01)
A61K 47/69	(2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2012 PCT/IL2012/050249**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13008240**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2012 E 12746128 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 2731591**

54 Título: **Liposomas que encapsulan conjuntamente un bifosfonato y un agente anfipático**

30 Prioridad:

13.07.2011 US 201161507325 P
14.07.2011 US 201161507821 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.04.2021

73 Titular/es:

YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD. (33.3%)
Hi-Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat Ram
91390 Jerusalem, IL;
SHAARE ZEDEK SCIENTIFIC LIMITED (33.3%) y KING'S COLLEGE LONDON (33.3%)

72 Inventor/es:

GABIZON, ALBERTO, A.;
BARENHOLZ, YECHEZKEL;
SHMEEDA, HILARY;
MAHER, JOHN y
PARENTE PEREIRA, ANA CATARINA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 819 059 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

Liposomas que encapsulan conjuntamente un bifosfonato y un agente anfipático

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a liposomas que encapsulan agentes activos y usos de los mismos en terapia.

10 Listado de referencias

El siguiente listado de referencias se considera pertinente para describir el estado de la técnica en el campo de la invención.

15 (1) Green JR Bisphosphonates: Preclinical Review, *Oncologist* 8 (Suplemento 4): 3-13, 2004;

(2) Neville-Webbe HL, Gnant M, Coleman RE. Potential anticancer properties of bisphosphonates. *Semin Oncol* 37 (Suplemento 1): S53-65, 2010;

20 (3) Caraglia M, Santini D, Marra M, Vincenzi B, Tonini G, Budillon A. Emerging anti-cancer molecular Mechanisms of aminobisphosphonates. *Endocr Relat Cancer* 13(1): 7-26, 2006;

(4) Goto S, Noguchi A, Jinguji H, Takahara M. The therapeutic potential of immuno-cell therapy of cancer in combination with aminobisphosphonates. *AntiCancer Research* 26: 3989-3996 (2006);

25 (5) Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2007/0218116;

(6) Hilary Shmeeda, Yasmine Amitay, Jenny Gorin, Dina Tzemach, Lidia Mak, Joerge Ogorka, Saran Kumar, J. Allen Zhang, Alberto Gabizon in *Journal of Controlled Release* 146: 76-83 (2010);

30 (7) Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2004/0161457.

Antecedentes de la invención

35 Los liposomas han generado un gran interés como vehículos de administración de fármacos. En particular, se están investigando constantemente por su capacidad para mejorar la administración de agentes quimioterapéuticos a los tumores, en un esfuerzo por aumentar la eficacia terapéutica y disminuir la toxicidad para las células normales. Como resultado, varios agentes quimioterapéuticos liposómicos están ahora disponibles en la clínica. STEALTH, un sistema liposómico recubierto con polietilenglicol, evita la absorción por parte del sistema reticuloendotelial, prolongando el tiempo de circulación de los liposomas y mejorando la administración del fármaco al tumor mientras que, en general, disminuye la toxicidad. Un fármaco basado en STEALTH aprobado por la FDA es el sulfato de doxorubicina liposómico PEGilado (Doxil/Caelyx).

45 Un grupo de fármacos que ha atraído recientemente un interés considerable en la medicina del cáncer son los bifosfonatos. Los bifosfonatos se utilizan principalmente para aumentar la densidad ósea y reducir el riesgo de fractura en pacientes con osteoporosis, para ralentizar el recambio óseo en pacientes con enfermedad ósea de Paget y para tratar metástasis óseas y normalizar los niveles elevados de calcio en sangre en pacientes con cáncer [Green JR Biophosphonates: preclinical review, *Oncologist* 8 (Suplemento 4) 3-13, 2004]. También se ha descubierto que el ácido zoledrónico y otros bifosfonatos que contienen N interfieren con procesos críticos en la señalización celular y el crecimiento a concentraciones nanomolares y actualmente se están evaluando para su uso en terapias combinadas para diversas aplicaciones antitumorales independientemente de las metástasis óseas [Neville-Webbe HL, Gnant M, Coleman RE. Potential anticancer properties of bisphosphonates. *Semin Oncol* 37 (Suplemento 1): S53-65, 2010]. Además del efecto antitumoral directo, los efectos antiangiogénicos [Caraglia M, Santini D, Marra M, Vincenzi B, Tonini G, Budillon A. Emerging anti-cancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates. *Endocr Relat Cancer* 13 (1): 7-26, 2006] y también se han demostrado efectos inmunológicos que pueden mediar efectos antitumorales indirectos [Goto S, Noguchi A, Jinguji H, Takahara M. The therapeutic potential of immuno-cell therapy of cancer in combination with aminobisphosphonates. *AntiCancer Research* 26: 3989-3996, 2006].

60 Sin embargo, los bifosfonatos se eliminan rápidamente del plasma por los riñones y, aparte del hueso, tienen una permeabilidad celular muy baja y una penetración tisular mínima, lo que limita sustancialmente su eficacia antitumoral.

65 Se han descrito formulaciones de bifosfonatos-liposomas, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No 2007/0218116 que describe un procedimiento para tratar o prevenir el crecimiento tumoral y la metástasis mediante la administración de bifosfonatos liposómicos. Además, también se describió la administración de ácido zoledrónico encapsulado en un liposoma con folato de direccionamiento que resultó en una

potente actividad citotóxica *in vitro* en las células tumorales [Hilary Shmeeda, Yasmine Amitay, Jenny Gorin, Dina Tzemach, Lidia Mak, Joerge Ogorka, Saran Kumar, J Allen Zhang, Alberto Gabizon en Journal of Controlled Release 146 (2010) 76-83].

5 La publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2004/0161457 describe un procedimiento para administrar un compuesto terapéutico encapsulado en liposomas a células cancerosas resistentes a múltiples fármacos. Este procedimiento también incluye un ligando de folato unido covalentemente al portador del liposoma.

10 Shmeeda H. et al., (Journal of Controlled Release vol 146 (1) (2010) describe liposomas estables que comprenden DPPG o DSPG en combinación con colesterol.

Epstein H. et al., (Liposome Technology: Entrapment of Drugs and Other Materials into Liposomes (Informa) 2007) describe bifosfonatos liposómicos para el tratamiento de la reestenosis.

15 Dow S.W., (Citado en Internet en octubre de 2012) divulga bifosfonatos en pequeños liposomas para inyección en el tratamiento de histiocitosis maligna captada por macrófagos.

20 El documento WO2010/143193 (Yissum Res Dev Co.) describe liposomas que comprenden HSPE y DSPE en combinación con o sin alendronato que encapsula colesterol en combinación con histidina 15 mM a pH 7,0 en presencia de dextrosa.

Carl H. June (Journal of Clinical Investigation vol 117 (6) 2007) describe la terapia de células T adoptivas para el cáncer en la clínica.

25 **Sumario de la invención**

De acuerdo con el primero de sus aspectos, la presente divulgación proporciona liposomas que comprenden una membrana y una fase de agua intraliposómica acuosa, comprendiendo la membrana al menos un lípido formador de liposomas y la fase de agua intraliposómica acuosa comprende una sal de un bifosfonato y un agente anfipático de base débil, que es doxorubicina como se define en las reivindicaciones.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de co-encapsulación en un mismo liposoma de un bifosfonato y doxorubicina como un agente anfipático de base débil, comprendiendo el procedimiento:

- proporcionar una suspensión de liposomas que comprende una membrana y una fase de agua intraliposómica acuosa, comprendiendo la membrana al menos un lípido formador de liposomas y la fase de agua intraliposómica acuosa que comprende encapsulado en la misma, un bifosfonato;
- incubar los liposomas que encapsulan el bifosfonato con una cantidad de un agente anfipático de base débil para permitir la co-encapsulación del bifosfonato y el agente anfipático de base débil con lo que se forma una sal entre el bifosfonato y el agente anfipático de base débil.

De acuerdo con aún un tercio de sus aspectos, la presente divulgación proporciona los liposomas para su uso en el tratamiento de una afección patológica, por ejemplo, enfermedad o trastorno proliferativo.

De acuerdo con una quinta parte de sus aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona el uso de los liposomas como se define, para la preparación de una composición farmacéutica.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento que comprende administrar a un sujeto una cantidad de liposomas tal como se define, en combinación con una cantidad de células inmunitarias tales como células T $\gamma\delta$, proporcionando la combinación un efecto terapéutico que es mayor que el efecto obtenido con el tratamiento con solo los liposomas que encapsulan la sal que comprende dicho bifosfonato y base anfipática débil.

Finalmente, la presente divulgación proporciona un empaque que comprende una primera composición que comprende liposomas como se define y una segunda composición que comprende células inmunes, tales como células T $\gamma\delta$, e instrucciones para el uso combinado de la primera y segunda composición para el tratamiento de un sujeto, proporcionando el uso combinado un efecto terapéutico que es mayor que el efecto obtenido sólo con dichos liposomas.

60 **Breve descripción de los dibujos**

Para comprender la invención y ver cómo se puede llevar a cabo en la práctica, a continuación se describirán realizaciones, a modo de ejemplo no limitativo únicamente, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

65

Las **Figuras 1A-1B** son imágenes de microscopía electrónica de transmisión criogénica (Cryo-TEM) antes (**Figura 1A**) y después (**Figura 1B**) de la carga de doxorubicina (formulación L-ALD/DOX también conocida como alendronato de doxorubicina liposómico PEGilado, PLAD) que muestran en la Figura 2B vesículas esféricas con sal precipitada de doxorubicina-alendronato (formaciones en forma de varilla) en la fase acuosa interior.

Las **Figuras 2A-2B** son gráficos de separación cromatográfica, que muestran que el alendronato (ALD) se eluyó con las fracciones de liposomas (#5 - #7), mientras que las fracciones posteriores (#9 - #12), en las que se encuentran proteínas y moléculas pequeñas, contenían una cantidad insignificante de fármaco libre (**Figura 2A**) y que la doxorubicina (DOX) se eluyó con las fracciones de liposomas (#5 - #7) y las fracciones posteriores (#9 - #12) contenían cantidades insignificantes de fármaco libre (Figura 2B); y las **Figuras 2C-2D** son gráficos de separación cromatográfica basados en mediciones espectrofotométricas de doxorubicina a 480 nm que demuestran la estabilidad del L(liposómico)-ALD/DOX después de 2 horas (**Figura 2C**) y 24 horas (**Figura 2D**) de exposición al tampón (DB) o plasma humano fresco congelado (FFP), y que muestran una retención completa del liposoma de DOX por separación cromatográfica de los fármacos encapsulados conjuntamente (fracciones #5-7) de cualquier fármaco libre o unido a proteínas (fracciones #9-12).

Las **Figuras 3A-3D** son estudios de captación celular *in vitro* (**Figura 3A**) y de citotoxicidad (Figuras 3B-3D) de agentes libres (DOX y ALD), Doxil (sulfato de doxorubicina liposómica), ALD liposómico (L-ALD) y ALD y DOX liposómicos (L-ALD/DOX) en células cancerosas, específicamente, la **Figura 3A** muestra una captación celular baja igual por las células de carcinoma de cabeza y cuello humanas KB de DOX cuando se comparan Doxil y L-ALD/DOX; las **Figuras 3B-3D** muestran, respectivamente, la citotoxicidad *in vitro* de L-ALD/DOX en comparación con la de Doxil en células KB, células de carcinoma gástrico humanas N87 y células de carcinoma de ovario humanas IGROV.

Las **Figuras 4A-4C** muestran la farmacocinética de L-ALD/DOX basada en la concentración de doxorubicina en plasma, la **Figura 4A** demuestra la farmacocinética de L-ALD/DOX en muestras de sangre que se recogieron a las 3 horas, 24 horas y 48 horas; y las **Figuras 4B y 4C** muestran una comparación de los niveles en plasma de doxorubicina 24 horas después de la inyección *iv* ya sea con una doxorubicina liposómica comercial (Doxil) o la co-encapsulación L-ALD/DOX ("**L-BP-DOX**"); las barras muestran que los niveles en plasma de doxorubicina son similares para L-ALD/DOX ("**L-BP-DOX**") y para Doxil, lo que indica que L-ALD/DOX ("**L-BP-DOX**") permanece largo tiempo en circulación (20 % de la dosis inyectada a las 24 horas) y es tan estable *in vivo* como el Doxil alternativo comercialmente disponible.

Las **Figuras 5A-5D** presentan resultados de estudios *in vivo* con células tumorales de pulmón de ratón resistentes a doxorubicina, M109R; la **Figura 5A** es un gráfico que demuestra una mayor actividad antitumoral de L-ALD/DOX en células tumorales M109R en comparación con Doxil; las **Figuras 5B-5D** son gráficos que muestran las curvas de crecimiento de tumores individuales en el modelo M109R, a partir del cual se forma la **Figura 5A**, con la **Figura 5B** mostrando curvas individuales para ratones no tratados, la **Figura 5C** mostrando las curvas para ratones tratados con Doxil y la **Figura 5D** mostrando las curvas para ratones tratados con L-ALD/DOX.

La **Figura 6** compara el efecto de citotoxicidad de las diversas formulaciones liposómicas con folato de direccionamiento (FT): FT-Doxil, FT-L-ALD y FT-L-ALD/DOX, probadas en células KB-HiFR (carcinoma humano con alta expresión del receptor de folato); el gráfico muestra que FT-L-ALD/DOX mostró mayor citotoxicidad en la línea celular KB-HiFR que FT-Doxil mientras que FT-L-ALD no tuvo actividad significativa.

La **Figura 7** demuestra la captación comparativa de doxorubicina en células KB-HiFR incubadas con DOX libre, Doxil, FT-Doxil y FT-L-ALD/DOX y L-ALD/DOX no dirigido. La captación de Dox administrada con folato de direccionamiento (FT) es mayor que la de las formulaciones dirigidas, sin embargo, FT-L-ALD/DOX no aumenta el suministro del fármaco a las células tumorales sobre FT-Doxil y no puede explicar su mayor citotoxicidad como se observa en la Figura 6.

Las **Figuras 8A-8D** presentan los niveles de expresión de folato y el efecto de diversas formulaciones sobre células de cáncer de mama MDA-MB-231 en presencia o ausencia de células T $\gamma\delta$; específicamente, la **Figura 8A** proporciona citometría de flujo de los niveles de expresión de folato en estas células de cáncer de mama utilizando anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína humana de unión a folato (fuente ABCAM) y un anticuerpo secundario de cabra anti-PE de ratón y las **Figuras 8B-8D** proporcionan imágenes de células teñidas con cristal violeta para mostrar el efecto de doxorubicina + alendronato liposómico (L-ALD/DOX, **Figura 7B**), Doxil (**Figura 8C**) o doxorubicina + alendronato liposómico con folato de direccionamiento (FT-ALD/DOX, **Figura 8D**), en presencia de Células T $\gamma\delta$ (células T + $\gamma\delta$) o ausencia de células T $\gamma\delta$ (células T - $\gamma\delta$).

Las **Figuras 9A-9D** presentan los niveles de expresión de folato y el efecto de diversas formulaciones en células de cáncer de mama ZR-75 en presencia o ausencia de Células T $\gamma\delta$; Específicamente, la **Figura 9A** proporciona citometría de flujo de los niveles de expresión de folato en estas células de cáncer de mama usando anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína de unión a folato humano (fuente ABCAM) y un anticuerpo secundario de

cabra anti-PE de ratón y las **Figuras 9B-9D** proporcionan imágenes de células teñidas con violeta cristal para mostrar el efecto de la doxorubicina + alendronato liposómico (**PLAD, Figura 9B**), Doxil (**Figura 9C**) o doxorubicina + alendronato liposómico con folato de direccionamiento (**FT-PLAD, Figura 9D**), en presencia de células T $\gamma\delta$ (**Células T + $\gamma\delta$**) o ausencia de células T $\gamma\delta$ (**células T - $\gamma\delta$**).

Las **Figuras 10A-10D** presentan los niveles de expresión de folato y el efecto de diversas formulaciones sobre células de cáncer de mama BT20 en presencia o ausencia de Células T $\gamma\delta$; Específicamente, la **Figura 10A** proporciona citometría de flujo de los niveles de expresión de folato en estas células de cáncer de mama utilizando anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína de unión a folato humano (fuente ABCAM) y un anticuerpo secundario de cabra anti-PE de ratón y las **Figuras 10B-10D** proporcionan imágenes de células teñidas con violeta cristal para mostrar el efecto de la doxorubicina + alendronato liposómico (**PLAD, Figura 10B**), Doxil (**Figura 10C**) o doxorubicina + alendronato liposómico con folato de direccionamiento (**FT-PLAD, Figura 10D**), en presencia de células T $\gamma\delta$ (**Células T + $\gamma\delta$**) o ausencia de células T $\gamma\delta$ (**células T - $\gamma\delta$**).

La **Figura 11** es un gráfico de barras que muestra por análisis de citometría de flujo el nivel de Anexina V FITC (BD) en células KG-1, una línea celular humana de leucemia mieloide aguda (AML), midiéndose la muerte de células tumorales analizando células PKH26+Anexina V+, tratando las células sin alendronato (**sin fármaco ni liposomas presentes**), sin fármaco (blanco) liposomas Stealth (Stealth: liposomas sin fármaco), alendronato (20 $\mu\text{g/ml}$, **alendronato libre**), liposomas encapsulantes conjuntos de alendronato y doxorubicina (20 $\mu\text{g/ml}$, **PLAD**), liposomas con folato de direccionamiento que encapsulan conjuntamente alendronato y doxorubicina (20 $\mu\text{g/ml}$, **PLAD-FT**) y Doxil (13,3 $\mu\text{g/ml}$, **Doxil**), seguido de incubación con células T $\gamma\delta$, en una proporción de 1 célula tumoral a 1 célula T (■), 1 célula tumoral por 5 células T (■) o sin células T $\gamma\delta$ (■). Además, también se administraron 100 U/ml de IL-2.

Descripción detallada de las realizaciones

La presente divulgación se basa en el nuevo hallazgo de que es posible co-encapsular en el mismo liposoma dos fármacos activos (i) un bifosfonato que es aniónico y está cargado negativamente en un amplio intervalo de pH (probablemente debido al bajo pKa de sus fosfatos y por lo tanto impermeable a la membrana) y (ii) un agente anfipático de base débil (AWB); la carga de los dos fármacos activos forma una sal entre ellos con una alta relación mol:mol de cada fármaco con respecto al lípido o lípidos que forman los liposomas.

La presente divulgación también se basa en el hallazgo de que la fuerza impulsora para la carga del agente AWB doxorubicina (DOX) es un gradiente de bifosfonato de amonio transmembrana obtenido por encapsulación pasiva de bifosfonato de amonio. Sin estar limitado por la teoría, se supone que tras la carga de AWB, el anión bifosfonato actúa como contraión del AWB, lo que conduce a la organización del agente AWB doxorubicina (DOX) en la fase acuosa intraliposoma de una manera diferente a la obtenida en presencia de sulfato como contraión (cuando se usa sulfato de amonio). Además, el sulfato es básicamente un excipiente y no un agente activo.

La presente divulgación se basa además en el hallazgo de que el bifosfonato co-encapsulado y el agente AWB doxorubicina (DOX) forman juntos una sal que permite la retención alta y química y físicamente estable (por ejemplo, sin fugas significativas) de los dos agentes en el liposoma.

Además, la invención se basa en el hallazgo de que, debido a la manera de cargar los dos fármacos activos, el bifosfonato se carga en forma de sal (por ejemplo, bifosfonato de amonio, y no en forma ácida o libre) y el AWB es añadido en una cantidad menor que la cantidad molar de bifosfonato (alendronato), puede estar presente una cantidad residual de bifosfonato de amonio en la fase de agua intraliposómica acuosa después de la carga del agente AWB doxorubicina (DOX). Además, por la misma razón, a saber, el uso de una cantidad en exceso de bifosfonato en comparación con el agente AWB doxorubicina (DOX), en la fase de agua intraliposómica acuosa del liposoma final, cantidad residual de bifosfonato, no en forma de sal con el agente AWB doxorubicina (DOX), está presente en la fase acuosa del liposoma. Estas cantidades residuales de sustancias se pueden usar como marcadores indicativos de que los liposomas se formaron de acuerdo con el procedimiento de la presente invención. A este respecto, se observa que aunque el bifosfonato en su forma libre también puede actuar como una fuerza impulsora para la carga del agente AWB doxorubicina (DOX), se encontró que la carga era menos eficiente y menos estable que el resultado obtenido cuando se carga con una forma de sal del bifosfonato (sal de bifosfonato de amonio).

Por tanto, de acuerdo con el primer aspecto de la presente divulgación, se proporcionan liposomas que comprenden una membrana y una fase de agua intraliposómica acuosa, comprendiendo la membrana al menos un lípido formador de liposomas y la fase de agua intraliposómica acuosa que comprende una sal de un bifosfonato y un agente anfipático de base débil (AWB).

Los liposomas en el contexto de la presente divulgación son cualquier colección organizada de lípidos que forman al menos un tipo de liposomas y que encierran al menos un compartimento acuoso intraliposómico. Los liposomas pueden ser unilaminares, bilaminares o incluso, en ocasiones, multilaminares. Se pueden utilizar varios tipos de liposomas de acuerdo con la invención, desde pequeñas vesículas unilaminares (SUV), grandes vesículas unilaminares (LUV), vesículas multilaminares (MLV), vesículas multivesiculares (MVV), grandes vesículas

multivesiculares (LMVV, también denominadas, a veces, por el término vesículas gigantes multivesiculares, "GMV"), vesículas oligolaminares (OLV), y otras.

5 Cuando los liposomas son vesículas unilaminares, el agente AWB doxorubicina (DOX) y el bifosfonato están típicamente encerrados dentro de la fase acuosa interna del liposoma; cuando el liposoma es una vesícula bilaminar o multilaminar, el agente AWB doxorubicina (DOX) y el bifosfonato pueden estar encerrados dentro de la fase acuosa interna pero también en las fases acuosas entre las laminillas de la vesícula.

10 En una realización particular, los liposomas son liposomas unilaminares.

En una realización, los liposomas tienen un diámetro medio en el intervalo de 50 a 150 nm.

15 Los liposomas comprenden al menos un lípido formador de liposomas. Los "**lípidos formadores de liposomas**" se seleccionan principalmente de glicerofosfolípidos y esfingomielinas que cuando se dispersan en medio acuoso, a una temperatura por encima de su temperatura de transición de fase sólida ordenada a líquida, forman por sí mismos liposomas estables.

20 Los glicerofosfolípidos tienen un esqueleto de glicerol en el que al menos uno, preferiblemente dos, de los grupos hidroxilo están sustituidos por uno o dos de una cadena de acilo, alquilo o alquenilo, y el tercer grupo hidroxilo está sustituido por un fosfato (ácido fosfático) o un fosfoéster tal como un grupo fosfocolina (como el ejemplificado por fosfatidilcolina), siendo el grupo de cabeza polar del glicerofosfolípido o una combinación de cualquiera de los anteriores, y/o derivados del mismo y puede contener un grupo químicamente reactivo (tal como una amina, ácido, éster, aldehído o alcohol). Las esfingomielinas comprenden, como ejemplo, N-palmitoil esfingomielina, N-estearoil esfingomielina y otras ceramidas (N-acil esfingosinas) variadas en su unidad de cadenas de acilo que tienen una fracción de fosfocolina unida a la posición 1 de la ceramida como grupo de cabeza polar. La amida de las ceramidas puede ser reemplazada por otros tipos de enlaces tal como un enlace C-C como es el caso de las ceramidas.

25 Normalmente, la cadena sustituyente, por ejemplo, la cadena de acilo, alquilo o alquenilo en los glicerofosfolípidos o esfingolípidos, tiene entre aproximadamente 14 y aproximadamente 24 átomos de carbono de longitud y tiene grados variables de saturación, lo que da como resultado lípidos total, parcial o no hidrogenados (formadores de liposomas).

30 Los lípidos pueden ser de una fuente natural, semisintéticos o un lípido completamente sintético, y pueden tener una carga neutra, negativa o positiva. Existe una variedad de lípidos sintéticos formadores de vesículas y lípidos formadores de vesículas de origen natural.

35 En una realización preferida, el lípido es un fosfolípido y más específicamente, un fosfolípido basado en fosfatidilcolina (PC) (lípido que tiene un grupo de cabeza de fosfocolina), que incluye, sin limitarse a ello, PC sustituida, fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina de yema de huevo (EPC), 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).

40 En cuanto al esfingolípidos, estos pueden incluir, sin limitarse a ellos, esfingomielina, N-palmitoil esfingomielina, N-estearil esfingomielina, ceramida.

45 Los lípidos que tienen una T_m relativamente alta (por encima de la temperatura fisiológica corporal) pueden denominarse lípidos "*rigidos*", normalmente los que tienen cadenas de acilo largas saturadas, mientras que los lípidos con una T_m relativamente baja (por debajo de la temperatura fisiológica corporal) pueden denominarse como lípidos "*fluidos*". La fluidez o rigidez del liposoma se puede determinar seleccionando lípidos con fluidez/rigidez predeterminadas para su uso como lípidos formadores de liposomas. De acuerdo con una realización, la T_m del lípido o lípidos que forman los liposomas se selecciona preferiblemente de modo que su T_m o la T_m de su combinación sea igual o superior a 40 °C. Algunos lípidos basados en fosfatidilcolina tienen una T_m por encima de 40 °C y normalmente tienen dos cadenas de acilo o alquilo con 16 o más átomos de carbono. Estos incluyen, sin limitarse a ellos, PC de soja hidrogenada (HSPC) que tiene una T_m de 53 °C, Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), que tiene una T_m de 41,3 °C, N-palmitoil esfingomielina que tiene una T_m de 41,2 °C, diestearilfosfatidilcolina (DSPC) que tiene una T_m de 55 °C, N-estearoil esfingomielina que tiene una T_m de 48 °C. Todos estos datos de temperatura T_m están disponibles en <http://www.avantilipids.com> que proporcionan Temperaturas de Transición de Fase o en <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>, siendo ambos sitios bien conocidos por los expertos en la técnica [véase también Barenholz, Y., Liposome application: problems and prospects. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 6, 66-77 (2001); Barenholz, Y. y Cevc, G., Structure and properties of membranes. En Physical Chemistry of Biological Surfaces (Bazskin, A. y Norde, W., eds.), Marcel Dekker, NY (2000) páginas 171-241].

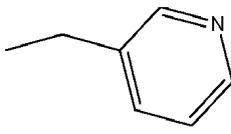
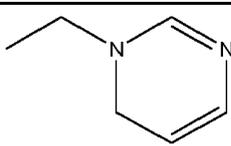
50 En cuanto a los componentes activos encerrados dentro de los liposomas, estos incluyen uno o más bifosfonatos y uno o más agentes AWB, doxorubicina (DOX).

65 Con respecto al bifosfonato, estos incluyen preferiblemente **bifosfonatos que contienen N**.

Los bifosfonatos que contienen N son aquellos que tienen un esqueleto $PX_3-CR_1R_2-PX_3$, en el que X es H o -OH. Los bifosfonatos que contienen N son aquellos que portan sustituyentes que contienen N en R_1 y/o R_2 , como los que se presentan en la siguiente Tabla 1:

5

Tabla 1: Bifosfonatos que contienen N

Nombre común	R_1	R_2
Alendronato	-OH	$-(CH_2)_3-NH_3$
Pamidronato	-OH	$-(CH_2)_2-NH_3$
Neridronato	-OH	$-(CH_2)_5-NH_3$
Olpadronato	-OH	$-(CH_2)_2N(CH_2)_2$
Ibandronato	-OH	$-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_4CH_3$
		
Zoledronato	-OH	

Los bifosfonatos anteriores que contienen N también se conocen por la siguiente nomenclatura:

10 Alendronato: ácido alendrónico, ácido 4-amino-1-hidroxi-butiliden-1,1-bisfosfónico, alendronato sódico o trihidrato monosódico; descrito en la patente de Estados Unidos No. 4.922.007 y la patente de Estados Unidos No. 5.019.651;

15 Ibandronato: ácido 1-hidroxi-3-(N-metil-N-pentilamino)propiliden-1,1-bisfosfónico, también conocido como BM-210955, descrito en la patente de Estados Unidos No. 4.927.814;

Neridronato: ácido 6-amino-1-hidroxi-hexiliden-1,1-bisfosfónico;

Olpadronato: ácido 3-(dimetilamino)-1-hidroxi-propiliden-1,1-bisfosfónico;

20 Pamidronato: ácido 3-amino-1-hidroxi-propiliden-1,1-bisfosfónico;

Risedronato: ácido 1-hidroxi-2-(3-piridinil)-etiliden-1,1-bisfosfónico;

25 Zoledronato: ácido zoledrónico, ácido 1-hidroxi-2-(1H-imidazol-1-il)etiliden-1,1-bisfosfónico.

Otros bifosfonatos que contienen N son ácido [2-(2-piridinil)etiliden]-1,1-bisfosfónico (piridronato, descrito en la patente de Estados Unidos No. 4.761.406); ácido 4-(clorofenil)tiometano-1,1-difosfónico (tiludronato, descrito en la patente de Estados Unidos No. 4.876.248).

30 El bifosfonato que contiene N también incluye sales farmacéuticamente aceptables y derivados del mismo. Como se usa en este documento, los términos "*farmacéuticamente aceptable*" que se pueden usar indistintamente con el término "*fisiológicamente aceptable*" se refieren a sustancias que son "generalmente consideradas como seguras" (GRAS), por ejemplo, que son fisiológicamente tolerables y típicamente no producen una alergia o reacción adversa similar, tal como malestar gástrico, mareos y similares, cuando se administran a un animal. Preferiblemente, 35 "*farmacéuticamente aceptable*" o "*fisiológicamente aceptable*" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales.

40 Los ejemplos no limitantes de sales farmacéuticamente aceptables incluyen las seleccionadas del grupo que consiste en metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio y amonio sustituido con mono, di, tri o tetra-Q-Cso-alquilo sustituido. Algunas sales particulares son las seleccionadas del grupo que consiste en sales de sodio, potasio, calcio, magnesio y amonio. Los ejemplos no limitantes de derivados incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en ésteres, hidratos y amidas.

Con respecto a los agentes anfipáticos de base débil (AWB), el término "base débil" debe entenderse con el significado químico común de una base débil, es decir, una base química que no se ioniza completamente en un medio acuoso puro. Específicamente, una base débil puede definirse como cualquier sustancia que tenga un pKa igual o inferior a 11 y un logD a pH 7 en el intervalo entre -2,5 y 1,5.

El agente AWB de acuerdo con la divulgación es doxorubicina (DOX).

En algunas realizaciones, la combinación de bifosfonato y el agente AWB doxorubicina (DOX) es tal que, para una afección patológica (enfermedad, trastorno, etc.), los médicos consideran el bifosfonato, en su forma de administración libre convencional, de acuerdo con los estándares y estadísticas convencionales, terapéuticamente ineficaz, al menos en el cáncer. Sin embargo, un liposoma que encapsula el bifosfonato y un agente AWB doxorubicina (DOX) (que se sabe que se administra para la afección seleccionada) tiene un efecto terapéutico contra la afección seleccionada que es mayor que el efecto del agente AWB doxorubicina (DOX) encapsulado en el mismo liposoma, aunque sin dicho bifosfonato (encapsulado solo). A veces, los liposomas que encapsulan el bifosfonato y un agente AWB doxorubicina (DOX) (conocido por administrarse/ser eficaz para la afección seleccionada) tienen un efecto terapéutico contra la afección seleccionada en dosis más bajas estadísticamente significativas del agente AWB doxorubicina (DOX) cuando se administra solo (en liposomas, aunque sin el bifosfonato). En otras palabras, se puede considerar que el bifosfonato co-encapsulado aumenta la respuesta al agente AWB doxorubicina (DOX).

El bifosfonato y el agente AWB doxorubicina (DOX) actúan como contraiones entre sí, formando juntos, dentro de la fase acuosa, intraliposómica, una sal. Esta sal precipita en la fase de agua intraliposómica acuosa una vez que se superan los límites de solubilidad durante el proceso co-encapsulante.

De acuerdo con algunas realizaciones, los liposomas comprenden además esteroides activos de membrana (por ejemplo, colesterol) y/o fosfatidiletanolaminas que pueden ser eficaces para disminuir el volumen libre de la membrana y por tanto la permeabilidad y la fuga del material cargado en la misma.

En una realización, la membrana comprende colesterol. La cantidad de colesterol es preferiblemente tal que la relación mol:mol de fosfolípido/colesterol en la membrana del liposoma esta en el intervalo de entre aproximadamente 75:25 y aproximadamente 50:50.

En algunas otras realizaciones más, los liposomas también incluyen un lípido derivatizado con un polímero hidrófilo para formar nuevas entidades conocidas por el término lipopolímeros. Los lipopolímeros comprenden preferiblemente lípidos (lípidos formadores de liposomas así como lípidos que no se transforman en lípidos, tales como fosfatidiletanolaminas) modificados en su grupo de cabeza con un polímero que tiene un peso molecular igual o superior a 750 Da. El grupo de cabeza puede ser polar o apolar; sin embargo, es preferiblemente un grupo de cabeza polar al que se une un polímero flexible grande (> 750 Da), altamente hidratado. La unión del grupo de cabeza de polímero hidrófilo a la región lipídica puede ser una unión covalente o no covalente; sin embargo, es preferiblemente mediante la formación de un enlace covalente (opcionalmente mediante un enlazador). El revestimiento de la superficie más externa de las cadenas de polímero hidrófilo es eficaz para proporcionar un liposoma con una vida útil prolongada en el torrente sanguíneo *in vivo*.

Se han descrito ejemplos en Tirosh et al., [Tirosh et al., Biophys. J., 74 (3): 1371-1379, (1998)] y en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.013.556; 5.395.619; 5.817.856; 6.043.094; y 6.165.501; y en el documento WO 98/07409. Los lipopolímeros pueden ser lipopolímeros no iónicos (también denominados a veces lipopolímeros neutros o lipopolímeros sin carga) o lipopolímeros que tienen una carga neta negativa o una carga neta positiva.

Existen numerosos polímeros que pueden unirse a los lípidos. Los polímeros que se usan típicamente como modificadores de lípidos incluyen, sin limitarse a ellos: polietilenglicol (PEG), ácido polisiálico, ácido poliláctico (también denominado poliláctido), ácido poliglicólico (también denominado poliglicólido), ácido poliláctico-poliglicólico, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polimetoxazolina, polietiloxazolina, polihidroxietiloxazolina, polihidroxipropiloxazolina, poliaspartamida, polihidroxipropil metacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, polivinilmetiléter, acrilato de polihidroxietilo, celulosas derivatizadas tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa. Los polímeros se pueden emplear como homopolímeros o como copolímeros de bloques o al azar.

El lipopolímero puede introducirse en el liposoma de dos formas diferentes, ya sea: (a) añadiendo el lipopolímero a una mezcla de lípidos, formando así el liposoma, en el que el lipopolímero se incorporará y expondrá en las hojuelas internas y externas de la bicapa del liposoma [Uster PS et al., FEBBS Letters 386: 243 (1996)]; o (b) primero preparar el liposoma y luego incorporar los lipopolímeros en las hojuelas externas del liposoma preformado, ya sea por incubación a una temperatura de ≥ 40 °C, o por encima de la T_m promedio del lipopolímero y los lípidos formadores de liposomas, o por exposición a corto plazo a la radiación de microondas.

Mientras que los lípidos derivatizados en lipopolímeros pueden ser neutros, cargados negativamente o cargados positivamente, es decir, no hay restricción con respecto a una carga específica (o ninguna), los lípidos más

comúnmente usados y disponibles comercialmente derivatizados en lipopolímeros son los basados en fosfatidil-etanolamina (PE), generalmente diestearyl fosfatidiletanolamina (DSPE).

Una familia específica de lipopolímeros que pueden emplearse en la invención incluye PEG monometilado unido a DSPE (con diferentes longitudes de cadenas de PEG, el PEG metilado al que se hace referencia en este documento por la abreviatura PEG) en el que el polímero de PEG está unido al lípido a través de un enlace carbamato que da como resultado un lipopolímero cargado negativamente. Otros lipopolímeros son el diestearyl glicerol de metilpolietilenglicol neutro (mPEG-DSG) y el diestearyl éster de metilpolietilenglicol oxicarbonil-3-amino-1,2-propanodiol neutro (mPEG-DS) [Garbuzenko O. et al., *Langmuir*. 21: 2560-2568 (2005)]. La fracción de PEG tiene preferiblemente un peso molecular del grupo de cabeza de PEG entre aproximadamente 750 Da y aproximadamente 20.000 Da. Más preferiblemente, el peso molecular es de aproximadamente 750 Da a aproximadamente 12.000 Da, y más preferiblemente de aproximadamente 1.000 Da a aproximadamente 5.000 Da. Un PEG-DSPE específico empleado en este documento es una fracción de PEG con un peso molecular de 2.000 Da, designado en el presente documento 2000PEG-DSPE o 2kPEG-DSPE.

Los liposomas que incluyen tales lípidos derivatizados incluyen típicamente entre 1 y 20 por ciento en moles de tal lípido derivatizado en la formulación de liposomas.

El liposoma puede incluir otros constituyentes. Por ejemplo, los lípidos inductores de carga, tal como el fosfatidilglicerol, también pueden incorporarse en la bicapa del liposoma para disminuir la agregación de vesículas y aumentar la interacción con las células. Los tampones a un pH adecuado para hacer que el pH de la superficie del liposoma esté entre 6 y 7 pueden disminuir la hidrólisis de fosfolípidos. Puede usarse la adición de un antioxidante, tal como vitamina E, o agentes quelantes, tal como deferoxamina o DTPA.

El liposoma co-encapsulante también puede comprender la fracción de direccionamiento expuesta en la superficie exterior del liposoma. La fracción de direccionamiento puede ser cualquier ligando que pueda asociarse con la superficie exterior del liposoma y tener afinidad por el tejido o el órgano diana. Algunas fracciones de direccionamientos no limitantes incluyen ácido fólico, hormona liberadora de la hormona luteinizante (LH-RH); la hormona inhibidora del crecimiento, somatostatina, la proteína del plasma sanguíneo, transferrina; los anticuerpos específicos diana tales como anti-Her2, anti-EGFr, anti-nucleosoma, anti-CD20, anti-receptor de transferrina y anti-receptor de folato. Una realización particular de la presente divulgación se refiere a liposomas con folato de direccionamiento. Estos ligandos se unen generalmente a la membrana del liposoma acoplándolos a un ancla lipídica compatible con la membrana del liposoma con o sin una molécula espaciadora. En la presente divulgación, como un ejemplo no limitante, el ancla lipídica que se incorpora a la membrana del liposoma es diestearyl-fosfatidil-etanolamina, que se une, a través de la molécula espaciadora de polietilenglicol que varía entre 1 y 5 K de peso molecular, al ligando de direccionamiento, ácido fólico.

En alguna realización, la fracción de direccionamiento está unida al mismo lipopolímero, pero más largo que el lipopolímero usado en ausencia de una fracción de direccionamiento. Una realización particular consiste en un liposoma que contiene ³⁵S-PEG-DSPE derivatizado con folato, y mPEG²⁰⁰⁰-DSPE, en proporciones molares respectivas de 0,5 % y 5 % del lípido liposómico total.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento de co-encapsulación en un mismo liposoma de un bifosfonato y un agente anfipático de base débil, siendo los liposomas como se definieron anteriormente. El procedimiento comprende:

- proporcionar liposomas que comprenden una membrana y una fase de agua intraliposómica acuosa, comprendiendo la membrana al menos un lípido formador de liposomas y la fase de agua intraliposómica acuosa que comprende encapsulado en él, un bifosfonato en forma libre o de sal (denominado en el presente documento, a veces, como la forma de sal inicial, a saber, antes de formar una sal con el agente AWB doxorubicina (DOX));
- incubar los liposomas que encapsulan el bifosfonato con una cantidad de un agente anfipático de base débil para permitir la co-encapsulación del bifosfonato y el agente anfipático de base débil con lo que se forma una sal final entre el bifosfonato y el agente anfipático de base débil.

Como se ha indicado, antes de la incubación con el agente AWB doxorubicina (DOX), el bifosfonato puede estar presente en el liposoma en forma libre, tal como ácido alendrónico, o en forma de sal tal como alendronato de amonio. De acuerdo con algunas realizaciones preferidas, el bifosfonato está en forma de sal.

De acuerdo con algunas realizaciones, los liposomas que encapsulan al menos un bifosfonato están en forma de suspensión. La suspensión de liposomas se puede preparar mediante diversas técnicas. En una realización, la suspensión de liposomas se forma rehidratando una mezcla seca de componentes para formar el liposoma, tales como los lípidos que forman liposomas, los esteroides, etc., con un tampón que contiene el bifosfonato. La mezcla seca de los constituyentes usados para formar el liposoma, puede liofilizarse y rehidratarse cuando está en forma de torta seca. La rehidratación sería típicamente a una temperatura por encima de la T_m de los lípidos formadores de

liposomas. El proceso de rehidratación típicamente logra la encapsulación pasiva del bifosfonato en la fase de agua intraliposómica acuosa formada a partir de los lípidos formadores de liposomas, que es seguida por la reducción del tamaño de los liposomas así formados a las dimensiones deseadas.

5 La reducción de tamaño se puede lograr, por ejemplo, mediante extrusión a través de membranas de policarbonato usando una extrusora con un tamaño de poro preseleccionado (típicamente el tamaño de poro varía de 1000 nm a 50 nm). Los tamaños de partícula finales son típicamente de 50 a 200 nm medidos, y en ocasiones de 50 a 150 nm, dependiendo, entre otras cosas, del tamaño de poro utilizado. A continuación, el bifosfonato no encapsulado se elimina mediante diálisis, diafiltración, cromatografía y/o el uso de una resina de unión a bifosfonato de intercambio aniónico (por ejemplo, resina de intercambio aniónico Dowex).

10 El bifosfonato se encapsula pasivamente en liposomas durante la etapa de hidratación de lípidos en forma de una sal con amonio (aminobifosfonato). Una vez que los liposomas se han llevado al tamaño deseado, el bifosfonato no encapsulado se elimina mediante cualquier procedimiento aceptable. Esta se considera la sal de bifosfonato inicial.

15 A continuación, se añade el agente AWB doxorubicina (DOX) a una suspensión de los liposomas que contienen bifosfonato incubando los liposomas con el agente AWB doxorubicina (DOX) disuelto en una pequeña cantidad de solución salina fisiológica.

20 De acuerdo con algunas realizaciones, la incubación de los liposomas que contienen bifosfonato con el agente AWB doxorubicina (DOX) se realiza a una temperatura que está por encima de la T_m de los lípidos formadores de liposomas. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que el calentamiento de los liposomas a una temperatura por encima de la T_m de los lípidos del liposoma fluidiza los liposomas y por lo tanto aumenta su permeabilidad al agente AWB doxorubicina (DOX).

25 Además, sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que los bifosfonatos ya presentes dentro de los liposomas actúan como fuerza impulsora para la carga remota del agente AWB doxorubicina (DOX) con un gradiente de protones a través de la membrana de los liposomas.

30 Se ha descubierto que mediante el procedimiento descrito en el presente documento es posible obtener cantidades relativamente altas de bifosfonatos y del agente AWB doxorubicina (DOX) co-encapsulado en forma estable dentro de los liposomas. Sin estar ligado a ninguna teoría, se estipula que la estabilidad se forma, entre otras cosas, debido a la formación de una sal entre el bifosfonato y el agente AWB doxorubicina (DOX).

35 De acuerdo con una realización, cuando la T_m de los lípidos que forman el liposoma es inferior a 60 °C, los bifosfonatos liposómicos pueden calentarse a una temperatura de 60 °C durante un tiempo suficiente para permitir la carga del fármaco anfipático (por ejemplo, 0,5-2 horas) e inmediatamente después de que se haya completado la carga, los liposomas se enfrían inmediatamente a una temperatura por debajo de la T_m del liposoma. El tiempo necesario para cargar suficientemente el fármaco anfipático puede determinarse empíricamente ya que estos procesos suelen ser muy rápidos y alcanzan una meseta de encapsulación máxima en menos de una hora.

40 Los liposomas resultantes pueden considerarse química y físicamente estables en condiciones de almacenamiento (por ejemplo, 4 °C, en fluidos biológicos) durante al menos varios meses.

45 La estabilidad física de los liposomas se puede examinar mediante uno o más de los siguientes parámetros:

a) distribución del tamaño del conjunto mediante dispersión dinámica de la luz (DLS).

50 b) nivel de fármaco libre por cromatografía o espectroscopia que se basa en la determinación de la relación molar fármaco/fosfolípido en un sedimento y en el sobrenadante.

La estabilidad química de los liposomas se puede examinar mediante uno o más de los siguientes parámetros:

a) medición del pH de la dispersión (medidor de pH).

55 b) hidrólisis del aciléster del fosfolípido mediante determinación del cambio en ácidos grasos no esterificados (NEFA) (libres) liberados tras la hidrólisis de PL [Barenholz et al., From Liposomes: A Practical Approach, 2ª Ed., RRC New ed, IRL Press Oxford, 1997] o por TLC [Y. Barenholz y S. Amselem, (1993) citado más arriba].

60 En algunas realizaciones, la cantidad del agente AWB doxorubicina (DOX) introducida en los bifosfonatos rehidratados es tal que la relación molar entre el agente AWB doxorubicina (DOX) y el bifosfonato está entre 0,1 y 2, y en ocasiones entre 0,5 a 1.

De acuerdo con la presente divulgación, los liposomas co-encapsulantes se pueden usar para el tratamiento de una afección patológica. En algunas realizaciones, la afección patológica es una enfermedad o trastorno proliferativo.

65 En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno proliferativo es cáncer.

5 El cáncer puede ser un tipo para el que se sabe que al menos el agente AWB doxorubicina (DOX) es eficaz. En una realización, el agente anfipático de base débil es doxorubicina y la enfermedad proliferativa puede ser cualquiera de cáncer de mama, cáncer de ovario, mieloma múltiple, leucemias, linfomas, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, sarcomas óseos y sarcomas de tejido blando. Además, el uso puede ser para cualquiera de las afecciones patológicas para las cuales se encuentra que la combinación del bifosfonato y el fármaco anfipático es eficaz.

10 Además, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo los liposomas co-encapsulantes definidos en el presente documento en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable.

15 Aún más, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar una afección patológica, por ejemplo, una enfermedad o trastorno proliferativo que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad de los liposomas co-encapsulantes como se define en el presente documento.

20 El término "**administrar**" (o "**administración**") se usa para indicar el contacto o dispensación, administración o aplicación de los liposomas co-encapsulantes a un sujeto por cualquier ruta adecuada de administración de los mismos en la ubicación deseada en el sujeto, incluyendo administración parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular e intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, etc.) e intranasal, así como técnicas intratecal y de infusión.

25 De acuerdo con una realización, los liposomas co-encapsulantes se formulan en una forma adecuada para inyección. Los requisitos para vehículos farmacéuticos eficaces para formulaciones inyectables son bien conocidos por los expertos en la técnica [véase *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, JB Lippincott Co., Filadelfia, Pensilvania, Banker y Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., páginas 622-630 (1986)].

30 Además, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto por una enfermedad o trastorno, comprendiendo el procedimiento administrar a dicho sujeto una cantidad de liposomas preparados mediante el procedimiento de la invención.

35 Como se usa en este documento, el término "**tratamiento**" (o "**tratar**") denota la curación de una afección patológica no deseada o la prevención del desarrollo de una afección. Con el fin de curar, el término "**tratamiento**" incluye un efecto directo sobre el causante de las enfermedades, tal como la reducción de la carga tumoral, la prevención de la proliferación de células relacionadas con el cáncer, etc., así como un efecto indirecto, por ejemplo, para mejorar los síntomas no deseados asociados con la enfermedad, ralentizar la progresión de la afección, retrasar el inicio de una etapa progresiva de la afección, ralentizar el deterioro de dichos síntomas, mejorar el inicio de un período de remisión de la afección, si existe, retrasar la aparición de una etapa progresiva, mejorar la tasa de supervivencia o una recuperación más rápida de la afección, disminuir la gravedad o curar la afección, etc. El tratamiento también incluye la prevención de una enfermedad o trastorno. El término "**prevención**" incluye, sin limitarse a ello, administrar una cantidad de la composición para evitar que se desarrolle la afección o para prevenir el daño irreversible causado por la afección, para prevenir la manifestación de síntomas asociados con la afección antes de que ocurran, para inhibir la progresión de la afección, etc..

45 La composición farmacéutica se puede proporcionar como una dosis única, o en varias dosis para administrar más de una vez, durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, para producir una cantidad efectiva acumulativa) en una sola dosis diaria durante varios días, en varias dosis al día, etc..

50 El régimen de tratamiento y la formulación específica de la composición farmacéutica a administrar dependerán del tipo de enfermedad a tratar y pueden determinarse por diversas consideraciones, conocidas por los expertos en la técnica de la medicina, por ejemplo, los médicos. El término "**cantidad eficaz para**" o similar se usa en este documento para indicar la cantidad de la combinación de bifosfonato y el agente AWB doxorubicina (DOX), que, cuando se carga en el liposoma, es suficiente en un régimen terapéutico dado para lograr un efecto terapéutico con respecto a la enfermedad o trastorno tratado. La cantidad se determina por las consideraciones que se conocen en la técnica y depende del tipo y la gravedad de la afección a tratar y el régimen de tratamiento. La cantidad efectiva se determina típicamente en ensayos clínicos diseñados apropiadamente (estudios de intervalo de dosis) y la persona versada en la técnica sabrá cómo llevar a cabo adecuadamente tales ensayos para determinar la cantidad efectiva. Como se sabe generalmente, una cantidad eficaz depende de una variedad de factores, incluido el modo de administración, el tipo de liposoma que porta el bifosfonato que contiene N y el fármaco anfipático de base débil, la reactividad de cada uno del bifosfonatos y el agente AWB doxorubicina (DOX), el perfil de distribución del liposoma dentro del cuerpo, una variedad de parámetros farmacológicos como la semivida en el cuerpo después de ser liberado por el liposoma, efectos secundarios no deseados, si los hay, factores como la edad y el género del sujeto tratado, etc..

65 La presente divulgación también proporciona una terapia de combinación, a saber, un procedimiento en el que los dos liposomas se combinan con al menos otra sustancia activa. Por consiguiente, se proporciona en el presente

documento un procedimiento de tratamiento que comprende administrar a un sujeto una cantidad de liposomas como se define en el presente documento, en combinación con una cantidad de células inmunes.

5 En el contexto de este aspecto de la presente divulgación, las células inmunitarias son cualquier célula o parte de las células que participan en la cascada del sistema inmunológico. Estas pueden incluir, sin limitarse a ellas, leucocitos, linfocitos, células asesinas naturales (NK), macrófagos, monocitos, células presentadoras de antígeno, células dendríticas, basófilos, mastocitos.

10 En algunas realizaciones, las células inmunes son linfocitos. Los linfocitos incluyen células B y células T.

15 En algunas otras realizaciones, las células inmunitarias son células T. En una realización, las células T son células T $\gamma\delta$. Las células T $\gamma\delta$ son un pequeño subconjunto de células T que poseen un receptor de células T (TCR) distinto en su superficie. Específicamente, las células T $\gamma\delta$ están formadas por una glicoproteína de cadena γ y una glicoproteína de cadena δ , a diferencia de la mayoría de las células T que tienen un TCR compuesto por dos cadenas de glicoproteínas llamadas cadenas TCR α y β .

20 Como sorprendentemente se encuentra y se muestra en el presente documento, cuando el tratamiento comprende una combinación de L-ALD/DOX liposómico (también denominado en el presente documento alendronato y doxorubicina liposómicos PEGilado, o **PLAD**) de acuerdo con la presente divulgación y una población de células T $\gamma\delta$ se aumentó el efecto del tratamiento liposómico. El efecto fue aún más pronunciado cuando se utilizaron liposomas con folato de direccionamiento.

25 En algunas realizaciones, la terapia de combinación descrita en este documento proporciona un efecto terapéutico que es mayor que el efecto obtenido con el tratamiento solo con dichos liposomas. En algunas realizaciones, el efecto proporcionado es tal que la cantidad de liposoma administrada puede reducirse significativamente de acuerdo con pruebas estadísticas aceptables y aún obtener un efecto terapéutico.

30 En algunas realizaciones, las células inmunes se administran al sujeto mediante infusión. La infusión puede ser de cualquier tipo aceptable. En algunas realizaciones, la infusión es una infusión intravenosa (iv) o una infusión intraperitoneal (ip).

35 Las células inmunes se pueden administrar al sujeto, antes, concomitantemente o después de la administración de los liposomas. Sin embargo, en algunas realizaciones preferidas, las células inmunes se administran después de la administración de los liposomas. En algunas realizaciones, la administración puede ser varias horas después de la administración de los liposomas y en ocasiones al menos un día después de la administración de los liposomas o dentro de una ventana de tiempo de 1-3 días después de la administración de los liposomas. En este contexto, cuando se hace referencia a varias horas debe entenderse que significa, al menos, 3 horas, en ocasiones hasta 24 horas después del tratamiento con los liposomas. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que el intervalo de tiempo entre administraciones permite un tiempo suficiente para que las células diana (por ejemplo, células tumorales) sean sensibilizadas primero por los liposomas y sólo después sean tratadas por las células inmunes.

40 Las células inmunes se pueden administrar junto con un agente inmunoestimulante, tal como una citocina. En algunas realizaciones, la citocina puede ser cualquiera seleccionada del grupo que consiste en interleucinas (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-15).

45 Como se muestra en los ejemplos no limitantes proporcionados en este documento, el tratamiento combinado de los liposomas y las células inmunes proporciona un efecto terapéutico que es mayor que el efecto obtenido con el tratamiento solo con dichos liposomas.

50 El tratamiento combinado es particularmente adecuado para el tratamiento de una enfermedad o trastorno proliferativo, tal como, sin limitarse al mismo, cáncer.

55 También se proporciona en el presente documento un empaque y procedimiento de tratamiento que usa el empaque que comprende una primera composición que comprende liposomas como se define en el presente documento y una segunda composición que comprende células inmunes; el empaque también comprende instrucciones para el uso combinado de la primera y segunda composición para el tratamiento de un sujeto. En algunas realizaciones preferidas, el uso combinado proporciona un efecto terapéutico que es mayor que el efecto obtenido con el tratamiento de la misma afección solo con dichos liposomas.

60 Se observa que las formas "**un**", "**uno**", "**una**" y "**el**", "**la**", tal como se utilizan en la memoria descriptiva, incluyen referencias tanto en singular como en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un **lipido**" incluye uno o más lípidos iguales o diferentes.

65 De manera similar, la referencia al plural incluye el singular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Además, como se usa en este documento, el término "**que comprende**" pretende significar que el liposoma incluye los constituyentes mencionados, pero no excluye otros que pueden ser opcionales en la formación o composición del liposoma, tales como antioxidantes, crioprotectores, etc. El término "**que consiste esencialmente**" se utiliza para definir una sustancia, por ejemplo, un liposoma, que incluye los constituyentes enumerados pero excluye otros constituyentes que pueden tener un efecto esencial significativo sobre un parámetro de los liposomas, la estabilidad, liberación o falta de liberación del agente del liposoma así como sobre otros parámetros que caracterizan a los liposomas); "**consistente en**" significará, por lo tanto, excluir más que cantidades traza de esos otros constituyentes. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

Además, todos los valores numéricos, por ejemplo, al referirse a las cantidades o intervalos de los elementos que constituyen la composición o los componentes del liposoma, son aproximaciones que varían (+) o (-) hasta en un 20 por ciento, a veces hasta en un 10 por ciento de los valores establecidos. Debe entenderse, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término "**aproximadamente**". Se aprecia que ciertas características de la invención, que, para mayor claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Descripción detallada de algunos ejemplos no limitantes

Ejemplo 1: formulación de liposomas, captación celular y citotoxicidad

Materiales

Fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC) (Lipoid, Alemania)
 mPEG (2000)-DSPE (Bio-lab, Jerusalén, Israel)
 Folato-PEG (3350)-DSPE (Shaare Zedek Experimental Oncology Lab Israel)
 Colesterol (Sigma, St. Louis, MO)
 Ácido alendrónico (**ALD**, Teva, Israel)
 Alendronato de sodio con 3H radiactivo (Moravek, CA, EE. UU.)
 Doxil (Janssen Pharmaceuticals, New Jersey, EE. UU.)
 Doxorubicina (**DOX**, Teva, Israel)
 Ratones BALB/c (Harlan, Israel)
 KB y KB-HiFR, carcinoma humano que expresa alto receptor de folato (FR) (Shaare Zedek Experimental Oncology Lab, Israel)
 IGROV-1: carcinoma de ovario humano que expresa FR elevado (Shaare Zedek Experimental Oncology Lab, Israel)
 Carcinoma de pulmón de ratón M109R (Shaare Zedek Experimental Oncology Lab, Israel)

Procedimientos

Formulación liposómica:

La formación de liposomas se realizó mediante procedimientos estándar de liofilización de lípidos, hidratación y extrusión de membranas de policarbonato hasta un tamaño de poro de 0,1, 0,08 o 0,05 μm . El procedimiento resumido es el siguiente: los lípidos usados fueron fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenada (HSPC) o mPEG (2000)-DSPE (²⁰⁰⁰PEG-DSPE) y colesterol. Los componentes lipídicos en las siguientes proporciones molares: 53-55 % de HSPC, 40 % de colesterol y 5-7 % de ²⁰⁰⁰PEG-DSPE, se pesaron, se disolvieron en butanol terciario, se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron durante la noche. Alternativamente, los lípidos se pesaron en las proporciones antes mencionadas, se disolvieron en etanol y se mezclaron con tampón de hidratación para formar los liposomas.

Encapsulación de bifosfonato (Alendronato):

Se encapsuló alendronato (ALD) en los liposomas mediante rehidratación en tampón que contenía ALD amónico 250 mM, con un pH de aproximadamente 6. Los liposomas resuspendidos se procesaron mediante extrusión de tamaño en serie en un dispositivo extrusor de alta presión [Lipex Biomembranes, Vancouver, BC] con control de temperatura a 60 °C a través de filtros con tamaños de poro de 1.000 nm a 50 nm. El ALD no encapsulado se eliminó mediante diálisis frente a un tampón de dextrosa al 5 % (o sacarosa al 10 %) con histidina 15 mM, pH 7,0, seguido por el paso sobre una resina de intercambio aniónico Dowex. Los liposomas se esterilizaron mediante filtración a través de filtros de 0,22 μm y se almacenaron en tubos Vacutainer^{MR} a 4 °C. Se obtuvo una suspensión de pequeños liposomas unilaminares de ~ 100 nm de diámetro.

El contenido de fosfolípidos y ALD se determinó después de la extracción de Folch (cloroformo:metanol:DDW 8:4:3 o muestra) (Shmeeda, H., Even-Chen, S., Honen, R., Cohen, R., Weintraub, C., y Barenholz, Y. Enzymatic assays for

quality control and pharmacokinetics of liposome formulations: comparison with nonenzymatic conventional methodologies. *Methods Enzymol*, 367: 272-292, 2003), para separar los fosfolípidos (fase inferior), del ALD (fase superior). Las muestras de cada fase se analizaron mediante el procedimiento de Bartlett para determinar el fósforo.

5 Encapsulación del fármaco anfipático de base débil (Doxorrubicina):

Los liposomas que contienen el ALD (L-ALD), preparados como se describió anteriormente se incubaron con doxorubicina (DOX) a una relación molar de DOX-ALD de 0,5, durante 60 min a una temperatura de 60 °C y se enfriaron inmediatamente. La suspensión de liposomas resultante se pasó a través de una resina de intercambio catiónico Dowex para eliminar cualquier DOX no encapsulada. La formulación se esterilizó usando filtros de 0,45 µm o 0,22 µm. La concentración final de DOX en la formulación se ajustó a 2,0 mg/ml mediante dilución adicional con el tampón de diálisis mencionado anteriormente.

15 Caracterización de los liposomas co-encapsulantes:

La absorbancia de doxorubicina se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 480 nm después de la extracción de los liposomas en butanol terciario acidificado. El fosfolípido final y el ALD se volvieron a cuantificar como se describió anteriormente.

20 Los liposomas resultantes contenían una relación molar de: ALD:DOX (L-ALD/DOX) de ~ 1,5 (o una relación molar DOX/ALD de ~ 0,7). El tamaño de partícula de los liposomas co-encapsulados estaba entre 70-120 nm (diámetro), determinado por dispersión dinámica de luz (DLS) de una muestra de 20 µl diluida en 1,0 ml de solución salina usando un analizador de partículas Malvern.

25 Evaluación de la eficiencia y estabilidad de la encapsulación:

Para determinar si había algún fármaco libre residual (DOX o ALD) y para seguir la estabilidad de la encapsulación, se utilizó el fraccionamiento por cromatografía en gel para separar el material liposómico del material de bajo peso molecular no encapsulado. Se pasó una muestra de liposomas a través de una columna de Sepharose-6G y se recogieron 20 fracciones de un ml. Se añadió una cantidad de ALD de sodio radiomarcado con [3H] a ALD de amonio en una formulación de prueba, lo que permitió su seguimiento mediante recuento de centelleo de muestras de fracciones (20 µl) extraídas en isopropanol acidificado (1:10). La DOX se midió espectrofotométricamente a 480 nm o mediante emisión de fluorescencia a 590 nm con excitación a 470 nm después de la extracción en isopropanol acidificado (1:10). La concentración de fosfolípidos se determinó en muestras de 50 µl mediante el procedimiento modificado de Bartlett (Shmeeda et al., 2003, como se describió anteriormente).

La estabilidad en plasma se evaluó mediante la incubación de 100 µl de liposomas con 400 µl de plasma humano a 37 °C durante hasta 24 horas y se evaluó la liberación de ALD y DOX como anteriormente.

40 Captación celular y citotoxicidad:

Se determinó la citotoxicidad de L-ALD/DOX en relación con DOXIL y otras muestras de control (DOX libre, ALD libre y L-ALD) en tres líneas celulares humanas, carcinoma cervical humano KB, células de carcinoma gástrico humano N87 y carcinoma de ovario IGROV-1.

45 Se ensayó la citotoxicidad usando concentraciones variables de ALD (0,1-200 µM) bajo una exposición continua estándar de 72 horas, en ensayos de 96 pocillos. La velocidad de crecimiento se evaluó colorimétricamente basándose en la tinción con azul de metileno y los datos se obtuvieron con un lector de placas automático y se determinaron los valores de IC50.

50 Se comparó la captación de DOX de L-ALD/DOX con la de Doxil en células KB incubadas durante 3 h a 37 °C con 5 µg/ml de cada formulación con base en la concentración de Doxorubicina.

55 Niveles en plasma de doxorubicina en ratones:

Se inyectaron ratones BALB/c iv con 100 µg de doxorubicina ya sea como formulación de L-ALD/DOX (como se describió anteriormente) o como una formulación comercial de doxorubicina liposómica conocida como Doxil^{MR}. Se extrajo sangre de ratones 24 horas después y se midieron fluorimétricamente los niveles en plasma de doxorubicina después de la extracción de la doxorubicina del plasma (se extraen 100 µl de plasma en 900 µl de isopropanol acidificado). La concentración de doxorubicina se midió fluorimétricamente usando una longitud de onda de excitación de 470 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm como se describió previamente (Gabizon et al., *Clin Cancer Res* 2003).

65 Estudio terapéutico en ratones BALB/c:

Se adquirieron ratones (BALB/c hembra de ~ 8-10 semanas de edad) de Harlan Breeding Laboratories (Jerusalén, Israel). Todos los experimentos con animales se realizaron bajo un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad Hebrea de Hadassah para uso de animales en investigación. El modelo de tumor utilizado aquí es el carcinoma M109R de ratón (resistente a la doxorubicina).

Se inocularon células tumorales M109R (10^6 células/0,05 ml) en el espacio subcutáneo de la pata trasera derecha del ratón. Cinco a 7 días después de la inoculación, los ratones inyectados con células M109R desarrollaron tumores sólidos medidos por el aumento del engrosamiento de la almohadilla plantar. Se inyectaron en forma iv diferentes liposomas a niveles de dosis de 5 mg/kg con base en el contenido de Doxorubicina o una cantidad de Alendronato equivalente a la presente en la formulación co-encapsulada a una dosis de doxorubicina de 5 mg/kg. La dosis seleccionada para la L-ALD/DOX co-encapsulada fue bien tolerada. Los siguientes grupos se compararon en dos conjuntos de experimentos: (i) sin tratar, (ii) Doxil, (iii) L-ALD/DOX y (iv) combinación de dos formulaciones liposómicas, L-ALD + Doxil. El tratamiento se administró el día 7 (D7), el día 14 (D14) y el día 21 (D21). Las curvas de Kaplan-Meyer se basaron en un criterio de valoración experimental de tamaño tumoral igual o superior a 4 mm.

Resultados

Formulación liposómica:

Como se muestra en las Tablas 2A, 2B y 2C a continuación, la preparación final contiene entre 3 y 4 micromoles de ALD y ~ 30 micromoles de fosfolípido.

Se determinó que el contenido de una preparación típica de un liposoma co-encapsulado con bifosfonato, tal como ALD y doxorubicina, era la siguiente:

- Concentración de fosfolípidos (PL) ~30 $\mu\text{mol/ml}$,
- Concentración final de bifosfonato de ~ 1 mg/ml con una relación molar de ALD/PL de ~ 0,10.
- Concentración final de doxorubicina de ~ 2 mg/ml con una relación molar de Doxorubicina/PL de ~ 0,05;
- Relación molar ALD/DOX de ~ 2.
- Tamaño medio de partícula de 70-120 nm (para liposomas extrudidos).

Tabla 2A - Liposomas alendrónicos antes de la carga de DOX

# Lote	Concentración de ALD			Concentración de PL		
	$\mu\text{mol/ml}$	mg/ml	% de recuperación	$\mu\text{mol/ml}$	mg/ml	% de recuperación
293	7,05	2,29	4,9	21,65	16,9	63
294	6,8	2,21	4,76	24,5	19,1	71,5

Tabla 2B - Liposomas después de la carga de DOX

# Lote	Concentración de ALD		Concentración de PL		Concentración de DOX		
	$\mu\text{mol/ml}$	mg/ml	$\mu\text{mol/ml}$	mg/ml	$\mu\text{mol/ml}$	mg/ml	% de recuperación
293	6,9	2	18,8	14,7	2,8	1,67	80
294	6,5	1,9	18,4	14,4	2,44	1,44	88,3

Tabla 2C - características de los liposomas antes (pre) y después (post) de la carga de DOX

# Lote	Tamaño (nm)		pH		mOsm/L	
	Pre-DOX	Post-DOX	Pre-DOX	Post-DOX	Pre-DOX	Post-DOX
293	98,8	99,7	7	7,2	305	318
294	96,6	98,7	7	7,5	252	277

La co-encapsulación de ALD y DOX (L-ALD/DOX) se validó usando fraccionamiento por cromatografía en gel para separar el material liposómico del material de bajo peso molecular (los fármacos no encapsulados) como se describe en los procedimientos. Las Figuras 2A-2D muestran, usando una formulación que contiene trazas de alendronato radiomarcado, a la que eluyen las fracciones de L-ALD/DOX.

Como se muestra en la Figura 2A, el ALD radiomarcado se eluyó con las fracciones de liposomas (n° 5- n° 7) y las fracciones posteriores contenían cantidades insignificantes de ALD.

Además, como se muestra en la Figura 2B, la doxorubicina se eluyó con las fracciones de liposomas (n° 5- n° 7) y las fracciones posteriores contenían cantidades insignificantes de fármaco.

Es importante señalar que los patrones de elución de ambos fármacos (ALD y DOX) se superponen entre sí, lo que confirma de hecho que están co-encapsulados en el mismo liposoma. Usando esta técnica, se encontró previamente que los fármacos asociados a liposomas eluían en las fracciones # 5 al # 7, mientras que los fármacos libres, no encapsulados eluían en las fracciones # 10- # 12.

Además, como se muestra en la **Figura 2C y 2D**, la estabilidad de L-ALD/DOX después de 2 horas y 24 horas de exposición al plasma humano demuestra la retención completa de DOX dentro de los liposomas en estas condiciones.

Citotoxicidad y captación celular:

Se comparó la captación celular en células KB de DOX libre, Doxil y L-ALD/DOX (**Figura 3A**). Específicamente, la exposición de las células tumorales KB a la L-ALD-DOX liposómica PEGilada muestra una captación celular de doxorubicina (Dox) igualmente baja en comparación con Doxil, lo que indica que la mayor citotoxicidad del primero no puede explicarse por una mayor exposición a la doxorubicina, y está necesariamente relacionada con la presencia combinada de ALD y DOX en el mismo liposoma.

Además, la citotoxicidad de ALD, L-ALD y L-ALD/DOX libres se comparó con la de DOX y Doxil libres en líneas celulares KB (**Figura 3B**), N87 (**Figura 3C**) e IGROV (**Figura 3D**). L-ALD/DOX fue más citotóxico que Doxil y se aproxima notablemente a la actividad de DOX libre. Téngase en cuenta que L-ALD y ALD libre no tienen esencialmente citotoxicidad en estas líneas celulares.

Se observa que las formulaciones de liposomas no de direccionamientos generalmente muestran una citotoxicidad *in vitro* inferior a la del control de fármaco libre. Los valores de IC50 también se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 (IC-50 en μM):

Tratamiento	KB-hiFR	N-87	IGROV
ALD libre	>20	>100	>20
DOX libre	0,04	3,12	0,25
Doxil	0,71	31,72	5,56
Lip-ALD	>20	>100	>20
Lip-ALD/DOX	0,36	9,95	2,28
FT-Doxil	0,42		
FT-L-ALD	>20		
FT -L-ALD/DOX	0,1		

La captación celular de DOX con L-ALD/DOX fue baja y similar a la captación de Doxil. Por lo tanto, la mayor citotoxicidad de L-ALD/DOX no puede explicarse por una mayor liberación de DOX, lo que indica una contribución citotóxica significativa de la combinación co-encapsulada de ALD y DOX (es decir, la misma absorción pero mayor citotoxicidad).

Niveles en plasma de doxorubicina en ratones:

Los resultados presentados en la **Figura 4A** demuestran la farmacocinética de L-ALD/DOX con base en la concentración de doxorubicina en plasma medida después de 3 horas, 24 horas y 48 horas. Los resultados mostrados en las **Figuras 4B-4C** indican que tras la administración de Doxil o L-ALD/DOX, estaban presentes niveles altos similares de doxorubicina en el plasma de ratones 24 horas después de la inyección iv de estas formulaciones liposómicas en la vena de la cola de ratones Sabra. Esto indica que la formulación liposómica co-encapsulada L-ALD/DOX de acuerdo con la invención, y en este ejemplo particular, fue estable y presentaba un tiempo de circulación prolongado (20 % de la dosis inyectada a las 24 horas) *in vivo*.

Resultados terapéuticos

Los resultados presentados en las **Figuras 5A y 5B-5D** relacionados con el modelo de tumor M109R (un tumor relativamente resistente a la doxorubicina) demuestran el aumento significativo de la actividad antitumoral de L-ALD/DOX (presentada en la Figura 5A como **PLAD**) cuando se compara con Doxil. La **Figura 5A** muestra las curvas de supervivencia de ratones inoculados con M109R y posteriormente, después del establecimiento del tumor, tratados con 5 mg/kg de Doxil o L-ALD/DOX. El gráfico demuestra una mayor actividad antitumoral de L-ALD/DOX (**PLAD**) en el tumor M109R (relativamente resistente a la doxorubicina) en comparación con Doxil. Se observa que L-ALD y ALD libre no tuvieron ningún efecto antitumoral (datos no mostrados). L-ALD/DOX también fue significativamente más activo *in vivo* que una combinación de Doxil y L-ALD (**Figura 5B**). L-ALD solo fue inactivo (ALD y L-ALD se administró a la misma dosis que la ALD en L-ALD/DOX). Al observar las curvas de crecimiento de tumores individuales (**Figura 5C**) de las que se derivaron las Figuras anteriores, el experimento muestra que L-ALD/DOX es claramente más eficaz que Doxil.

Ejemplo 2 - Encapsulación de alendronato y doxorubicina en liposomas con folato de direccionamiento**Procedimientos**5 **Formulación liposómica y encapsulación de alendronato:**

La formulación de liposomas y la encapsulación de bifosfonato y la carga en gradiente de doxorubicina se realizaron mediante procedimientos estándar como se describe en el *Ejemplo 1*.

10 **Liposomas con el receptor de folato de direccionamiento:**

Se sintetizó ³³⁵⁰PEG-DSPE derivatizado con folato como lo describen Gabizon et al., (Gabizon A, Horowitz A, Goren D, Tzemach D, Mandelbaum-Shavit F, Qazen M y Zalipsky, S. Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: in vitro studies. Bioconjugate Chemistry 10 (2):289-98, 1999). En resumen, el procedimiento incluye lo siguiente: Se añade ácido fólico disuelto en DMSO anhidro a amino-³³⁵⁰PEG-DSPE en piridina que contiene dicitohexilcarbodiimida (DCC). La mezcla se incubó en la oscuridad durante 4 horas a TA con agitación. Se forma un precipitado blanco: dicitohexilurea (DCU), un subproducto secundario. El sobrenadante es amarillo que contiene folato no reaccionado libre y folato-³³⁵⁰PEG-DSPE. La reacción es seguida por TLC (véase más abajo) con base en la desaparición de amino-PEG-DSPE por tinción con ninhidrina y la aparición de una nueva mancha amarilla de folato-²⁰⁰⁰PEG-DSPE. Fase móvil de TLC: cloroformo/metanol (75:36) realizado en hojas para TLC Silica gel 60 F254. La mezcla de reacción se centrifuga a 3000 rpm durante 2 minutos, el sobrenadante se retira a un nuevo vial. La piridina del sobrenadante se elimina mediante evaporación rotatoria. Se agrega DDW hasta que se disuelve totalmente y luego el sobrenadante se dializa en un tubo de diálisis Spectra/con una membrana de corte de peso molecular de 50.000 contra solución salina y luego DDW para eliminar DMSO, folato libre y fracciones de piridina. Se liofiliza el dializado y se toma una muestra para análisis de HPLC utilizando una Columna Phenomenex Prodigy C8 de 5µm (100 x 4,6 mm) en una fase móvil compuesta por: metanol/fosfato de sodio 10 mM pH 7,0 (92:8 v/v) a un caudal de 1 ml/min, TA, longitud de onda de detección de 285 nm. El tiempo de retención del folato libre es de 0,8 min y el de Folato-PEG-DSPE es de 2,5 min.

30 El Folato-³³⁵⁰PEG-DSPE (PM = 3.232) se incubó con liposomas preformados que contenían ALD solo o liposomas de ALD-DOX co-encapsulados con 0,1 - 0,5 % del contenido total de fosfolípidos de la formulación liposómica de acuerdo con lo determinado por Bartlett (véanse los procedimientos del *Ejemplo 1*). Específicamente, se añadió el Folato-³³⁵⁰PEG-DSPE como un polvo seco a los liposomas que contenían fármaco/fármacos y se incubó a 45 °C durante 2 horas mientras se agitaba. A continuación, se centrifugaron los liposomas (10 min, 3000 rpm) para eliminar cualquier Folato-³³⁵⁰PEG-DSPE no incorporado que precipita debido a su insolubilidad en agua.

40 El contenido de liposomas de Folato-³³⁵⁰PEG-DSPE se determinó espectrofotométricamente a 284 nm como se describió anteriormente (Gabizon et al., 1999, mencionado anteriormente) o mediante HPLC (92 % de metanol/8 % de tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0), a una longitud de onda de 285 nm, Tr 3,0 min.

45 **Citotoxicidad y captación celular:**

La citotoxicidad de L-ALD/DOX co-encapsulado con folato de direccionamiento, así como la citotoxicidad de Doxil con folato de direccionamiento y ALD liposómico con folato de direccionamiento, se determinaron en dos líneas celulares humanas sobrerreguladas con receptor de folato (FR), carcinoma cervical KB y en carcinoma de ovario humano IGROV-1. Otros controles incluyeron ALD y DOX libres.

50 Se ensayó la citotoxicidad como se describió anteriormente en el *Ejemplo 1*. La captación de DOX de L-ALD/DOX con folato de direccionamiento se comparó con aquel de Doxil con folato de direccionamiento en células KB-HiFR incubadas durante 3 horas a 37 °C con 5 µg/ml de cada formulación con base en la concentración de doxorubicina.

Resultados

55 La citotoxicidad de alendronato libre, L-ALD con folato de direccionamiento (FT) y FT-L-ALD/DOX se compararon con aquella de DOX libre y FT-Doxil en la línea celular humana KB sobrerregulada para FR (**Figura 6, Tabla 3**). Como se muestra en la **Figura 6**, FT-L-ALD/DOX tuvo una mayor actividad citotóxica que L-ALD/DOX. En la **Figura 6/Tabla 3**, ambas formulaciones con folato de direccionamiento tenían una citotoxicidad mucho mayor que las formulaciones no de direccionamientos y FT-L-ALD/DOX tenían una mayor actividad en estas células que FT-Doxil mientras que FT-L-ALD no tenía actividad significativa.

60 La captación comparativa de doxorubicina después de 3 horas de incubación a 37 °C con las diversas formulaciones no de direccionamientos y con folato de direccionamiento se cuantificó en células KB-HiFR y los resultados se muestran en la **Figura 7**.

65

Aunque las formulaciones con folato de direccionamiento aumentaron sustancialmente la absorción tanto de Doxil como de L-ALD/DOX, la absorción de FT-L-ALD/DOX fue algo menor en comparación con FT-Doxil. Sin embargo, si se tiene en cuenta la relación fármaco-lípido ligeramente superior de FT-Doxil, la masa lipídica y, por lo tanto, el número de liposomas absorbidos por las células, deben considerarse similares para ambas formulaciones (Doxil y L-ALD-DOX en las versiones de FT de direccionamiento y no de direccionamiento). Por lo tanto, la mayor citotoxicidad de L-ALD/DOX no puede explicarse por una mayor administración de DOX, lo que indica una contribución citotóxica significativa de la combinación co-encapsulada de ALD y DOX (es decir, absorción igual o menor pero no obstante mayor citotoxicidad).

Ejemplo 3 - Efecto de células T $\gamma\delta$ en el tratamiento con ALD/DOX liposómico en células de cáncer de mama

Materiales

Las células de cáncer de mama MDA-MB-231, ZR-75 y BT20 se obtuvieron de la División de Estudios del Cáncer, Sección de Investigación en Oncología, Guy's Hospital, Escuela de Medicina KCL, Londres, Reino Unido.

Procedimientos

Se sembraron tres líneas celulares de cáncer de mama diferentes, MDA-MB-231, ZR-75 y BT20 en placas de 24 pocillos en 1 ml de medio completo. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se trataron de acuerdo con las siguientes preparaciones:

(i) 20 $\mu\text{g/ml}$ de alendronato liposómico (no se muestra)

(ii) 20 $\mu\text{g/ml}$ de formulación liposómica de alendronato/doxorubicina (**PLAD**)

(iii) 20 $\mu\text{g/ml}$ de formulación liposómica de alendronato/doxorubicina de folato de direccionamiento (**FT**) (**FT-PLAD**)

(iv) 13,3 $\mu\text{g/ml}$ de **Doxil** (esta cantidad es igual a la cantidad de doxorubicina en PLAD)

(v) liposoma libre de fármaco (liposomas Stealth)

(vi) sin tratamiento (Control).

Las células se incubaron durante 24 h a 37 °C de acuerdo con las diferentes preparaciones de tratamiento y después de estas 24 horas, el medio con las preparaciones de tratamiento se sustituyó por *medio completo* fresco o medio con 1×10^6 células T $\gamma\delta$ y 100 U/ml de IL-2 (usado como factor de crecimiento para apoyar la viabilidad de las células T $\gamma\delta$). Esta cantidad de células T $\gamma\delta$ corresponde a una proporción de aproximadamente 1 célula tumoral por 1 célula T $\gamma\delta$. A continuación, las células se incubaron durante 24 horas más.

Después del segundo período de incubación de 24 horas, los medios condicionales de los diferentes cultivos celulares se mantuvieron para el análisis de citocinas y las monocapas celulares se tiñeron con cristal violeta y se fotografiaron los pocillos para una estimación semicuantitativa del efecto citolítico-tumorocida del tratamiento como lo describen Wilkie S, et al., (2010) Selective expansion of chimeric antigen receptor-targeted T-cells with potent effector function using interleukin-4. J. Biol. Chem. 285:25538-44.

Las diferentes líneas celulares de cáncer de mama también se analizaron para determinar sus niveles de expresión de folato. El análisis se realizó mediante citometría de flujo con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína de unión a folato humana (fuente ABCAM) y un anticuerpo secundario de cabra anti-PE de ratón.

Resultados

Las **Figuras 8A, 9A y 10A** muestran que las tres líneas de cáncer de mama expresan el receptor de folato. El espacio entre el área sin rellenar y el área rellena en gris indica la positividad de la expresión de la línea celular del receptor de folato (FR) examinada por citometría de flujo con anticuerpo anti-receptor de folato. Las líneas celulares MDA-MB231 y ZR-75 son positivas para **FR**. La línea celular BT20 es negativa para FR.

Las **Figuras 8B-8D, 9B-9D y 10B-10D** muestran que en presencia de ALD/DOX liposómico (L-ALD/DOX) la tinción fue menor en comparación con el tratamiento con Doxil solamente, lo que significa que las células fueron sensibles al tratamiento y que las células eran incluso más sensibles cuando los liposomas eran liposomas de direccionamientos (FT-L-ALD/DOX).

Los resultados también muestran que un tratamiento de seguimiento con células T $\gamma\delta$ aumentó la sensibilidad de las células al tratamiento (exhibido por una tinción más baja), es decir, la muerte celular se exhibió en un mayor grado.

Ejemplo 4 - Efecto de las células T $\gamma\delta$ sobre el tratamiento con ALD/DOX liposómico en células de leucemia mieloide aguda

Materiales

- 5 Células KG-1 [División de Estudios del Cáncer, Sección de Investigación en Oncología, Guy's Hospital, Escuela de Medicina KCL, Londres, Reino Unido]
AnexinaV FITC [BD PharMingen, EE. UU.]
La tinción con PKH26 se obtuvo de Sigma.

10 **Procedimientos**

El siguiente procedimiento se basa en el procedimiento descrito por Fischer y Mackensen (2003) The flow cytometric PKH-26 assay for the determination of T-cell mediated cytotoxic activity. Methods 31: 135-142.

- 15 Específicamente, 1×10^5 células KG-1, previamente teñidas con PKH26 Red Fluorescent, se sembraron en una placa de 24 pocillos en 1 ml de medio completo. Luego, estas células se trataron con diferentes preparaciones:
- (i) 20 $\mu\text{g/ml}$ de alendronato (alendronato libre)
 - 20 (ii) 20 $\mu\text{g/ml}$ de alendronato + doxorubicina liposómico (L-ALD/DOX)
 - (iii) 20 $\mu\text{g/ml}$ de alendronato + doxorubicina liposómico con folato de direccionamiento (FR-L-ALD/DOX)
 - (iv) 13,3 $\mu\text{g/ml}$ de Doxil (la cantidad de doxorubicina correspondiente a la doxorubicina en L-ALD/DOX)
 - 25 (v) Liposomas vacíos (Stealth)
 - (vi) Control: sin tratamiento.

- 30 Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C con una formulación de tratamiento de acuerdo con los grupos anteriores. Después de 24 horas, cada grupo de células KG-1 tratadas se cocultivó con células T $\gamma\delta$ en una proporción de 1 célula tumoral a 1 célula T $\gamma\delta$ y de 1 célula tumoral a 5 células T $\gamma\delta$. Además, también se administraron 100 U/ml de IL-2 a cada grupo de tratamiento. Algunas células KG-1 no se mezclaron con células T $\gamma\delta$ para probar la toxicidad de la preparación.

- 35 Después de 4 horas de incubación, los cultivos celulares se tiñeron con AnexinaV FITC (BD) para medir el porcentaje de células apoptóticas. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo y el principio es que la muerte de las células tumorales se mide analizando células PKH26⁺AnexinaV⁺.

40 **Resultados**

- Las células T $\gamma\delta$ utilizadas en estos ensayos eran de dos pacientes diferentes con AML. La **Figura 11** muestra que el alendronato mejora la sensibilidad del tumor a la acción citotóxica de las células T $\gamma\delta$. Sin embargo, la doxorubicina en forma de Doxil no produjo una mejora significativa. Curiosamente, cuando ambos fármacos, ALD y DOX se administran en el mismo liposoma con o sin folato de direccionamiento (PLAD o FT-PLAD) juntos, se lograron los porcentajes más altos de muerte dentro del período de 4 horas del ensayo.

- Además, se observó que, en las células tratadas con L-ALD/DOX y la versión con folato de direccionamiento FT-L-DOX-ALD/DOX, el examen microscópico reveló que muchas células habían sufrido lisis y no eran medibles por el ensayo de anexina y, por lo tanto, se subestimó la muerte celular.

50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un liposoma que comprende una membrana y una fase de agua intraliposómica acuosa, comprendiendo la membrana al menos un lípido que forma un liposoma y la fase de agua intraliposómica acuosa que comprende una sal de un bifosfonato y un agente anfipático de base débil que tiene un pKa igual o inferior a 11 y un logD a pH 7 en el intervalo entre -2,5 y 1,5, el agente anfipático de base débil es un agente citotóxico y es doxorubicina.
- 10 2. El liposoma de la Reivindicación 1, en el que la sal del bifosfonato y un agente anfipático de base débil se precipitan al menos parcialmente en la fase de agua intraliposómica acuosa.
3. El liposoma de cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2, en el que el bifosfonato es un bifosfonato que contiene N, preferiblemente una sal fisiológicamente aceptable de un bifosfonato que contiene N seleccionado del grupo que consiste en alendronato, pamidronato, neridronato, olpadronato, ibandronato, risedronato, zoledronato.
- 15 4. El liposoma de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, que tiene un diámetro medio de entre aproximadamente 50-150 nm y que es preferiblemente una vesícula unilaminar.
5. El liposoma de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en el que el bifosfonato es una sal fisiológicamente aceptable de un bifosfonato que contiene N seleccionado del grupo que consiste en alendronato, pamidronato, neridronato, olpadronato, ibandronato, risedronato, zoledronato.
- 20 6. El liposoma de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, que comprende un esteroles, preferiblemente un colesterol en una cantidad tal que la relación mol:mol de fosfolípido/colesterol en la membrana del liposoma está en el intervalo de entre aproximadamente 75:25 y aproximadamente 50:50.
- 25 7. El liposoma de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en el que el liposoma comprende una fracción de direccionamiento, tal como ácido fólico, LH-RH, somatostatina, transferrina o un anticuerpo específico de la diana de superficie o receptor de superficie celular, estando la fracción de direccionamiento covalentemente unida a la superficie externa del liposoma, preferiblemente a un lipopolímero.
- 30 8. Un procedimiento de co-encapsulación en un mismo liposoma de un bifosfonato y doxorubicina como un agente anfipático de base débil, comprendiendo el procedimiento:
- 35 (i) proporcionar liposomas que comprenden una membrana y una fase de agua intraliposómica acuosa, comprendiendo la membrana al menos un lípido formador de liposomas y la fase de agua intraliposómica acuosa que comprende encapsulado en la misma, un bifosfonato;
- 40 (ii) incubar los liposomas que encapsulan el bifosfonato, con una cantidad de un agente anfipático de base débil que tiene un pKa igual o inferior a 11 y un logD a pH 7 en el intervalo entre -2,5 y 1,5, siendo el agente anfipático de base débil doxorubicina, para permitir la co-encapsulación del bifosfonato y el agente anfipático de base débil mediante lo cual se forma una sal entre el bifosfonato y el agente anfipático de base débil.
9. El procedimiento de la Reivindicación 8, en el que el bifosfonato es un bifosfonato **que contiene N**, tal como alendronato, pamidronato, neridronato, olpadronato, ibandronato, risedronato o zoledronato.
- 45 10. El procedimiento de cualquiera de las Reivindicaciones 8 o 9, en el que el bifosfonato se encapsula en el liposoma rehidratando los lípidos que forman liposomas con el bifosfonato en un tampón o agua.
- 50 11. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 10, en el que la cantidad de bifosfonato y del agente anfipático de base débil en el liposoma es tal que dicha sal precipita en la fase de agua intraliposómica acuosa.
12. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 11, en el que la incubación de la etapa (ii) se realiza a una temperatura superior a 40 °C.
- 55 13. El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 12, en el que la cantidad del agente anfipático de base débil introducida en la suspensión es tal que la relación molar entre el agente anfipático de base débil y el bifosfonato está entre 0,1 y 2.
- 60 14. Liposomas como se definen en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, para uso en el tratamiento de una afección patológica.
15. El liposoma de la Reivindicación 14, para su uso en combinación con células inmunes, preferiblemente linfocitos, tales como células T $\gamma\delta$, y opcionalmente en combinación con al menos una citocina, tal como IL-2, IL-4 e IL-15.

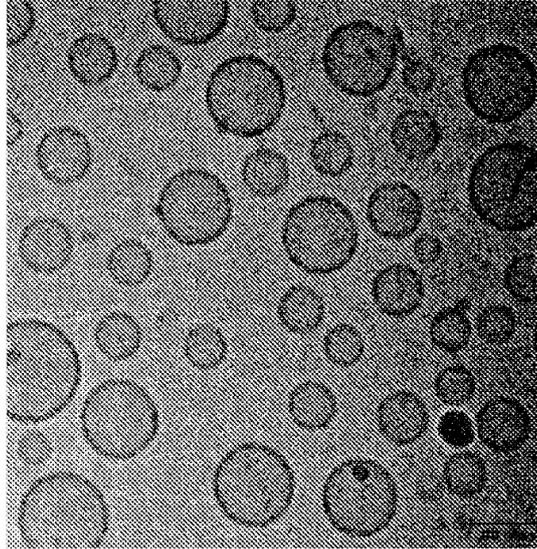


Figura 1A

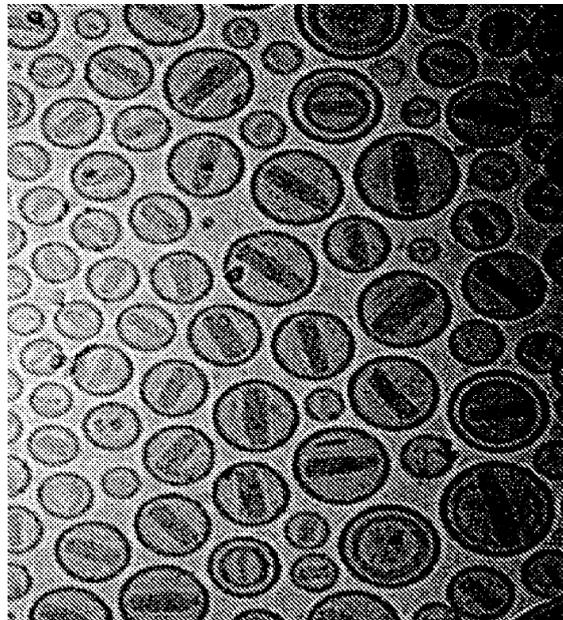


Figura 1B

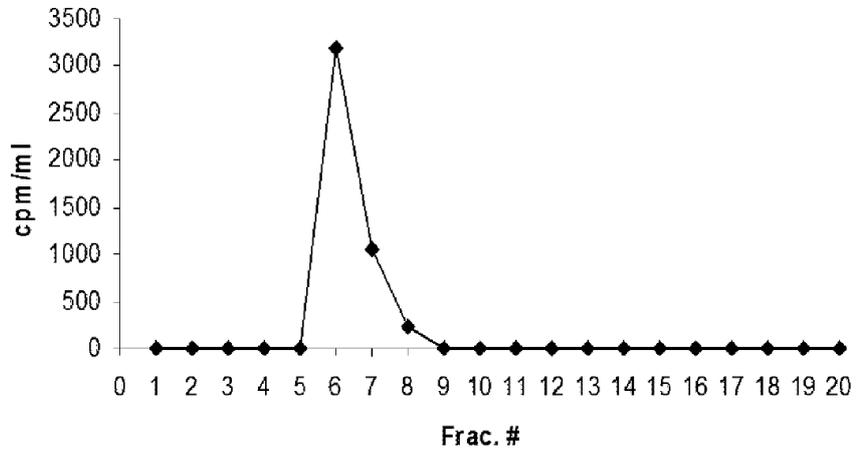


Figura 2A

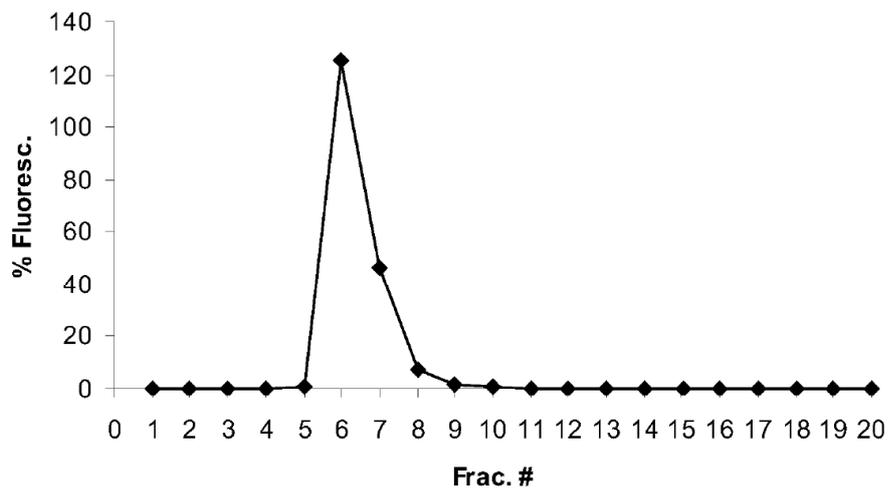


Figura 2B

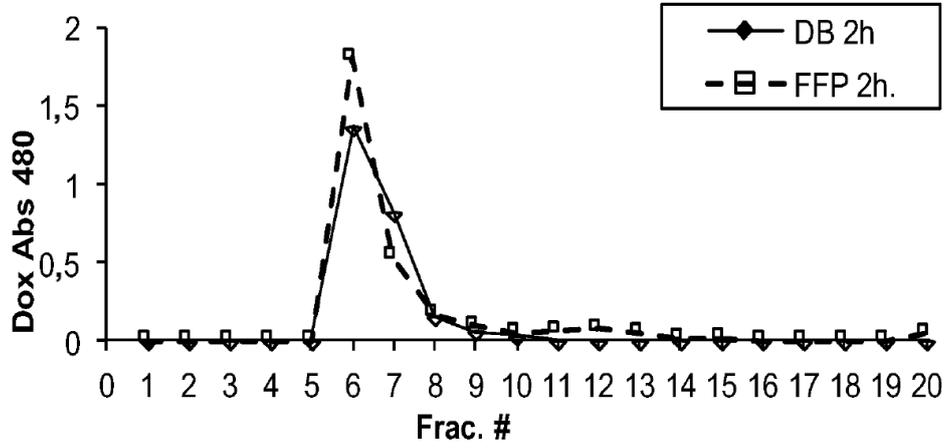


Figura 2C

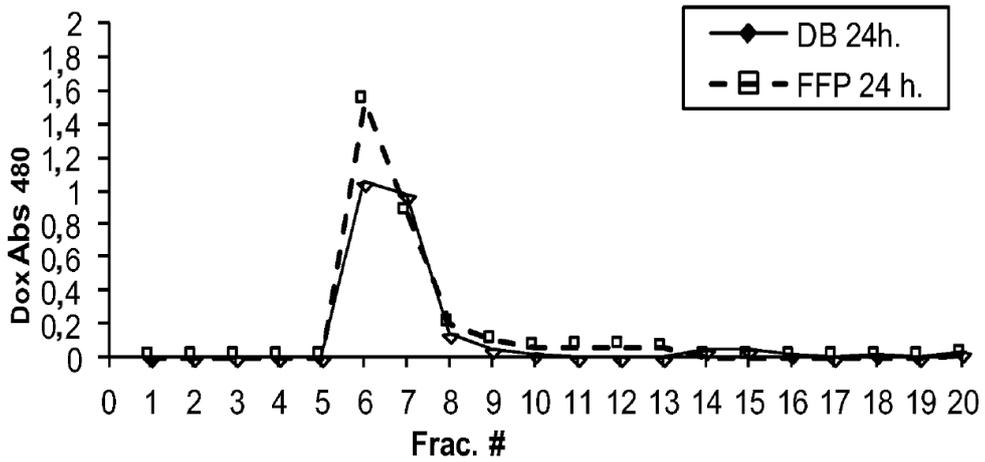


Figura 2D

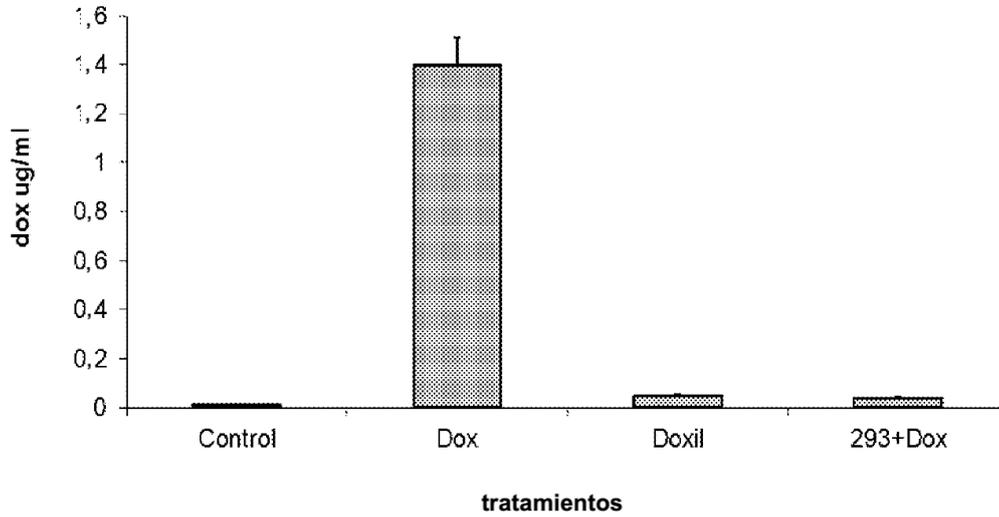


Figura 3A

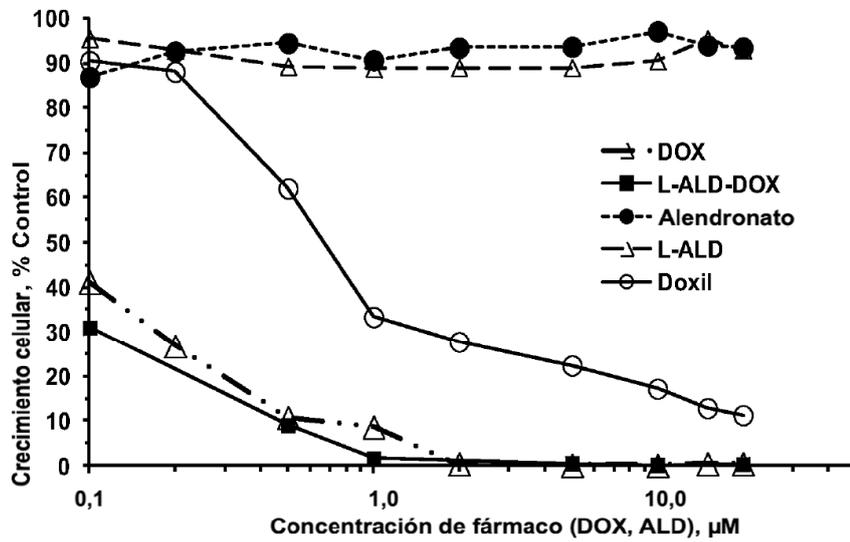


Figura 3B

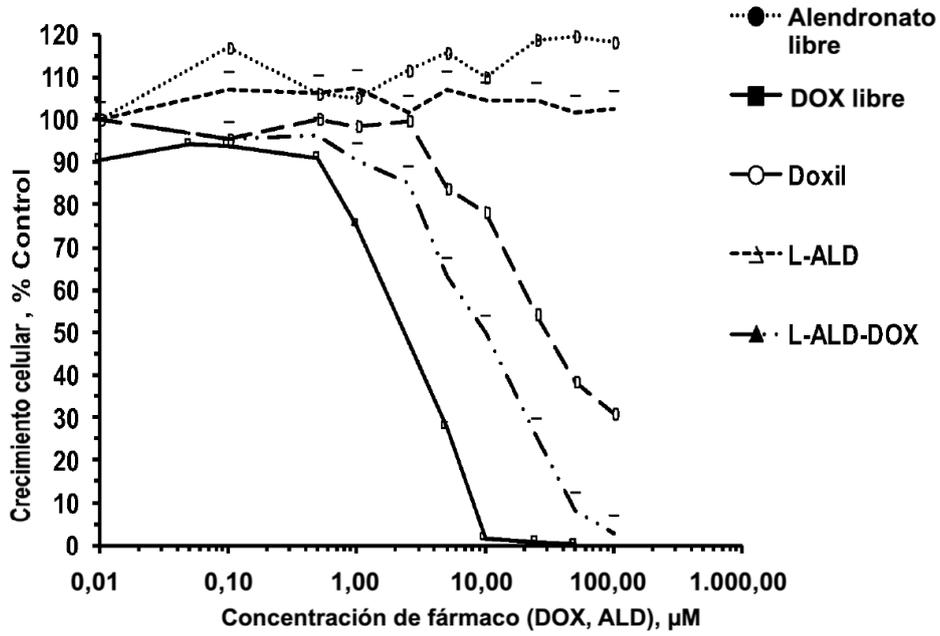


Figura 3C

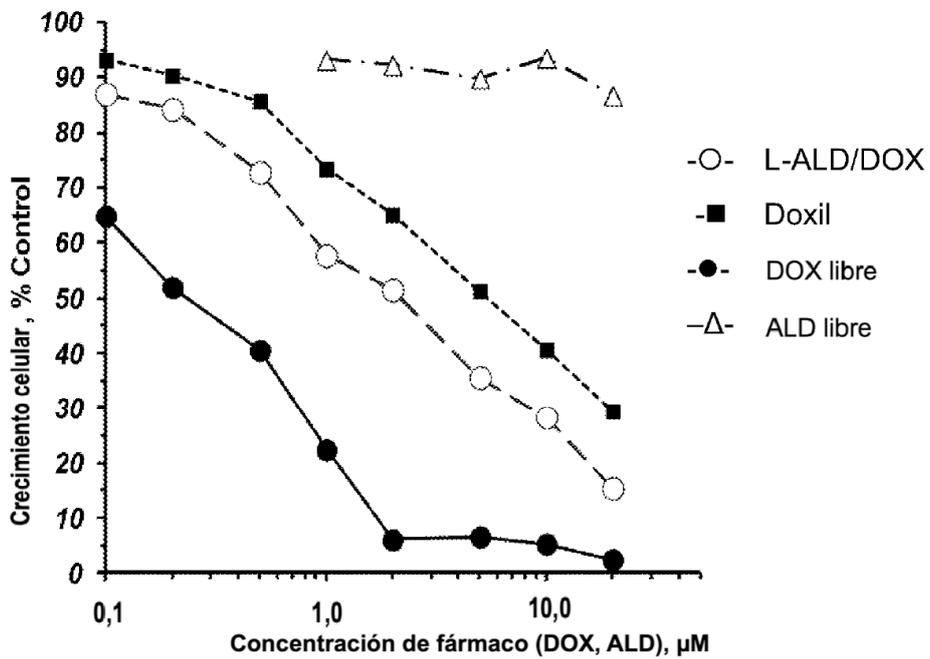


Figura 3D

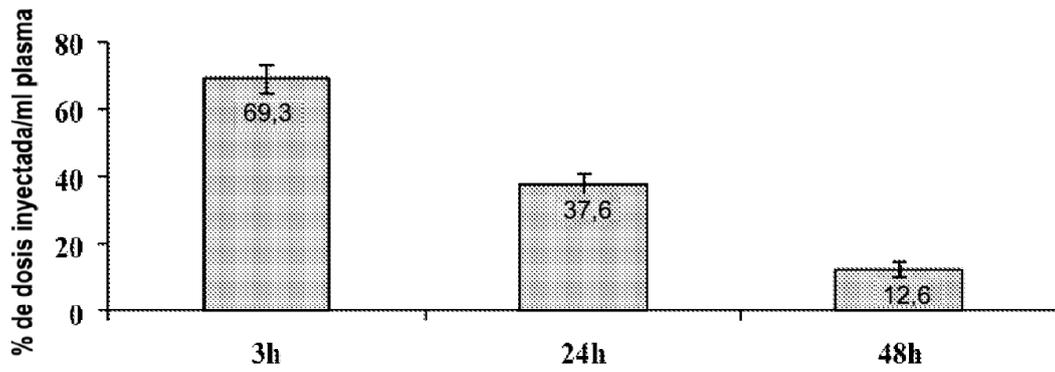


Figura 4A

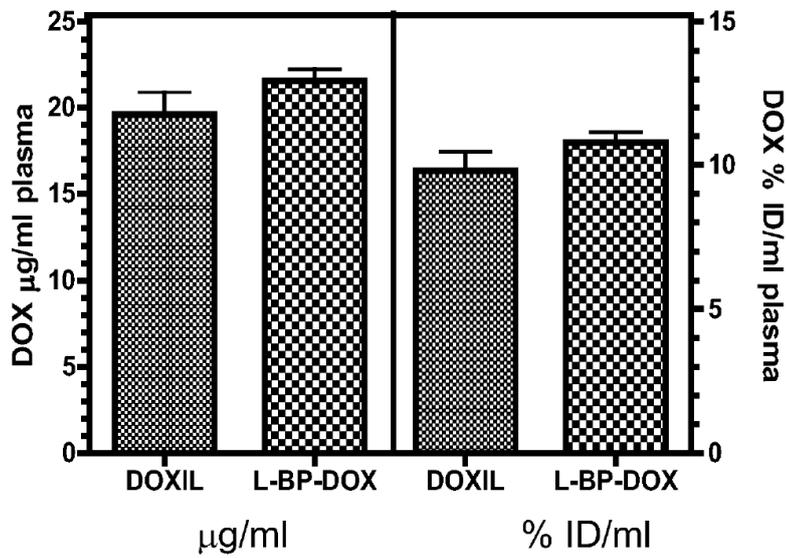


Figura 4B

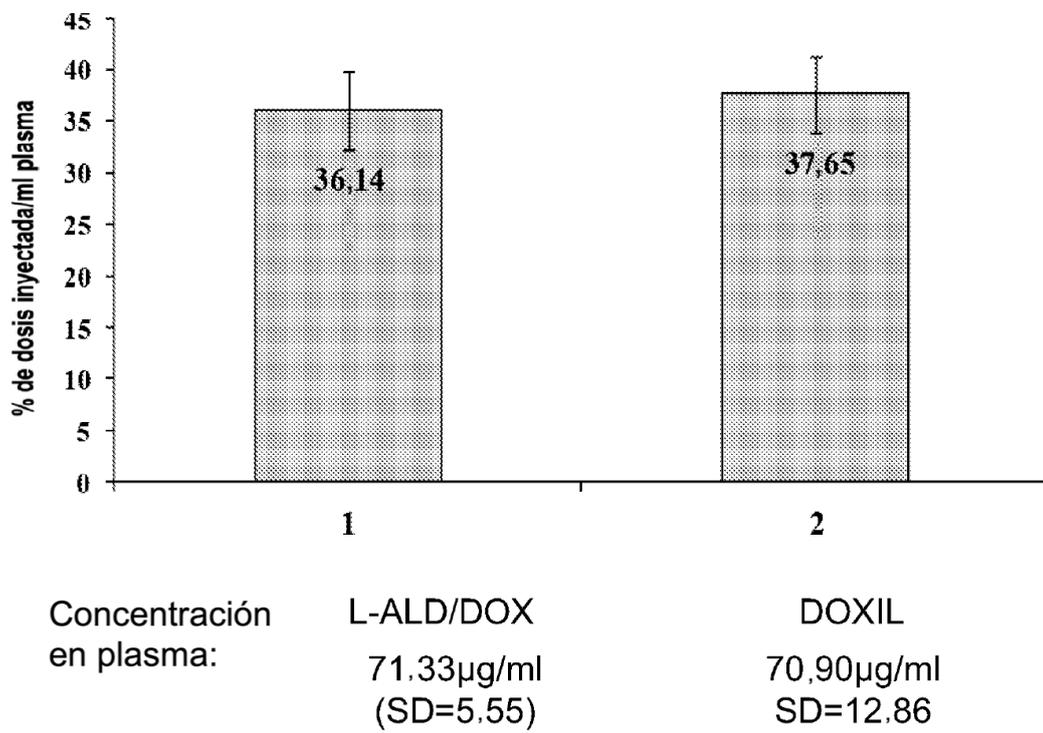


Figura 4C

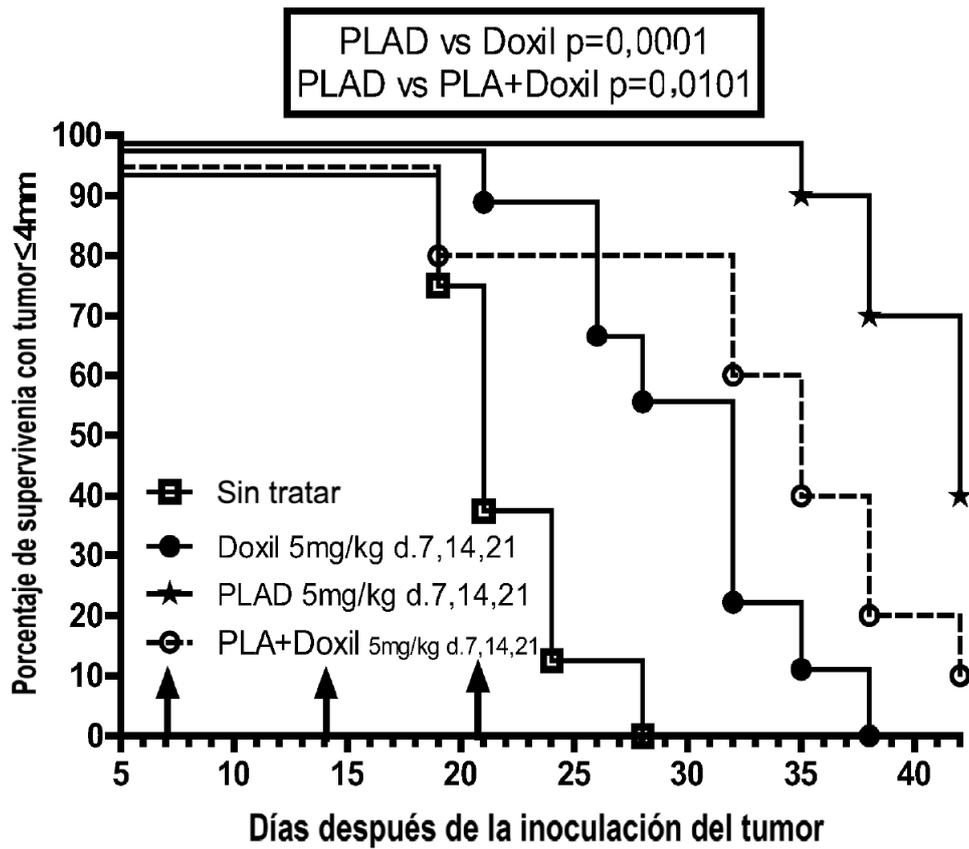


Figura 5A

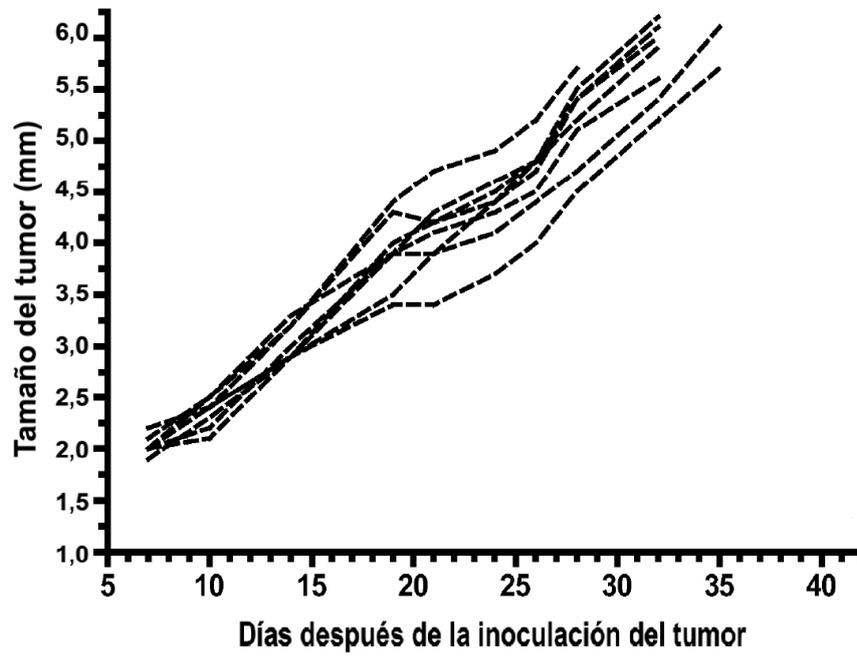


Figura 5B

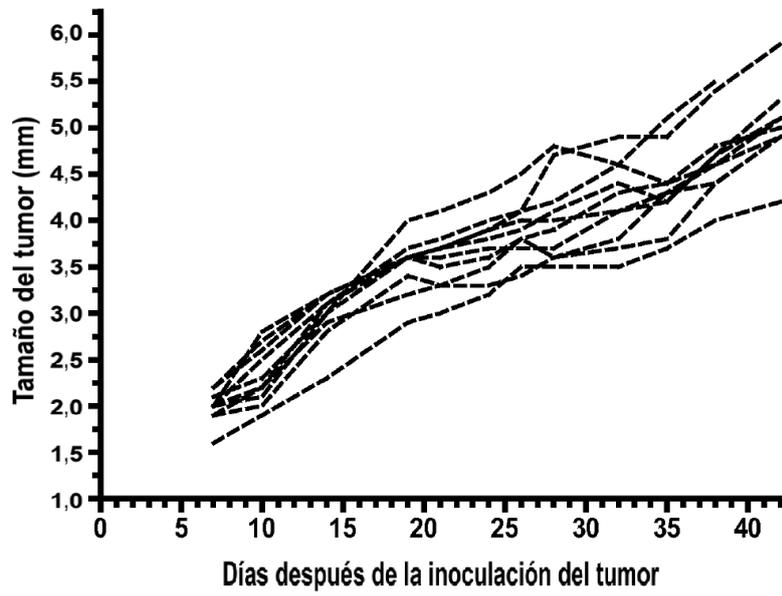


Figura 5C

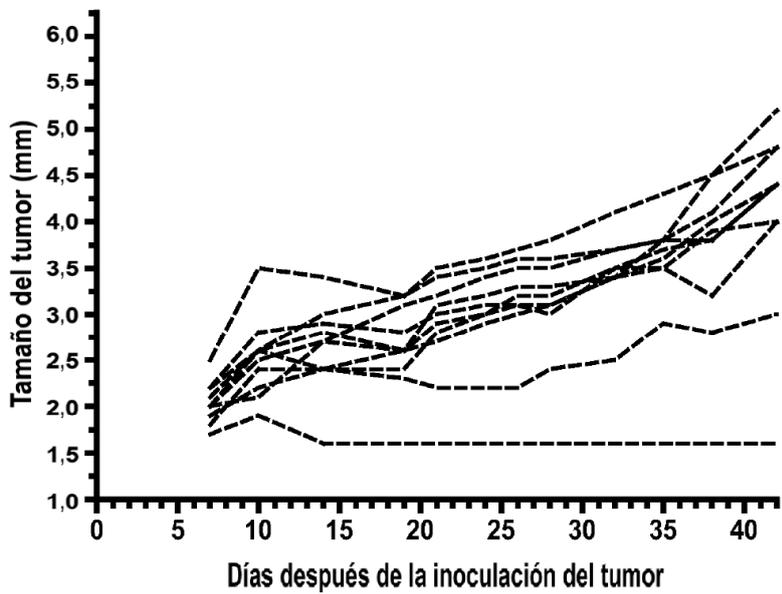


Figura 5D

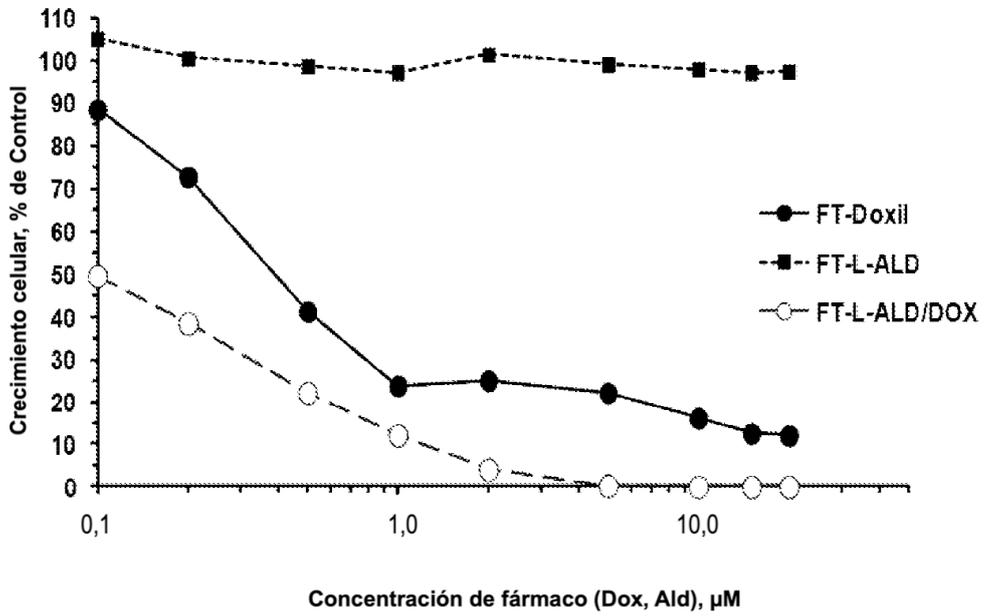


Figura 6

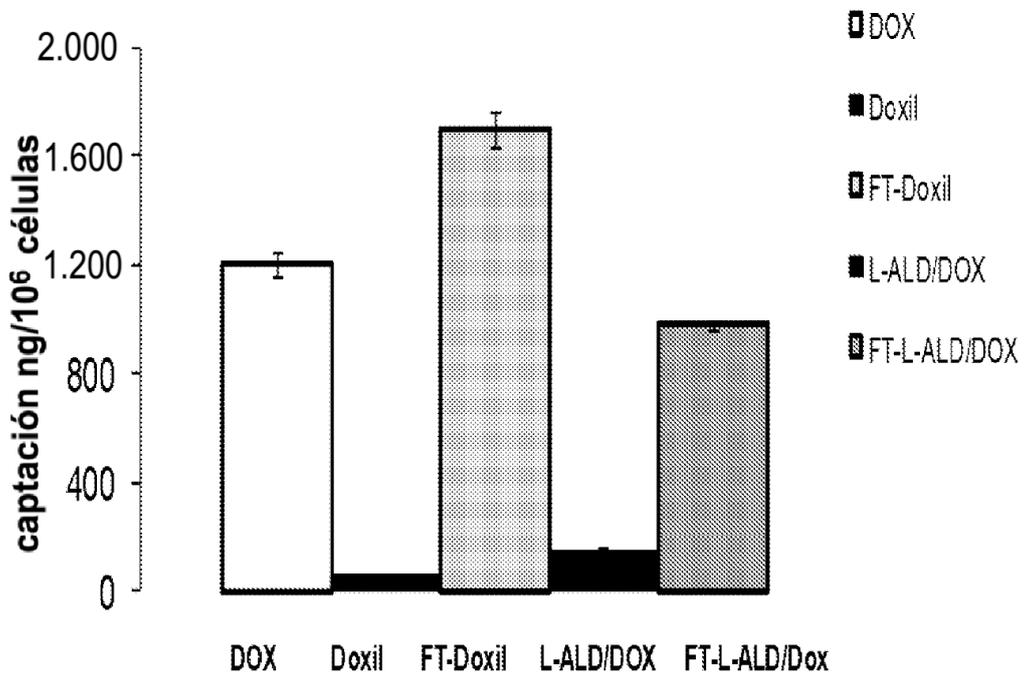


Figura 7

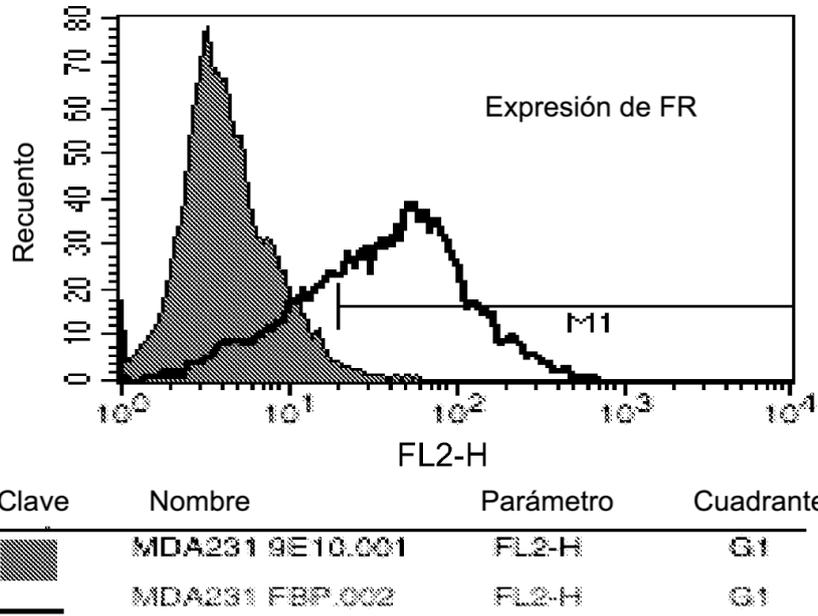


Figura 8A

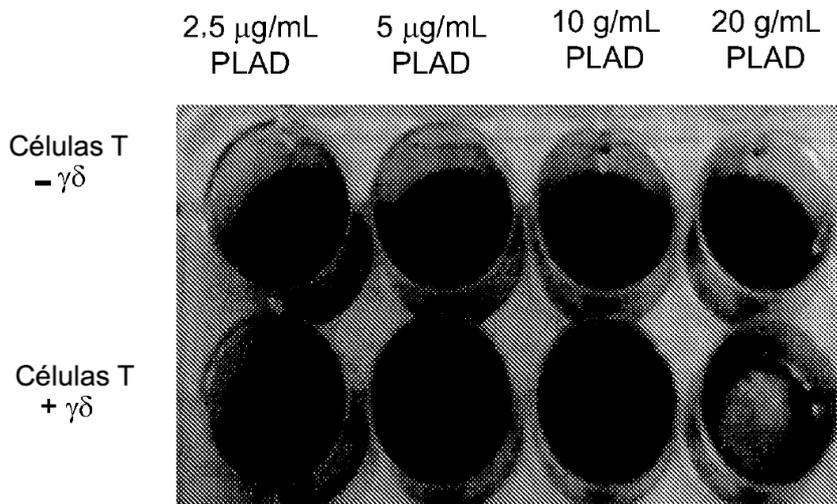


Figura 8B

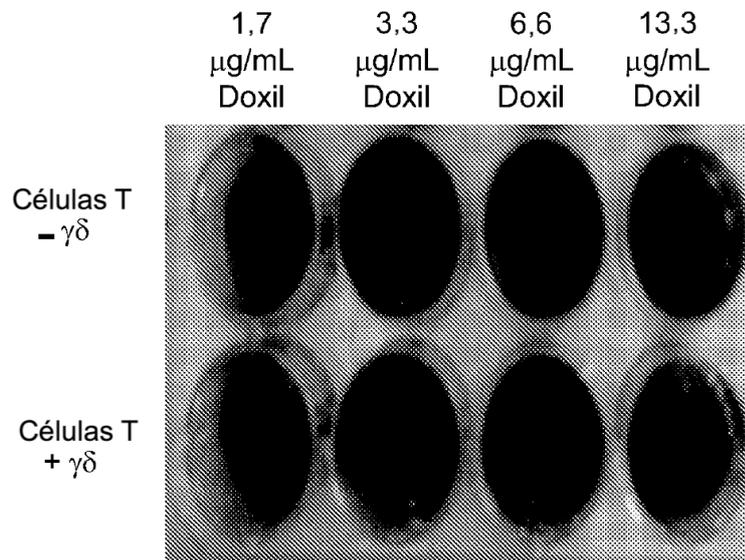


Figura 8C

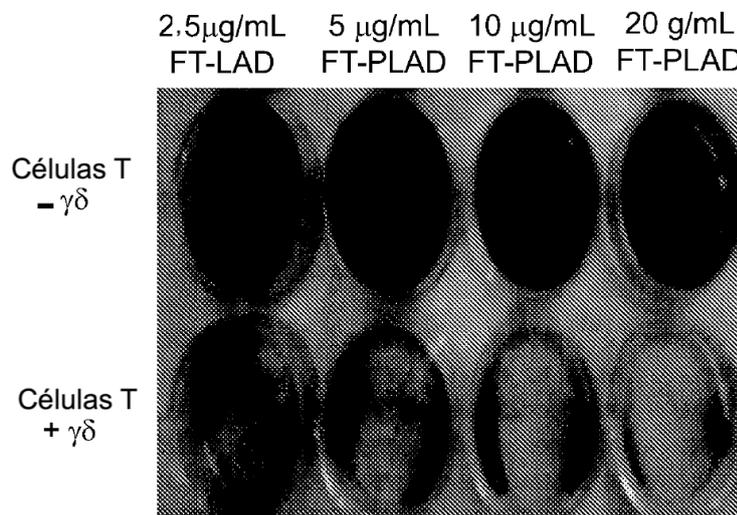


Figura 8D

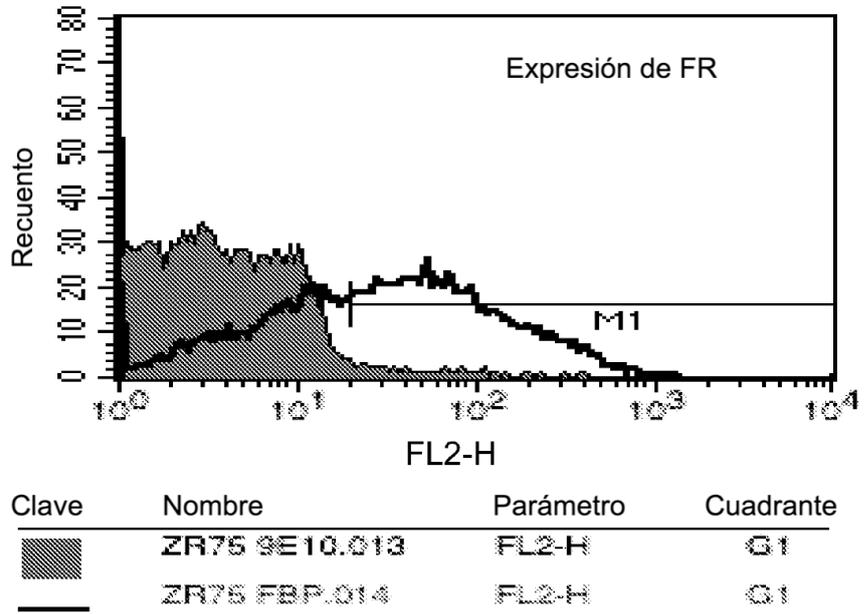


Figura 9A

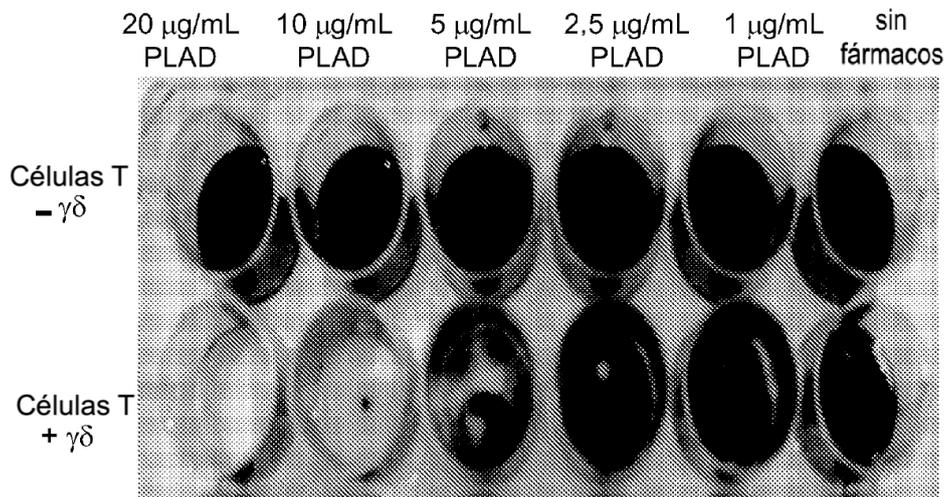


Figura 9B

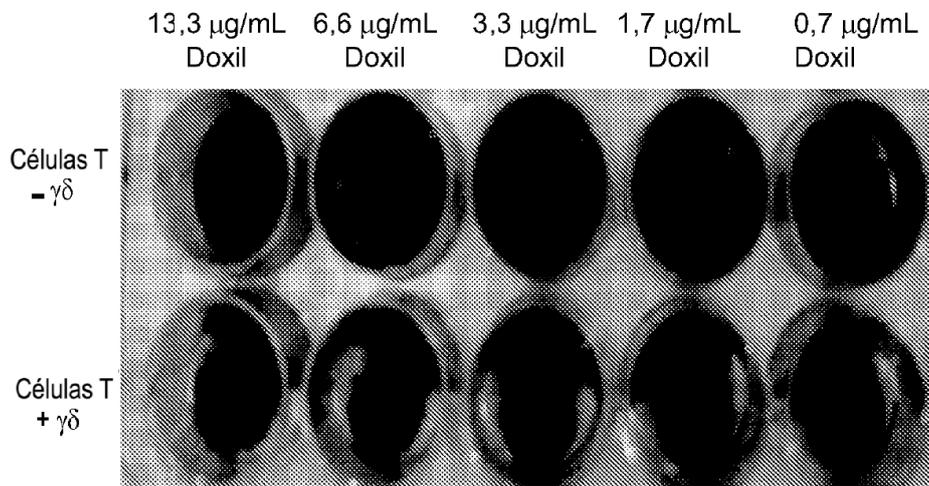


Figura 9C

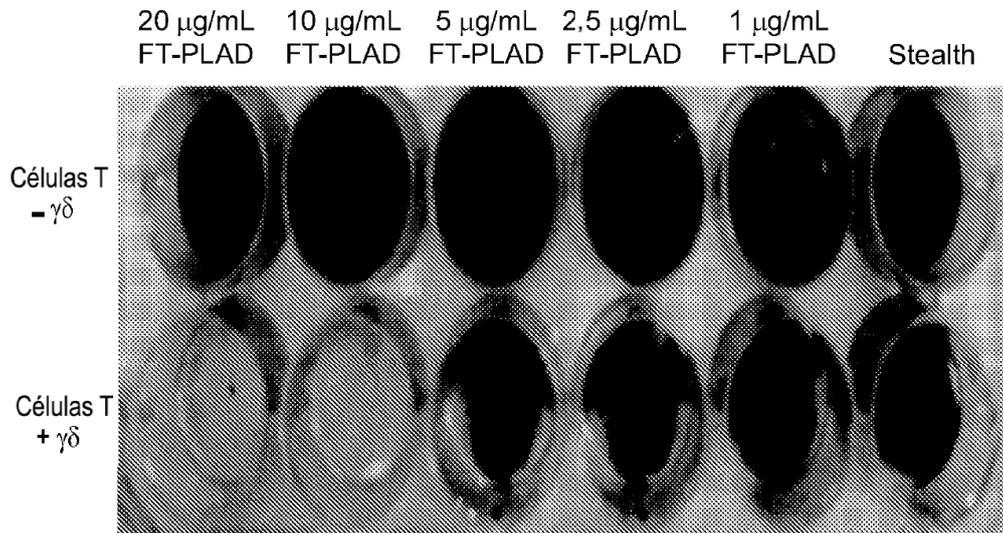


Figura 9D

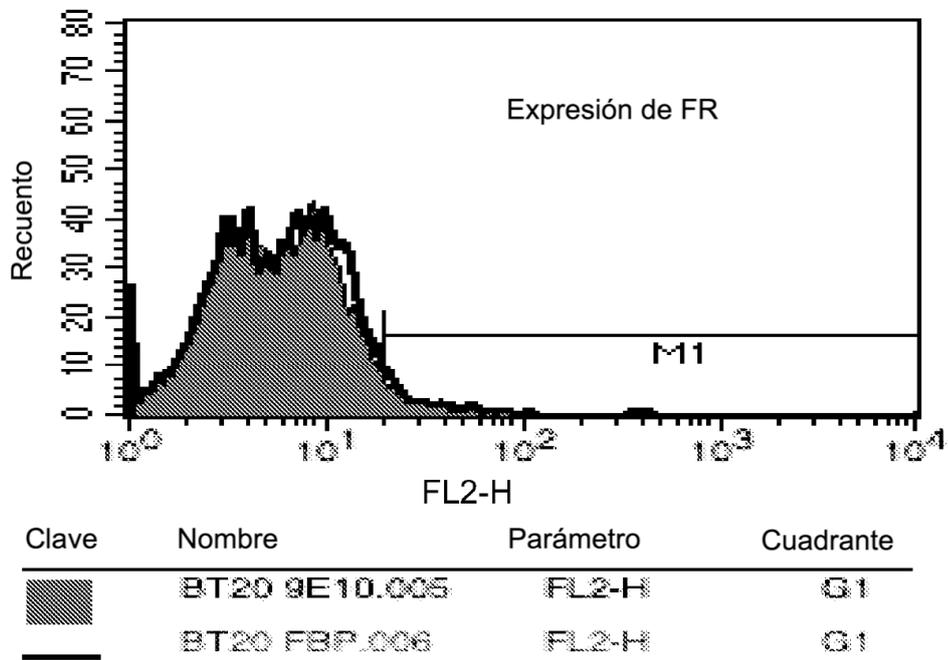


Figura 10A

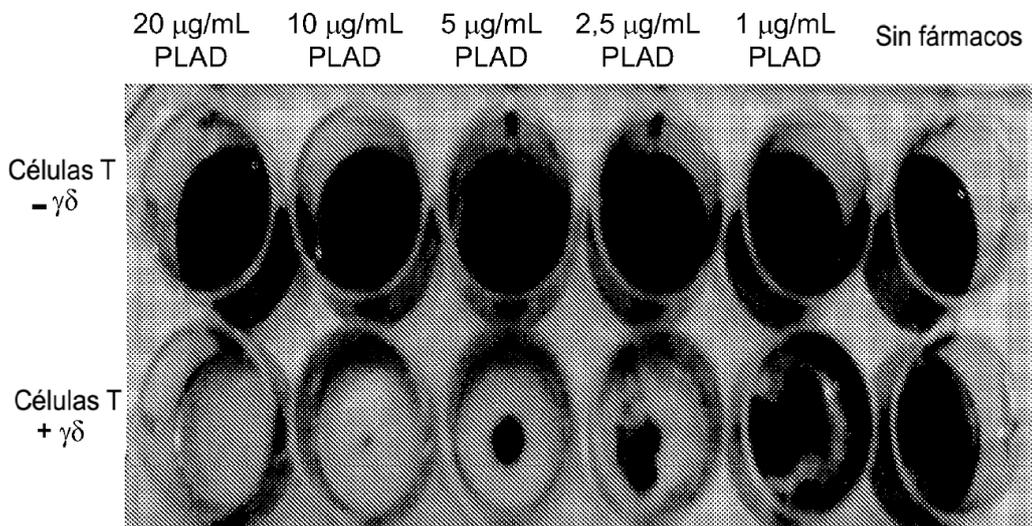


Figura 10B

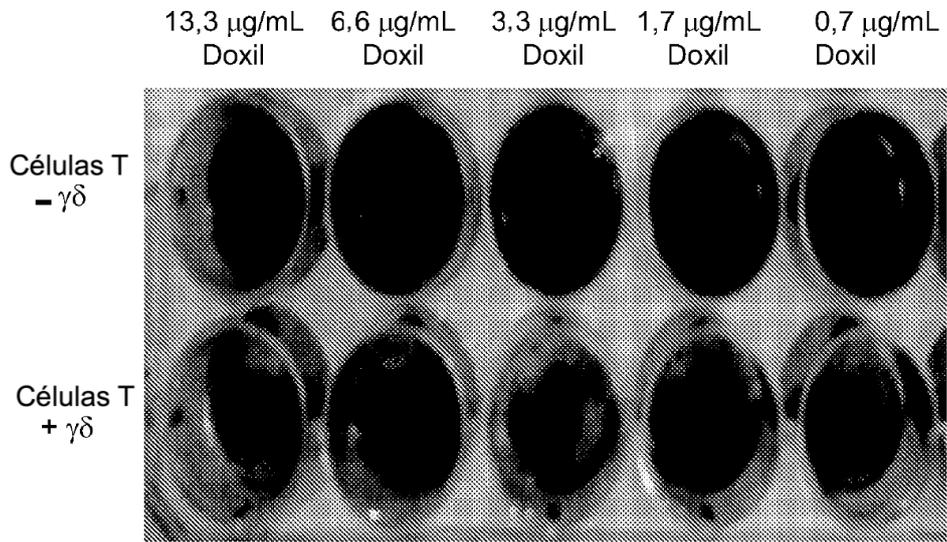


Figura 10C

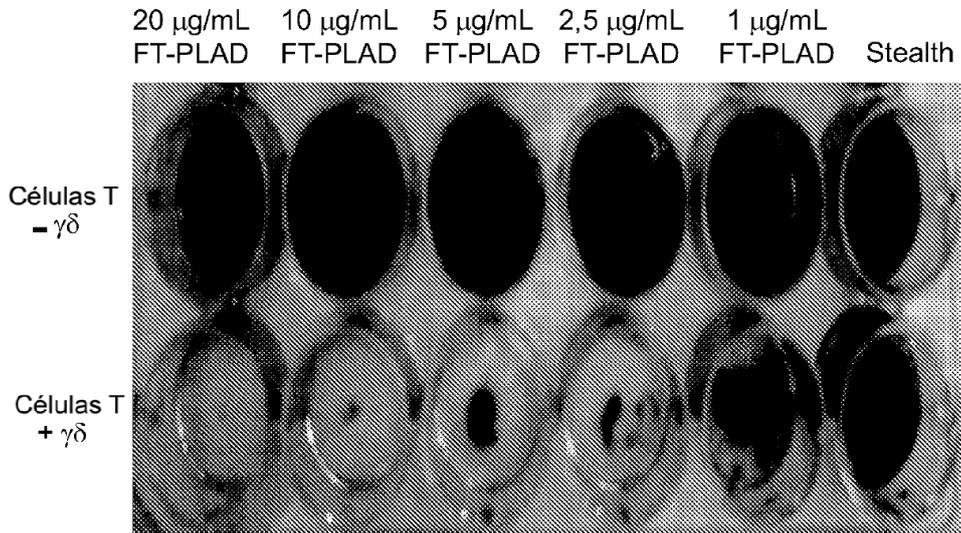


Figura 10D

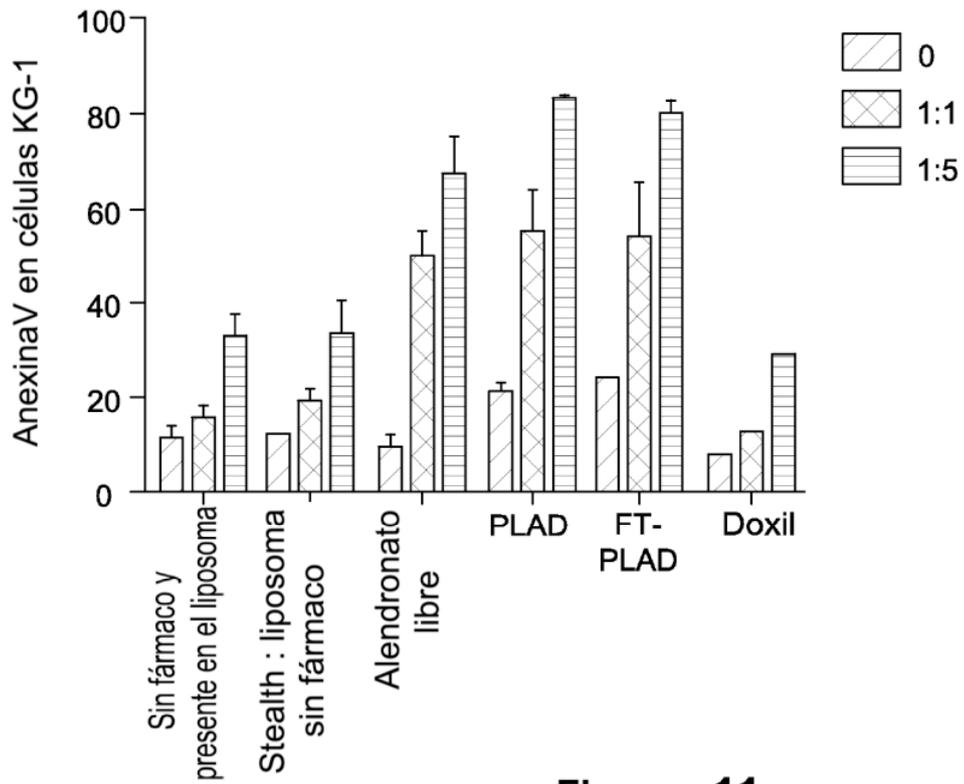


Figura 11