

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 184**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4164** (2006.01)

**A61K 31/4184** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 47/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02713920 .3**

96 Fecha de presentación: **20.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1379242**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2004**

54 Título: **Método para el tratamiento del cáncer y composiciones para su uso en el mismo**

30 Prioridad:

**26.03.2001 US 278435 P**  
**30.03.2001 CA 2342470**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**19.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**19.12.2012**

73 Titular/es:

**NEWSOUTH INNOVATIONS PTY LIMITED**  
**(100.0%)**  
**UNIVERSITY OF NEW SOUTH WALES RUPERT**  
**MYERS BUILDINGS GATE 14, BARKER STREET**  
**KENSINGTON NSW 2052, AU**

72 Inventor/es:

**MORRIS, DAVID LAWSON y**  
**POURGHOLAMI, MOHAMMAD HOSSEIN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 393 184 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

Método para el tratamiento del cáncer y composiciones para su uso en el mismo

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento de tumores, particularmente el tratamiento del cáncer de ovario.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El carcinoma hepatocelular (HCC; hepatoma) es uno de los tumores malignos más comunes y una de las primeras causas de muerte a nivel mundial (1–3). Si no se trata, el HCC tiene habitualmente un pronóstico desalentador. La resección quirúrgica sigue siendo la base principal para el tratamiento del HCC y proporciona la única supervivencia libre de tumor a largo plazo consistente (4). Sin embargo, la resección ha estado limitada principalmente por unos índices de capacidad de resección bajos y una enfermedad recurrente. La quimioterapia sistémica tiene un valor limitado como modalidad de tratamiento primario para el HCC, debido a que sólo una pequeña parte de los pacientes obtendrá un alivio significativo con los fármacos y regímenes disponibles en la actualidad (2, 4, 5) y debido a que, a menudo, la toxicidad de los agentes quimioterapéuticos disponibles actualmente supera sus limitados beneficios (6). Además, el hígado es el sitio más común para la metástasis del carcinoma colorrectal, que es en sí misma la primera causa de muerte por cáncer en no fumadores en el mundo desarrollado (7).

20 El albendazol (ABZ; 5–propiltio–1H–benzimidazol–2–il–carbamato de metilo) es un antihelmíntico de carbamato de benzimidazol (BZ) desarrollado como un producto veterinario en 1975. Los BZ son en la actualidad unos importantes fármacos de amplio espectro para el control de los parásitos helmintos en mamíferos. Éstos son efectivos frente a vermes pulmonares y nemátodos gastrointestinales, tenias y fasciolas hepáticas (8). La acción antihelmíntica intrínseca de los compuestos de benzimidazol sobre el parásito se basa en una interrupción progresiva de las funciones celulares básicas como resultado de su unión a la tubulina del parásito y la despolimerización de los microtúbulos. Sin embargo, para estos compuestos se ha descrito también una serie de otros mecanismos, incluyendo la interrupción de la captación y el metabolismo de la glucosa (9–11).

25 Pourgholumi y col. (Cancer Letters 2001, 165, 43–49) describe la supresión *in vitro* e *in vivo* del crecimiento de células de carcinoma hepatocelular mediante albendazol. No se describe el uso del albendazol para tratar el cáncer de ovario.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

30 Los inventores de la presente invención sometieron a prueba los BZ y, en particular, el albendazol frente a una variedad de líneas celulares de cáncer colorrectal (C–170, HT–29 y LOVO) y de hígado (HepG2, Hep3B, PLC/PRF/5, SKHEP–1, Hep1–6, HTC, Novikoff). Los resultados obtenidos muestran una inhibición potente y dependiente de la dosis de la proliferación de estas células mediante albendazol (y varios otros BZ). El albendazol fue efectivo frente a todas las líneas celulares humanas y animales examinadas, y a lo largo de un periodo de tratamiento de 5 días, la incorporación de la [<sup>3</sup>H] timidina se redujo en más del 80 % (intervalo del 81,6 – 99,4 %) en la totalidad de éstas líneas celulares.

35 Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento, tal como se describe en la reivindicación 1.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40 **Figura 1.** Estas figuras se presentan junto con unos ejemplos de referencia, para la comprensión útil de la presente invención. La incorporación de la [<sup>3</sup>H] timidina [expresada como recuentos por minuto (CPM)] en células de SKHEP–1 se midió o bien (a) inmediatamente después de un tratamiento de 1 día con albendazol, o bien (b) después de un tratamiento de 1 día con albendazol seguido de un tratamiento de 4 días con el medio solo (sin contener el fármaco). Los puntos de datos son la media ± EEM.

45 **Figura 2.** Estas figuras se presentan junto con unos ejemplos de referencia, para la comprensión útil de la presente invención. Efectos con el curso del tiempo del albendazol sobre el número de células de SKHEP–1. Se trataron células creciendo en unas placas de 6 pocillos durante 1, 3 o 5 días con albendazol (0, 100, 500 ó 1.000 nM) y el número de células viables se sometió a recuento usando el método de exclusión de azul de tripano. Los puntos de datos son la media ± EEM.

50 **Figura 3.** Estas figuras se presentan junto con unos ejemplos de referencia, para la comprensión útil de la presente invención. Efecto del albendazol sobre la fase de ciclo celular de las células de SKHEP–1. Las células se trataron con unas concentraciones diferentes de albendazol (0, 100, 250, y 1.000 nM) durante 3 días, se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron para determinar el contenido de ADN mediante citometría de flujo. Un total de 10/000 núcleos se analizaron a partir de cada muestra. Los puntos de datos son la media ± EEM del porcentaje de células dentro de las fases G0–G1, S y G2–M del ciclo celular.

55 **Figura 4.** Estas figuras se presentan junto con unos ejemplos de referencia, para la comprensión útil de la presente

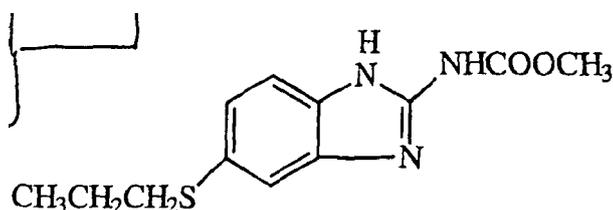
invención. Efecto de diferentes dosis de albendazol (0, 50, 150 y 300 mg/kg/día en dos dosis divididas administradas por vía oral en aceite de sésamo) sobre la formación y el crecimiento tumoral subcutáneo de SKHEP-1 en ratones desnudos. Los cambios en los volúmenes tumorales se midieron cada 3 días. Cada valor representa la media  $\pm$  EEM de 10 animales.

5 **Figura 5.** Inhibición en función de la concentración de la captación (proliferación) de [ $^3$ H] timidina de la línea celular de cáncer de ovario (OVCAR-3) mediante albendazol *in vitro*.

10 **Figura 6.** Estas figuras se presentan junto con unos ejemplos de referencia, para la comprensión útil de la presente invención. Niveles de marcador tumoral en suero (AFP o CEA) en pacientes con tumores de hígado (CRC o HCC) sometidos a tratamiento con albendazol (10 mg / kg / día en dos o tres dosis orales divididas) durante 28 días. La flecha indica el comienzo de la terapia.

**Figura 7.** Estas figuras se presentan junto con unos ejemplos de referencia, para la comprensión útil de la presente invención. Recuento de leucocitos en suero (WCC) en pacientes con tumores de hígado (CRC o HCC) sometidos a tratamiento con albendazol (10 mg / kg / día en dos o tres dosis orales divididas) durante 28 días.

La composición para su uso en la presente invención comprende albendazol:



15 o un sulfóxido o sulfona del mismo. La composición es para su uso en un método de tratamiento de un cáncer de ovario en un sujeto.

El método puede usarse para tratar un cáncer primario o secundario.

20 El método puede incluir un tratamiento concomitante con un potenciador del efecto del compuesto de benzimidazol sobre el cáncer. El potenciador puede ser un compuesto de isoquinolina (por ejemplo, praziquantel) o cualquier otro compuesto que aumente o se suma a la efectividad del fármaco.

25 El albendazol se absorbe mal a partir del tracto gastrointestinal y también experimenta rápidamente un metabolismo de primer paso extensivo. En todo momento después de la administración de una dosis oral de 400 mg, la concentración del fármaco sin cambios ha estado por debajo de los límites de detección (18). Esto se debe principalmente al metabolismo rápido y extensivo del fármaco en el hígado. Se ha observado que todos de la hidrólisis del resto de carbamato y la oxidación del átomo de azufre, el anillo aromático y la cadena lateral de alquilo tienen lugar en el hombre. Cinco metabolitos mayores se han identificado en la orina humana, de los cuales el sulfóxido de albendazol es el mayor. El sulfóxido es biológicamente activo y contribuye a la actividad del fármaco. Éste alcanza unas concentraciones en plasma de pico de aproximadamente 200–300 ng/ ml y tiene una semivida en plasma de aproximadamente 8–9 horas. Junto con otros metabolitos, éste se excreta principalmente en la orina, excretándose una pequeña cantidad en las heces (18, 19).

30 Como resultado de este metabolismo extensivo, el fármaco precursor es virtualmente indetectable en el cuerpo, y su efecto antihelmíntico parece ejercerse en parte por la parte no absorbida que queda en el intestino y, en parte, por el metabolito de sulfóxido activo que se forma en el hígado. Sin embargo, para ser efectivo en el tratamiento del HCC, una concentración de más de 100 nM ha de estar disponible en la proximidad inmediata de las células tumorales, lo que significa que, para alcanzar unas concentraciones antitumorales efectivas y sostenidas de albendazol, han de administrarse unas dosis grandes y frecuentes.

35 En segundo lugar, el uso del fármaco como un antihelmíntico se ha asociado con una serie de efectos secundarios, incluyendo insuficiencia epigástrica leve y transitoria, diarrea, náuseas, mareos, lasitud e insomnio en tratamientos a corto plazo, y una elevación de las transaminasas de bajo grado reversible, ictericia, síntomas gastrointestinales, alopecia, sarpullidos o prurito y leucopenia se han notificado en pacientes sometidos a unos ciclos de tratamiento de 3 meses para la hidatidosis. Los estudios de toxicidad a largo plazo en animales mostraron diarrea, anemia, hipotensión, depresión de la médula ósea, anomalías de la función hepática y toxicidad fetal, variando por especie (13).

45 Los inventores de la presente invención creen que la administración regional del compuesto de benzimidazol al hígado puede resolver las limitaciones que se mencionan anteriormente en el empleo del fármaco en el método de tratamiento de la presente invención. Los inventores de la presente invención también creen que este beneficio puede obtenerse también a través de la administración regional del compuesto de benzimidazol al cáncer de ovario.

50 La administración regional del compuesto de benzimidazol se logra administrando el compuesto en una formulación farmacéuticamente aceptable. La composición puede administrarse como una infusión continua de una disolución

por medio de una bomba a través de la arteria principal del órgano enfermo.

La formulación comprende un lípido. Se prefieren particularmente los lípidos para los que el tumor muestra avidez, de tal modo que pueden administrarse unas altas concentraciones del fármaco al tumor.

5 Preferiblemente, el lípido es un aceite. Preferiblemente, la formulación comprende un aceite yodado. Un aceite yodado particularmente preferido es el lipiodol, un éster de etilo yodado del aceite de semilla de amapola.

10 En comparación con la administración sistémica, la administración regional usando un lípido tal como el lipiodol permite el logro de unas concentraciones de fármaco más altas en el sitio del tumor a la vez que se reduce el grado de exposición de otros órganos corporales a los efectos no deseados del fármaco y, en consecuencia, se reduce el número y la gravedad de los efectos secundarios. En el HCC, esto puede hacerse incluso más selectivo y efectivo eligiendo el lipiodol como el vehículo para la administración del fármaco.

15 EL HCC se describe a continuación para la comprensión útil de la presente invención. Cuando se inyecta en la arteria hepática, el aceite se retiene por los HCC durante de varias semanas a más de un año, pero se elimina del parénquima de un hígado normal en un plazo de 7 días. Sin pretender restringir la presente invención en modo alguno, una de las hipótesis al intentar explicar la retención de lipiodol en los HCC sugiere que estas células son incapaces de eliminar el lipiodol debido a que las mismas carecen de un componente de célula de Kupffer reticulo-  
endotelial. Los inventores de la presente invención han mostrado previamente que componentes de la vitamina D *in vitro*, tal como la 1, 25-dihidroxitamina D3 disuelta en lipiodol, producen un efecto de inhibición profundo y sostenido sobre las células de HepG2 cuando se inyectan a través de la arteria hepática de ratas portadoras de tumor, el fármaco se retiene dentro del tumor (véanse los documentos WO 98/56337 y WO 99156697).

20 Basándose en la experiencia de los inventores de la presente invención con las líneas celulares de albendazol, lipiodol y hepatoma, éstos creen que la administración de albendazol disuelto en un aceite tal como lipiodol y administrado a través de la arteria intrahepática conducirá a la liberación sostenida del fármaco a partir del aceite dentro de las células tumorales, lo que conduce a la inhibición sostenida de la proliferación de las células tumorales.

25 Estas características únicas del lipiodol acopladas con la potencia y solubilidad en lípidos del albendazol, hace la combinación una formulación atractiva para la administración arterial intrahepática en pacientes con HCC.

Preferiblemente, el compuesto de benzimidazol está presente en la composición en una concentración de por lo menos aproximadamente 0,1 M. La concentración del compuesto de benzimidazol se encuentra preferiblemente el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 M.

30 La composición de la invención puede incluir un potenciador del efecto del compuesto de benzimidazol sobre el cáncer. El potenciador puede ser, por ejemplo, praziquantel o cualquier otro compuesto que aumente la efectividad del fármaco, que tenga un efecto aditivo con éste, o que reduzca sus efectos secundarios.

35 A través de la totalidad de la presente memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo/ que comprende", implican la inclusión de un elemento, entero o etapa indicado, o grupo de elementos, enteros o etapas; pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

Con el fin de que la naturaleza de la presente invención pueda entenderse más completamente, la invención se describirá a continuación con referencia a las siguientes realizaciones no limitantes.

#### **EJEMPLO DE REFERENCIA 1**

Supresión *in vitro* e *in vivo* del crecimiento de las células de carcinoma hepatocelular mediante albendazol

#### **40 Materiales y Métodos**

##### *Cultivo celular*

45 Se obtuvieron células HepG2, Hep3-B, Hep1-6, SKHEP-1, PLC/PRF/5, y HTC de la Colección Europea de Cultivos celulares (ECACC; RU.), Novikoff se obtuvo del Centro para la Investigación del Cáncer (DKFZ), Heidelberg, Alemania. Las células se cultivaron en MEM o DMEM complementado con 10 % de FBS, 50 unidades / ml de penicilina, 50 unidades/ ml de estreptomina, 25 µg/ ml de anfotericina B (Gibco, Grand Island, NY) y se mantuvo subconfluente a 37 °C en unas incubadoras humidificadas que contenían un 5 % de CO<sub>2</sub>. El albendazol (Sigma, filial australiana) se disolvió en etanol absoluto a unas concentraciones que fueron 1.000 veces más altas que la concentración en el medio final.

##### *Ensayo de incorporación de la [<sup>3</sup>H] timidina*

50 Para el estudio de la incorporación de la [<sup>3</sup>H] timidina, se colocaron células adherentes (5-10 x 10<sup>4</sup>) sobre unas placas de cultivo de tejido Corning de 24 pocillos y se expusieron a un medio de cultivo (5 % de FBS) que contenía el vehículo (0,1 % de etanol) o unas concentraciones diferentes de albendazol (de 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-6</sup> M). Para Novikoff, una línea celular de rata separada, 2.500 células se suspendieron en 2 ml de DMEM (5 % de FBS) y se mantuvieron

bajo la misma condición que para las células unidas. Los medios se sustituyeron con medios nuevos en días alternos. Al final del periodo de tratamiento (5 días), los cultivos celulares se evaluaron para la incorporación de la timidina mediante la adición de 0,5  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ] timidina (60 Ci/mmol. ICN Biochem, Irvine, CA) a cada pocillo durante las últimas 4 h de cultivo. La cantidad de radioactividad incorporada en las células se determinó usando un contador de centelleo  $\beta$ . Los resultados se presentan como el porcentaje de la incorporación de la [ $^3\text{H}$ ] timidina en relación con el control. Para los experimentos de recuperación, se trataron células de SKHEP-1 durante 1 día con unas concentraciones diferentes de albendazol y a continuación o bien se evaluaron para la incorporación de la [ $^3\text{H}$ ] timidina o bien el medio se sustituyó y las células se trataron con un medio nuevo sin el fármaco durante 4 días más, al final de los cuales se realizó el ensayo de incorporación de la [ $^3\text{H}$ ] timidina.

#### 10 *Recuentos celulares*

Se colocaron células de SKHEP-1 ( $2,5 \times 10^4$ ) en unas placas de seis pocillos. El procedimiento de tratamiento de células era tal como se describe para el ensayo de timidina. Al final del periodo de tratamiento (1, 3 o 5 días), las células se tripsinizaron y se sometieron a recuento con un hemocitómetro usando el método de exclusión de azul de tripano. En todos los experimentos, las células tratadas con el medio que contenía un 0,1 % de etanol se tomaron como el control para las células tratadas con albendazol. Todos los recuentos se obtuvieron por cuadruplicado y cada experimento se repitió por lo menos dos veces.

#### *Análisis de ciclo celular*

Se colocaron células de SKHEP-1 ( $5 \times 10^4$ ) sobre unas placas de cultivo de tejidos de seis pocillos. Se trataron unas muestras por triplicado con las concentraciones indicadas de albendazol (100, 250 y 1.000 nM). El medio se cambió cada día. Después de 72 h, se recogieron las células del grupo pertinente, se lavaron dos veces con tampón de fosfato y se trataron con ribonucleasa, Triton X-100 y yoduro de propidio (Sigma), basándose en el método que describe Taylor [12]. El porcentaje de células dentro de las fases G1, S, y G2-M del ciclo celular se determinó usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson FACSort) y un software de análisis de ciclo celular Multifit LT (Verity Software INC.)

#### 25 *Formación tumoral en ratones desnudos*

Se inocularon ratones BALB/c Nu/Nu machos de 6 a 10 semanas de edad (Animal Resources Center, Perth, Australia) por vía subcutánea con  $10^6$  células de SKHEP-1 en el costado derecho. 24 horas después de la inoculación, los animales se asignaron de forma aleatoria a uno de los grupos de tratamiento ( $n = 10$  por grupo), recibiendo dos veces al día 25, 50 ó 150 mg/kg de albendazol oral suspendido en aceite de sésamo durante 20 días.

30 El grupo de control se trató con el vehículo (aceite de sésamo). Usando calibradores vernier, se midió el diámetro del tumor (mm) el día ocho y a continuación cada tres días hasta el día 20 tras la inoculación de células tumorales. Los volúmenes tumorales se calcularon usando la fórmula:  $ab^2/2$ , en la que a y b son los diámetros más pequeños en milímetros, respectivamente [13] y un fragmento del tumor se conservó en parafina para la determinación inmunohistoquímica del máximo índice de proliferación (MPI). En el presente caso, después de la fijación, la muestra de ensayo se procesó para la detección del antígeno Ki-67 con el anticuerpo monoclonal MIB1 de acuerdo con el método que describe McCormick [15].

El modelo animal se eligió basándose en que SKHEP-1 es la línea celular de cáncer de hígado humano más tumorigena en ratones desnudos [16] y en la experiencia previa con el modelo [17]

#### *Análisis estadístico*

40 Las diferencias entre los diferentes grupos de tratamiento se analizaron usando ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Se consideró que los valores de P de menos de 0,05 representan una diferencia significativa.

### **Resultados**

#### *Inhibición de la incorporación de la [ $^3\text{H}$ ] timidina mediante albendazol*

45 El ensayo de incorporación de la [ $^3\text{H}$ ] timidina se usó para determinar el efecto del albendazol sobre la proliferación celular en una serie de líneas celulares de HCC humano (HepG2, Hep3-B, PLC/PRF/5, SKHEP-1), de rata (HTC y Novikoff) y de ratón (Hep1-6). Los resultados obtenidos muestran que, en todas las líneas celulares examinadas, el albendazol reduce de forma efectiva la incorporación de la timidina (tabla 1). Cuando se trató con la concentración de 100 nM de albendazol, en comparación con otras líneas celulares, SKHEP-1 mostró el nivel más alto de sensibilidad al albendazol ( $p < 0,01$  en comparación con el control), mientras que la línea celular de rata HTC fue la menos sensible de todas. El tratamiento con la concentración de 1.000 nM de albendazol redujo la incorporación de la timidina a menos de un 20 % de los valores de control ( $p < 0,001$ ) en todas las líneas celulares y a menos de un 5 % en SKHEP-1 y HepG2. En el presente caso, de nuevo las células de SKHEP-1 mostraron el nivel más alto de sensibilidad al albendazol. En estas células, la incorporación de la timidina se redujo a  $0,6 \pm 0,1$  % de los valores de control correspondientes con una inhibición del 99,4 %. Por esta razón, se empleó SKHEP-1 para todas las investigaciones adicionales. La exposición de células de SKHEP-1 a unas concentraciones diferentes de albendazol durante 1 día reveló que las concentraciones de 250 nM y más de albendazol aún producen una profunda inhibición de la incorporación de la timidina (figura 1a). La eliminación del fármaco y el tratamiento de las células con el medio

normal durante 4 días más condujo a la recuperación de la incorporación de la timidina mediante las células (figura 1b). Excepto para las concentraciones de 500 y las de 1.000 nM, las células expuestas a todas las otras concentraciones de albendazol fueron capaces de recuperarse del efecto de inhibición del fármaco.

**Tabla 1:** Efecto del albendazol sobre la incorporación de la [<sup>3</sup>H] timidina en líneas celulares de HCC.

Línea celular	[albendazol] nM			
	10	100	500	1.000
HepG2	93,1 ± 5,6	72,9 ± 6,3	12,2 ± 2,9	3,5 ± 0,4
Hep3-B	105,7 ± 8,6	68,5 ± 5,7	22,6 ± 1,8	9,3 ± 0,7
SKHEP-1	89,6 ± 6,1	63,7 ± 3,1	4,5 ± 1,1	0,6 ± 0,1
PLC/PRF/5	92,7 ± 4,7	69,4 ± 5,2	26,9 ± 2,7	18,4 ± 2,1
Novikoff	96,5 ± 8,8	71,6 ± 5,9	29,2 ± 3,3	10,3 ± 1,8
HTC	98,4 ± 7,5	86,0 ± 6,9	28,5 ± 2,2	11,4 ± 1,3
Hep1-6	97,7 ± 4,3	79,50 ± 3,2	28,1 ± 2,5	5,6 ± 0,6

5 Las células se trataron con unas concentraciones diferentes de albendazol (10–1.000 nM) durante 5 días al final de lo cual se midió la incorporación de la [<sup>3</sup>H] timidina. Los valores (% del control) representan la media ± EEM de varias determinaciones.

*El albendazol inhibe la proliferación de las células, lo que conduce a una caída en el número de células*

10 El recuento de células viables tratadas con unas concentraciones diferentes de albendazol durante 1, 3 o 5 días produjo una caída dependiente de la dosis en el número de las células, mostrando la profunda inhibición de la proliferación de células de SKHEP-1 mediante el fármaco (figura 2).

Esto fue evidente a partir del día 3 a las concentraciones de 500 y las de 1.000 nM. En comparación con el control, las células expuestas a la concentración de 1.000 nM del fármaco, estaban reducidas significativamente en número ( $p < 0,001$ ).

15 *Efecto en función de la dosis de albendazol sobre la cinética del ciclo celular*

El análisis citométrico de flujo de células tratadas con albendazol reveló que el fármaco induce un efecto dependiente de la dosis sobre la cinética del ciclo celular de células de HCC de SKHEP-1. La figura 3 muestra los cambios que se inducen en la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular a continuación de un tratamiento de 3 días con unas concentraciones diferentes de albendazol. A partir de lo anterior, es claramente evidente que la exposición de las células a la concentración de 250 nM da lugar a la acumulación de las células en la fase G0-G1 y con lo anterior estaba asociada una reducción en el porcentaje de células tanto en la fase S como en la G2-M del ciclo celular. Los cambios inducidos por la concentración de 500 nM del fármaco eran idénticos a los de la concentración de 250 nM (los datos no se muestran). Sin embargo, tal como se muestra en la misma figura, el tratamiento de las células con la concentración de 1.000 nM de albendazol conduce a un patrón totalmente diferente de cambios. En el presente caso, la parada y la acumulación de las células en la fase G2-M del ciclo celular estuvo acompañada por una reducción drástica en el porcentaje de células en la fase G0-G1, mientras que el porcentaje de células en la fase S permaneció sin cambios.

*Efecto del albendazol sobre el crecimiento tumoral in vivo*

30 En los animales de control, los tumores SKHEP-1 se desarrollaron hasta un volumen medio de  $87,9 \pm 12,3 \text{ mm}^3$  a los 20 días después de la inoculación. En los animales que recibieron 50 y 150 mg / kg por día, el crecimiento tumoral se retardó ligera pero no significativamente. Sin embargo, el crecimiento tumoral se suprimió profundamente en los animales que recibieron la dosis de 300 mg / kg de albendazol (figura 4) con un volumen tumoral medio de  $12,0 \pm 7,8$  ( $p < 0,001$ ). Los resultados a partir del análisis inmunohistoquímico de los tumores revelaron que los tumores a partir de los animales que recibieron la dosis de 50 y 150 mg / kg de albendazol había reducido los MPI de  $22,54 \pm 1,53$  (media ± EEM) y  $13,36 \pm 3,04$  respectivamente en comparación con  $34,2 \pm 3,13$  para el control. No había bastante tejido para el análisis de MPI en tumores de ratones que recibieron la dosis de 300 mg / kg / día.

*Efecto en función de la dosis de albendazol sobre la cinética del ciclo celular*

Se mostró que el albendazol también exhibía una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de la línea celular de cáncer de ovario (OVCAR-3) *in vitro*, (véase la figura 5).

40

## Discusión

Los resultados de los estudios de proliferación celular mostraron claramente que todas las líneas celulares de hígado humano, de rata y de ratón examinados se inhiben profundamente mediante albendazol. Esto se puso de manifiesto por la reducción significativa de la incorporación de la timidina a continuación del tratamiento con dosis de albendazol de 100 nM y más. Un tratamiento de forma análoga de células de SKHEP-1 con albendazol condujo a una reducción en función de la dosis y el tiempo del número de células. La razón detrás de la más alta sensibilidad de SKHEP-1 a albendazol no está clara en esta fase. Sin embargo, la carencia de los enzimas necesarios para la conversión del fármaco a unos metabolitos menos activos o inactivos, puede explicar en parte esta observación [14]. El análisis citométrico de flujo del ciclo celular reveló que el albendazol da lugar a un efecto diferencial en función de la dosis sobre la cinética del ciclo celular de SKHEP-1. La acumulación de las células en la fase G0-G1 a continuación del tratamiento con unas concentraciones de albendazol de hasta 500 nM con una caída asociada en el porcentaje de células en las fases S y G2-M, indica que se bloqueó la progresión fuera de la fase G1. Muchos desencadenantes naturales para la muerte celular programada, incluyendo las hormonas glucocorticoides actúan en la transición G1-G0 y las células mueren en un proceso que se describe como 'envejecimiento prematuro' [18]. Sin embargo, a continuación del tratamiento con la concentración de 1.000 nM de albendazol, se invirtió el patrón de la distribución celular, lo que conduce a la acumulación de las células en la fase G2-M del ciclo. Lo anterior indica que el efecto primario del albendazol a la presente concentración puede mediarse mediante un retardo de transición a través de G2-M o mitosis.

Los datos a partir del trabajo en ratones desnudos sugiere que, a la dosis más alta de los 300 mg/ kg/día, el albendazol alcanza presumiblemente las concentraciones necesarias requeridas para suprimir la formación tumoral. El muy alto índice de metabolismo de albendazol en ratones y el pobre suministro de sangre al tumor subcutáneo, se encuentran entre una serie de factores que podrían explicar la alta dosis del fármaco requerida para suprimir el crecimiento tumoral en estos animales.

Los datos de MPI confirman también la capacidad del albendazol para reducir el índice de proliferación tumoral. El antígeno Ki-67 usado en el presente ensayo está fuertemente vinculado a la proliferación y se ha usado en un gran número de estudios para estimar la fracción de crecimiento de los tumores [15].

## EJEMPLO DE REFERENCIA 2

Albendazol en pacientes con un tumor maligno avanzado

### *Pacientes y métodos*

El estudio fue monocéntrico, abierto y no controlado. Nueve pacientes (8 machos y 1 hembra) o bien con un CRC avanzado y metástasis hepática o bien con HCC se incluyeron en el presente estudio. Un paciente con un cáncer neuroendocrino y mesotelioma se trató también de forma compasiva. Los pacientes de edad entre 38-79 años no eran operables y con los mismos había fracasado la quimioterapia existente y también, excepto en dos, tenían unos marcadores tumorales mensurables y crecientes. Con la mayoría ya había fracasado también la quimioterapia de arteria hepática. El diagnóstico de CRC o HCC se realizó por exploración por ultrasonidos, CT o MRI, confirmada por la histología y por la determinación de los niveles de CEA o de AFP para CRC o HCC, respectivamente. Sólo los pacientes con expectativa de supervivencia de más de un mes se inscribieron en el estudio. Las características de los pacientes se presentan en la tabla 2. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Humana para la Investigación de SESAHS. El protocolo y el fin del estudio se explicaron claramente a cada paciente y se obtuvo su consentimiento informado. La duración del presente estudio fue de cuatro semanas, pero tenía que detenerse si se desarrollara leucopenia ( $WBC < 2 \times 10^6$ ) o lesión hepatocelular grave (ALT o AST 2 x límite superior). Todos los pacientes recibieron albendazol (comprimidos ranurados de 400 mg, Smith Kline Beecham, filial australiana) 10 mg / kg por vía oral en dos o tres dosis divididas con una duración planeada de cuatro semanas. Esta es la dosis clínica de albendazol empleada en el tratamiento de enfermedades parasitarias. Los pacientes se evaluaron cada tres días mediante examen clínico junto con pruebas de sangre completa para supervisar los marcadores tumorales, hematopoyesis, toxicidad de la función hepática y renal. Una respuesta parcial (PR) se definió como una disminución de un 50 % o más en el valor de los marcadores. Además, no ha de haber nuevas lesiones o progresión de cualquier otra lesión. Se definió una enfermedad estable como una disminución de menos de un 50 %, o un aumento de menos de un 25 % en el valor de los marcadores tumorales, mientras que una enfermedad progresiva (PD) fue un aumento de un 25 % o más en el valor de los marcadores tumorales o la aparición de cualquier lesión nueva.

**Tabla 2.** Características de los 9 pacientes con tumores de hígado no operables, con los cuales había fracasado la quimioterapia, que participaron en el ensayo de fase 1 de albendazol.

Paciente	Sexo	Edad	Tipo	Duración del tratamiento (días)	Comentarios	Sitio de la enfermedad metastásica
1	F	38	HCC	19	neutropenia; retirada del fármaco	MBL, pulmón y hígado
2	M	66	CRC	14	neutropenia; retirada del fármaco	Hígado y pulmón
3	F	62	*	28 días		Pleura y hígado
4	M	66	CRC	28 días		MBL y hueso
5	M	56	CRC	28 días		MBL y cerebro
6	M	66	CRC	28 días		Hígado y pulmón
7	M	74	CRC	28 días		Hígado y pulmón
8	M	54	CRC	28 días	neutropenia retirada	MBL
9	M	79	CRC	28 días		MBL y peritoneo

MBL = hígado bilobular múltiple  
\* Mesotelioma y tumor carcinoide.

*Resultados*

El tratamiento con albendazol condujo a la estabilización de la enfermedad en tres pacientes, y la progresión de la enfermedad en los otros dos (figura 6). En los restantes cuatro, o bien el fármaco tuvo que retirarse (2) o los marcadores tumorales no fueron mensurables (2). En el paciente número 1, que padecía HCC, el tratamiento con albendazol condujo a la estabilización de la enfermedad, pero debido al desarrollo de neutropenia, el tratamiento con el fármaco se detuvo en este paciente el día 19. El paciente visitó otra ciudad después de detener el albendazol y murió de sepsis neutropénica, que estaba con casi toda certeza relacionada con la terapia con albendazol. Éste había padecido neutropenia con una quimioterapia previa. El paciente número 2 (CRC), el cual estaba mostrando la mayor respuesta a la terapia con albendazol, también desarrolló neutropenia y así el albendazol se retiró también en este paciente. El paciente número 3 (tumor carcinoide y mesotelioma) no tuvo unos marcadores tumorales en suero evaluables. Sin embargo, el paciente se supervisó en busca de efectos adversos. Puede que en los pacientes 4 y 5 hubiera un control a corto plazo de los marcadores tumorales, pero éstos comenzaron a elevarse de nuevo durante el tratamiento. En los pacientes 6, 7 y 8, la terapia con albendazol se asoció con unos niveles de CEA estables. En el paciente 9, los niveles de CEA fueron menos de 10 µg / l y permanecieron así la duración del tratamiento (4 semanas).

No hubo cambios significativos en la función hepática y renal durante el curso del ensayo. Sin embargo, en los pacientes 1, 2 y 8 se desarrolló una neutropenia significativa, como resultado de lo cual tuvo que retirarse el fármaco. Los valores de WCC para todos los nueve pacientes se presentan en la figura 7.

*Discusión*

En el conocimiento de los inventores de la presente invención, el presente estudio es el primero notificado de albendazol (o de cualquier otro BZ) administrado a sujetos humanos para la terapia de cáncer. Los pacientes que participaron en el presente estudio tenían un tumor maligno avanzado, que no había respondido a la terapia disponible. La administración de albendazol al único paciente en el estudio con HCC primario condujo a la estabilización de los valores de AFP. Sin embargo, debido a la neutropenia, el fármaco tuvo que retirarse. El paciente tenía una historia reciente de bajo WCC. En los pacientes restantes (todos con CRC) con niveles de CEA mensurables, tres tuvieron sus marcadores tumorales estabilizados mientras se les mantuvo el tratamiento con albendazol. En comparación con otros pacientes, el paciente número dos, el cual se retiró del ensayo el día 19, tuvo la caída más abrupta en los niveles de CEA.

El presente informe muestra por primera vez que el albendazol, un carbamato de benzimidazol con un uso clínico extensivo como un fármaco antiparasitario seguro, puede dar lugar a la estabilización de marcadores tumorales en pacientes con HCC o CRC con metástasis de hígado.

**EJEMPLO 3**

Para estudiar la factibilidad del uso del albendazol en el tratamiento de la enfermedad peritoneal, se seleccionó la

línea celular de cáncer de ovario humano NIH:OVCAR-3. Esta es una línea celular que se desarrolla bastante lentamente pero es tumorigénica en ratones desnudos, permitiendo por lo tanto que el fármaco se estudie bajo unas condiciones tanto *in vitro* como *in vivo*.

*Ensayo de timidina*

- 5 Después de encontrar las condiciones correctas para el crecimiento de las células en cultivo, las células se trataron durante 5 días con varias concentraciones de albendazol.

Se mostró que unas concentraciones tan bajas como 0,001 micromoles/l de albendazol tienen un efecto sobre la proliferación celular y que a una concentración de 0,25 micromoles/l, se logra aproximadamente un 90 % de inhibición celular y a 0,5 micromoles/l la inhibición del crecimiento celular es del 100 %.

- 10 Estos resultados muestran que el albendazol es muy efectivo frente a esta célula de cáncer de ovario humano. El grado de actividad de albendazol es aproximadamente 10 veces más de lo observado para las células de cáncer de hígado o colorrectal en las que la actividad de inhibición se inicia a aproximadamente 0,1 micromoles/l.

*Recuento celular*

- 15 Las células se trataron o bien con el medio solo (control) o bien con 0,1 y 1 micromoles/l de albendazol durante 0, 1, 3, 6 o 10 días y el número de células viables se sometió a recuento. Se observó que a ambas dosis empleadas, el tratamiento con albendazol conduce a una profunda reducción en el número de células. Esto fue evidente a partir del día 1 después del tratamiento.

**EJEMPLO DE REFERENCIA 4**

Albendazol/ sulfóxido de albendazol frente a líneas celulares de cáncer de hígado, colorrectal y de próstata:

- 20 Los estudios en animales y humanos han mostrado una rápida conversión de albendazol a un sulfóxido (ABS) y a continuación a una sulfona y una serie de otros metabolitos. Como antiparásito, se considera que el ABS es responsable de la mayor parte o de parte de la actividad biológica sistémica del albendazol, mientras que el metabolito de sulfona es farmacológicamente inactivo. Varios estudios han mostrado que el ABS es casi igualmente efectivo frente a parásitos que el propio albendazol. Además, se cree que la actividad en las situaciones clínicas se debe principalmente a la formación del ABS. Tanto es así que el ABS se está considerando ahora como un nuevo fármaco (ricobendazol) por algunos investigadores. Este conocimiento junto con alguna de las observaciones de los inventores de la presente invención en los pacientes con enfermedad colorrectal sometidos a la terapia con albendazol, condujo a los inventores de la presente invención a someter a prueba el ABS frente a células de cáncer. Hasta la fecha, no ha habido bibliografía sobre esta cuestión.

- 25  
30 Con el fin de ser capaz de someter a prueba el ABS, tuvo que encontrarse un disolvente adecuado. Esto se debe a que, a diferencia del albendazol, el ABS no es soluble en etanol. Después de una serie de pruebas, se encontró que el DMSO (0,5 %) era el disolvente más adecuado para este compuesto y para este tipo de investigación. Se encontró que unas concentraciones de DMSO más altas eran demasiado tóxicas para las células, mientras que unas concentraciones inferiores condujeron a una solubilidad incompleta del ABS. Por lo tanto, para permitir una comparación directa entre los 2 compuestos, todos los experimentos posteriores se ejecutan usando DMSO al 0,5 % tanto para el ABS como para el albendazol. En las líneas celulares examinadas, el albendazol produjo unos resultados muy similares a los que los inventores de la presente invención habían notificado previamente para el fármaco en células de cáncer de hígado.

- 35  
40 Tanto el albendazol como el ABS se sometieron a prueba uno junto al otro frente a varias líneas celulares, según sigue:

Hígado ---- HepG2, Hep3B, SKHEP-1

Colorrectal ---- C-170, LOVO, HT-29

Próstata ---- PC3, LNCap, Du145

Leucémica ---- HL60

- 45 Las primeras 9 líneas celulares se usaron para comparar la efectividad y la potencia mientras que la última se usó para evaluar la toxicidad sobre la médula ósea (como una guía aproximada).

Las células se trataron con varias concentraciones de cada compuesto durante un periodo de 5 días.

Se mostró que el sulfóxido de albendazol inhibe la proliferación de las células de cáncer de hígado humano HepG2, SKHEP-1 y Hep 3B.

- 50 El ABS produjo el mismo tipo de actividad frente a líneas celulares colorrectales C-170, LOVO y HT-29. En general los resultados obtenidos para el ABS frente a albendazol muestran un gran grado de similitud entre los 2 compuestos, con una actividad antiproliferativa que se vuelve evidente a una concentración de 0,01 micromoles/l y

drásticamente creciente a 0,25 micromoles / l y que se acerca a una inhibición 100 a 1 micromol / l.

Todos los resultados obtenidos con líneas celulares de próstata muestran que el fármaco y su metabolito mayor (ABS) son casi equipotentes para la inhibición de la proliferación de las células de cáncer próstata humana PC3, LNCap y Du 145.

## 5 EJEMPLO DE REFERENCIA 5

*Marcaje:*

Para hallar la forma en la que el albendazol funciona como un fármaco anticancerígeno, puede realizarse una gran variedad de pruebas. Una de las primeras es ver si el albendazol induce la apoptosis. Esto se somete de nuevo a prueba de varias formas, una de las más comunes es comprobar el marcaje de ADN. En los laboratorios de los inventores de la presente invención, después de emplear algún tiempo para determinar la concentración correcta y el periodo de tratamiento correcto, finalmente los inventores de la presente invención pudieron ver una evidencia clara de la inducción del marcaje de ADN en estas células de cáncer de ovario mediante albendazol. Esto muestra que el tratamiento con albendazol conduce a apoptosis. Esta es la primera vez que se ha notificado la inducción de apoptosis mediante albendazol.

Se obtuvieron también unos resultados similares con la línea celular colorrectal humana LOVO. El ADN obtenido a partir de las células LOVO tratado con albendazol  $\mu\text{M}$  durante 16 horas mostró un claro marcaje, lo que mostró que el albendazol induce la apoptosis en las células LOVO.

### Compendio

Los resultados obtenidos con la línea celular de ovario (NIH:OVCAR-3) muestran por primera vez que el albendazol es profundamente efectivo para la inhibición de su proliferación en cultivo de una forma en función de la dosis. Esto se confirmó tanto por la captación de timidina como por el recuento celular. El trabajo adicional muestra claramente que estas células experimentan la apoptosis como resultado del tratamiento con albendazol.

Los resultados obtenidos en líneas celulares de hígado y colorrectales confirman la actividad antiproliferativa de albendazol frente a estas líneas celulares. Los resultados obtenidos con las 3 líneas celulares de próstata humana indican que estas células también son bastante sensibles al efecto del albendazol en cultivo. No existe informe previo alguno acerca de la actividad antiproliferativa de albendazol en líneas celulares de próstata, lo que hace del presente el primero en mostrar una actividad de este tipo.

Se ha sabido bien durante años que la conversión de albendazol en el cuerpo tiene lugar bastante rápidamente en el hígado y produce un metabolito activo, a saber, sulfóxido de albendazol, que se ha mostrado que es activo frente a parásitos. A este respecto, los anteriores resultados de los inventores de la presente invención con el sulfóxido han mostrado que éste es tan efectivo como el fármaco precursor (albendazol) en las 10 líneas celulares diferentes examinadas. Sin embargo, los últimos resultados de los inventores de la presente invención arrojan ciertas dudas sobre esto, y el compuesto se encuentra actualmente sometido a una investigación intensiva en los laboratorios de los inventores de la presente invención.

## 35 EJEMPLO DE REFERENCIA 6

*Terapia de combinación:*

El efecto de inhibición del metabolismo de albendazol sobre su actividad antiproliferativa se investigó usando una línea celular colorrectal humana LOVO y el metimazol como un inhibidor de albendazol

De cada uno de HepG2 y de SKHEP-1 se colocaron 5.000 células en unas placas de 24 pocillos y se trataron durante 5 días con varias concentraciones de albendazol solo o junto con MT.

No hubo inhibición de crecimiento de las células de HepG2 cuando se trataron con albendazol durante 5 días a las dosis que se sometieron a prueba en el presente experimento (0,25, 0,1 y 0,01  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, hubo una inhibición de crecimiento modesta cuando se usaron albendazol y MT de forma conjunta. Por otro lado, el albendazol a una concentración de 0,25  $\mu\text{M}$  inhibió profundamente el crecimiento de células de SKHEP -1. Esta respuesta se potenció adicionalmente en presencia de MT. MT es un agente antitiroideo que actúa como un inhibidor competitivo de la oxidación en función de la Flavin Monooxigenasa (FMO) microsómica de varios fármacos. Se ha mostrado que MT inhibe el metabolismo de los fármacos dependientes de esta ruta. La inhibición mediada por MT de la sulfoxidación hepática de albendazol a sulfóxido de albendazol se ha mostrado tanto *in vitro* como *in vivo*.

### Referencias:

- 50 1. Akriviadis, E.A., Llovet, J.M., Efremidis, S.C. Hepatocellular carcinoma. Br. J. Surg. 85:1319-31, 1998.
2. Mathurin, P., Rixe, D., Carbonell, N. y col. Review article: Overview of medical treatments in unresectable hepatocellular carcinoma – an impossible meta analysis? Aliment. Pharmacol. Ther. 12: 111-26, 1998.
3. Villa, E., Camollini, L., Dugani, A. y col. Variant estrogen receptor messenger RNA species detected in human

- primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 55: 498–500, 1995.
4. Farmers, D. G., Rosove, M.H., Shaked, A. y col. Current treatment modalities for hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg.* 219: 236–47, 1994.
- 5 5. Manesis, E. K., Giannoulis, G., Zoumboulis, P. y col. Treatment of hepatocellular carcinoma with combined suppression and inhibition of sex hormones: randomized controlled trial. *Hepatology* 21: 1535–42, 1995.
6. Okada, S. Chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 45: 1259–63, 1998.
7. Kemeny, N. The systemic chemotherapy of hepatic metastases. *Semin. Oncol.* 10: 148–58, 1983.
8. Alvarez, L. I., Sanchez, S. F., Lanusse, C.E. *In vivo* and *ex vivo* uptake of albendazole and its sulfoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behaviour in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 22: 77–86, 1999.
- 10 9. Dollery, C (ed.) Therapeutic drugs, págs. A31–A34; Churchill–Livingstone, 1996.
10. Lacey, E. The role of cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 18: 885–936, 1988.
11. Lacey, E. The mode of action of benzimidazoles. *Prasito. Today* 6:112–115, 1990.
- 15 12. W. Taylor A rapid single step staining technique for DNA analysis by flow microfluorimetry. *J. Histochem. Cytochem.* 28 (1980) 1021–1024.
13. H. Yamamoto, J. Fujimoto, E. Okamoto, J. Furuyama, T. Tamaoki, T. Hashimoto–tamaoki, Suppression of growth of hepatocellular carcinoma by sodium butyrate *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Cancer* 76 (1998) 897–902.
14. S. Rolin, H. Souhaili–El Amri, A. M. Batt, M. Levy, D. Bagrel, G. Siest, Study of the *in vitro* bioactivation of albendazole in human liver microsomes and hepatoma cell lines. *Cell Biol. Toxicol.* 5 (1989) 1–14.
- 20 15. D. McCormic, H. Chong, C. Hobbs, C. Datta, P. A. Hall, Detection of the Ki–67 antigen in fixed and wax embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* 22 (1993) 355–360.
16. D. Shouval, L. Schuger, L.I. S. Levij, L.M. Reid, Z. Neeman, D. A. Shafritz, Comparative morphology and tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cell lines in athymic rats and mice. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 412 (1988) 595–605.
- 25 17. M. H. Pourgholami, J. Akhter, Y. Lu, D. L. Morris, *In vitro* and *in vivo* inhibition of liver cancer cells by 1, 25–Dihydroxyvitamin D3. *Cancer Lett.* 151 (2000) 97–102.
18. L. A. Smets, Programmed cell death (apoptosis) and response to anti–cancer drugs. *Anticancer Drugs* 5 (1994) 3–9.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de un cáncer de ovario en un sujeto mediante administración regional, en la que la composición comprende un vehículo de lípidos y un carbamato de benzimidazol que es albendazol o un sulfóxido o sulfona del mismo.
- 5 2. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el vehículo es un aceite.
3. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el vehículo es un aceite yodado.
4. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el aceite yodado es un éster etílico yodado del aceite de semilla de amapola.
- 10 5. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición comprende además metimazol.

Figura 1:

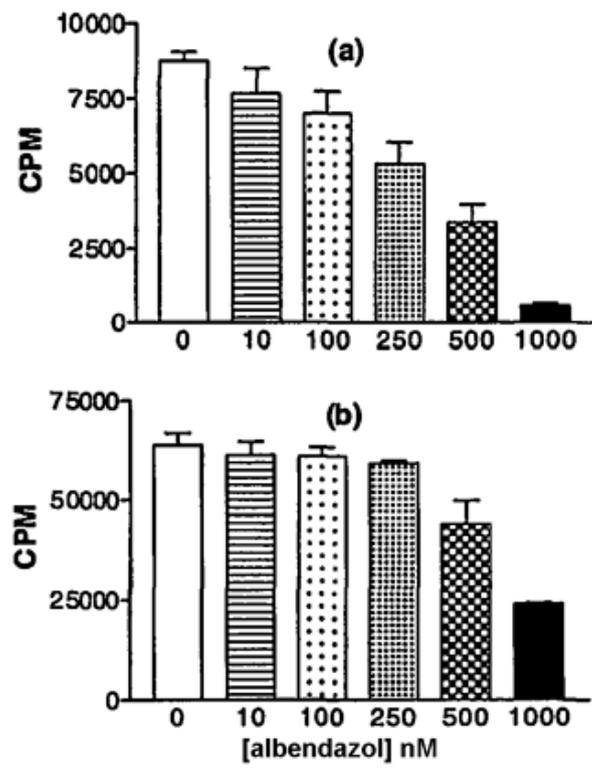


Figura 2:

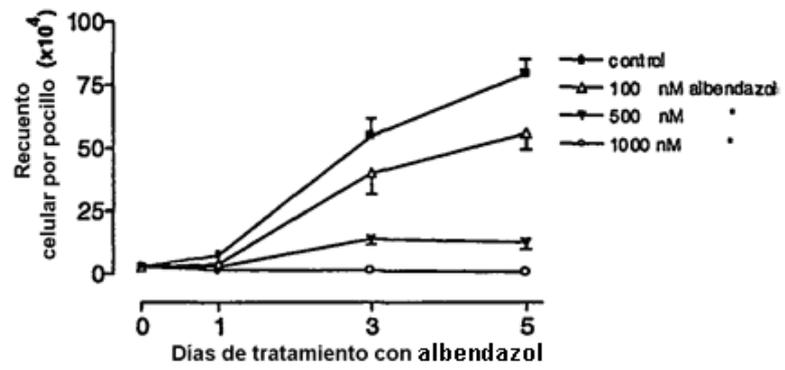


Figura 3:

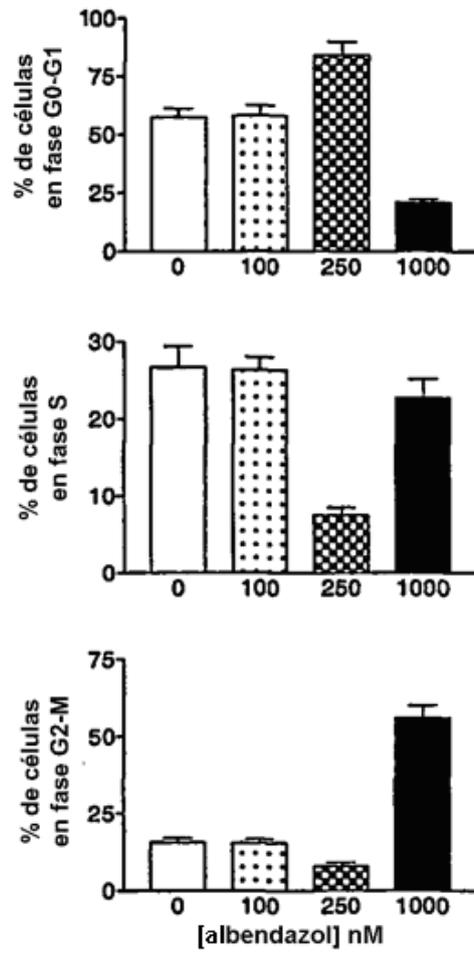


Figura 4:

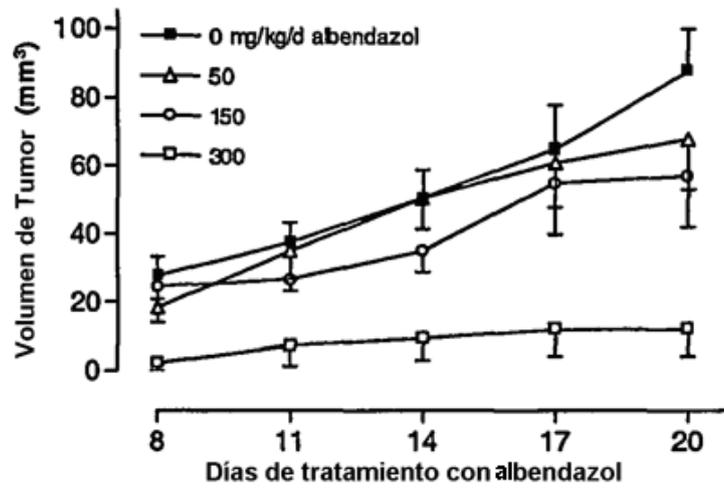


Figura 5

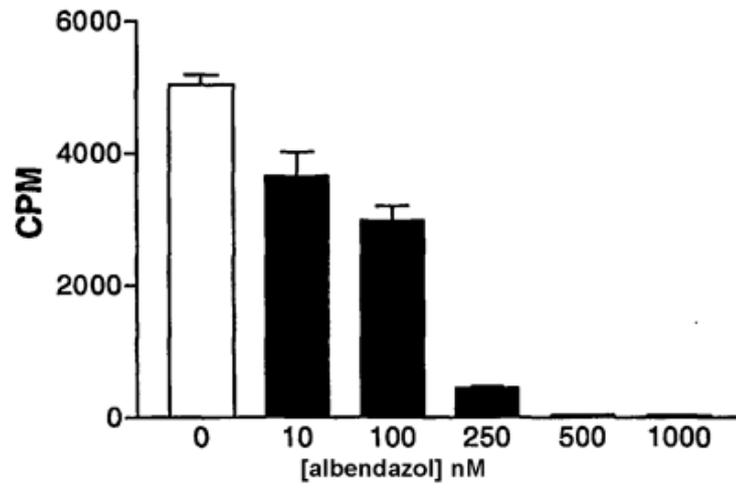


Figura 6:

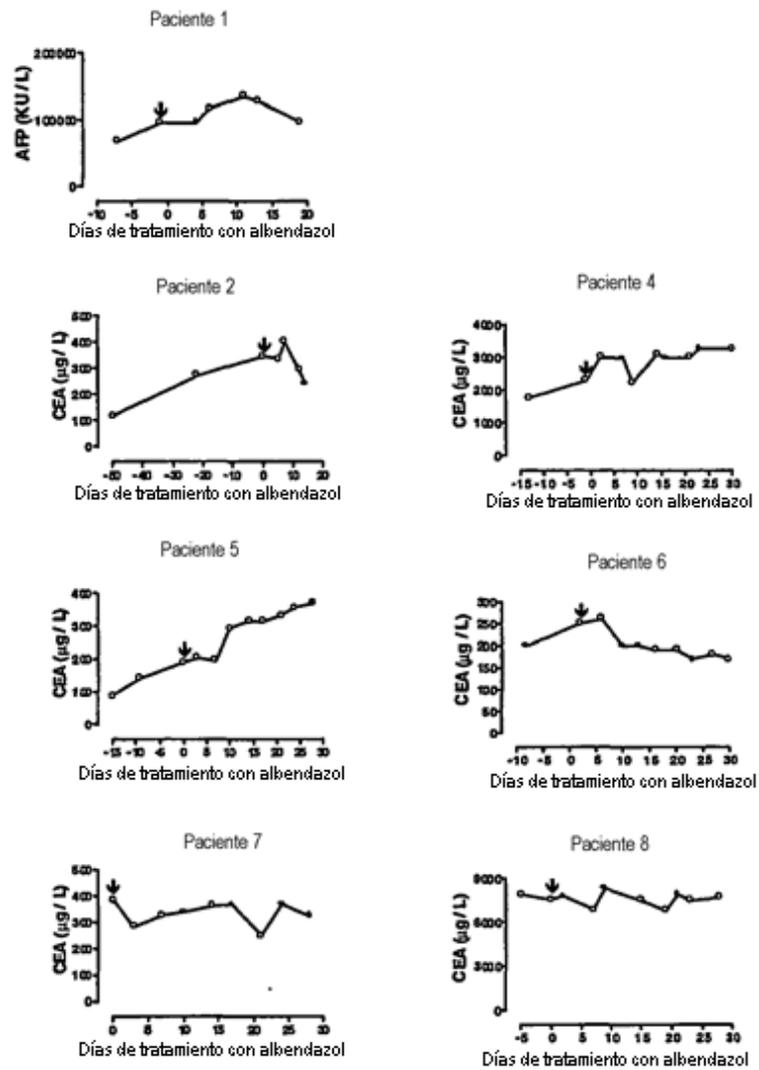


Figura 7:

