

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 480**

51 Int. Cl.:

A61K 31/285 (2006.01)

A61K 33/36 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.1998 E 08075200 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1964557**

54 Título: **Procedimiento de producción de formulaciones de trióxido de arsénico**

30 Prioridad:

10.11.1997 US 64655 P

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

01.04.2013

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER
CENTER (100.0%)
1275 YORK AVENUE
NEW YORK, NY 10021, US**

72 Inventor/es:

**WARRELL, RAYMOND, P., JR.;
PANDOLFI, PIER PAOLO y
GABRILOVE, JANICE L.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 399 480 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

Procedimiento de producción de formulaciones de trióxido de arsénico

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende trióxido de arsénico.

2. Antecedentes de la invención

2.1. Cáncer

El cáncer se caracteriza principalmente por un aumento en el número de células anormales derivadas de un tejido normal dado, la invasión de los tejidos adyacentes por estas células anormales, y la diseminación mediante la sangre o la linfa de las células malignas hasta los ganglios linfáticos regionales y hasta lugares alejados (metástasis). Los datos clínicos y los estudios de biología molecular indican que el cáncer es un proceso de varias etapas que se inicia con pequeños cambios preneoplásicos, que, en ciertas condiciones, evolucionan hasta la neoplasia.

El crecimiento premaligno de células anormales ilustrado por hiperplasia, metaplasia, y displasia (para una revisión de estos estados de crecimiento anormal, véase Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2ª Ed., W.B. Saunders Co., Filadelfia, pp. 68-79) precede a la formación de una lesión neoplásica. Una lesión neoplásica puede evolucionar de forma clonal para crecer hasta un tumor sólido, y desarrollar y aumentar su capacidad de invasión, crecimiento, metástasis, y heterogenia, especialmente en condiciones en las que las células neoplásicas escapan de la vigilancia del sistema inmunológico del hospedador (Roitt, I., Brostoff, J y Kale, D., 1993, Immunology, 3ª Ed., Mosby, St. Louis, pps. 17.1-17.12).

Leucemia se refiere a las neoplasias malignas de los tejidos formadores de la sangre. La transformación en neoplasia maligna se produce normalmente en una sola célula mediante dos o más etapas con posterior proliferación y expansión clonal. En algunas leucemias se han identificado translocaciones cromosómicas específicas consistentes con una determinada morfología de la célula leucémica y características clínicas específicas (por ej., translocaciones de 9 y 22 en la leucemia mielocítica crónica, y de 15 y 17 en la leucemia promielocítica aguda). Las leucemias agudas son predominantemente poblaciones de células no diferenciadas, mientras que las leucemias crónicas tienen formas celulares más maduras.

Las leucemias agudas se dividen entre linfoblásticas (LLA) y no linfoblásticas (LNLA). Adicionalmente, se pueden subdividir por su morfología y aspecto citoquímico de acuerdo con la clasificación franco-americano-británica (FAB) o según su tipo y grado de diferenciación. El uso de anticuerpos monoclonales específicos de los linfocitos B y T y del antígeno mielode es muy útil para clasificar. La LLA es predominantemente una enfermedad infantil que se establece por hallazgos de laboratorio y exploración de la médula ósea. La LNLA, también denominada como leucemia mieloblástica aguda (LMA) se produce en todas las enfermedades y es la leucemia aguda más frecuente en adultos; se trata de la forma habitualmente asociada con la radiación como agente causal.

Las leucemias crónicas se describen como linfocíticas (LLC) o mielocíticas (LMC). La LLC se caracteriza por el aspecto de los linfocitos maduros en la sangre, en la médula ósea, y en los órganos linfoides. La característica distintiva de la LLC es la linfocitosis absoluta sostenida ($> 5.000/\mu\text{l}$) y un aumento de linfocitos en la médula ósea. La mayor parte de pacientes con LLC tienen también expansión clonal de linfocitos con características de linfocitos B. La LLC es una enfermedad de personas mayores. En la LMC, el rasgo característico es el predominio de células granulocíticas en todos los estadios de diferenciación en la sangre, la médula ósea, el hígado, el bazo y el resto de órganos. En el paciente sintomático en el momento del diagnóstico, el recuento total de glóbulos blancos es habitualmente de $200.000/\mu\text{l}$, pero puede alcanzar $1.000.000/\mu\text{l}$. La LMC es relativamente sencilla de diagnosticar debido a la presencia del cromosoma Philadelphia.

La auténtica naturaleza del cáncer hematopoyético necesita el uso de quimioterapia sistémica como modalidad de tratamiento primario. Los fármacos seleccionados de acuerdo con las sensibilidades de las leucemias concretas se proporcionan habitualmente en combinación. Se puede usar radioterapia como auxiliar para tratar acumulaciones locales de células leucémicas. La cirugía está indicada en pocas ocasiones como tratamiento de primera línea, pero se puede usar para gestionar algunas complicaciones. En algunos casos está indicado el trasplante de médula ósea de algún hermano que tenga correspondencia en el HLA.

2.2. El arsénico y sus usos en medicina

Desde hace mucho, el arsénico se ha considerado al mismo tiempo tanto un veneno como un fármaco tanto en la medicina occidental como en la medicina china. En la última parte del siglo diecinueve, el arsénico se usaba frecuentemente en un intento de tratar enfermedades de la sangre en el mundo occidental. En 1878, se notificó que el tratamiento de un paciente leucémico con la solución de Fowler (una solución que contenía arsenito de potasio, valencia +5) redujo notablemente el recuento de glóbulos blancos (Cutler y Bradford, Am. J. Med. Sci., enero de

1878, 81-84). Otro interés en el uso de la solución de Fowler como agente paliativo para tratar la leucemia mielógena crónica (LMC) fue descrito por Forkner y Scott en 1931 (J. Am. Med. Assoc., 1931, iii, 97), y confirmado posteriormente por Stephens y Lawrence en 1936 (Ann. Intern. Med. 9, 1488-1502). Sin embargo, aunque el(los) principio(s) químico(s) activo(s) de la solución de Fowler no se habían determinado, su toxicidad era bien reconocida. La solución de Fowler se administraba estrictamente como composición oral, y se proporcionaba a los pacientes leucémicos hasta que el nivel de glóbulos blancos disminuía hasta un nivel aceptable o hasta que las toxicidades (como queratosis dérmica e hiperpigmentación) aparecían, pudiendo disfrutar los pacientes diferentes periodos de remisión. En la década de los sesenta del siglo pasado, la solución de Fowler se seguía usando ocasionalmente en intentos de tratar la LMC, sin embargo, la mayoría de los pacientes con LMC eran tratados con otros agentes quimioterapéuticos como busulfano, y/o radioterapia (Monfardini y col., Cancer, 1973, 31: 492-501).

Paradójicamente, uno de los efectos ampliamente reconocidos de la exposición al arsénico, de origen tanto ambiental como medicinal, es el cáncer de piel (Hutchinson, 1888, Trans. Path. Soc. Lond., 39: 352; Neubauer, 1947, Br. J. Cancer, 1: 192). Existen incluso datos epidemiológicos que sugieren que el uso de la solución de Fowler en periodos prolongados puede llevar a un aumento de la incidencia de cáncer en puntos internos (Cuzick y col., Br. J. Cancer, 1982, 45: 904-911; Kaspar y col., J. Am. Med. Assoc., 1984, 252: 3407-3408). La carcinogénesis del arsénico desde entonces se ha demostrado por el hecho de que puede inducir aberraciones cromosómicas, amplificación de genes, intercambio entre cromátidas hermanas, y transformación celular (Véase, por ej., Lee y col., 1988, Science, 241: 79-81; y Germolec y col., Toxicol. Applied Pharmacol., 1996, 141: 308-318). Debido al efecto carcinogénico conocido del arsénico, su único uso terapéutico en la medicina occidental en la actualidad es en el tratamiento de enfermedades tropicales, como la tripanosomiasis africana (el arsénico orgánico, melarsoprol; Véase, de Goodman y Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª edición, capítulo 66, 1659-1662, 1997).

En la medicina tradicional china, el ácido arsenioso o la pasta de trióxido de arsénico se han usado para tratar enfermedades de la médula dental, psoriasis, sífilis y reumatosis (Chen y col., 1995, en Manual of Clinical Drugs, Shanghai, China, Shanghai Institute of Science and Technology, p.830). En década de los setenta del siglo pasado, el trióxido de arsénico se aplicó experimentalmente para tratar la leucemia promielocítica aguda (LPA) en China (comentado por Mervis, 1996, Science, 273: 578). Recientemente se ha vuelto a investigar la eficacia clínica del trióxido de arsénico en 14 de 15 pacientes con LPA resistente al tratamiento, donde se ha notificado que el uso de una dosis intravenosa de 10 mg/día durante 4-9 semanas daba como resultado una remisión morfológica completa sin supresión asociada de médula ósea (Shen y col., 1997, Blood, 89: 3354-3360). También se ha demostrado que el trióxido de arsénico indujo apoptosis (muerte celular programada) *in vitro* en células NB4, una línea celular de LPA, y que la apoptosis estaba aparentemente asociada con la regulación por defecto del oncogén bcl-2, y la redistribución intracelular de la proteína quimérica LPM/RAR α que son únicas de las células de LPA (Chen y col., 1996, Blood, 88: 1052-1061; Andre y col., 1996, Exp. Cell Res. 229: 253-260). Se ha informado de que la actividad biológica del arsénico se debe a la capacidad del arsénico para llevar la fracción nucleoplásmica de LPM a los cuerpos nucleares para su degradación (Zhu y col., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci., 94: 3978-3983).

Aunque el arsénico es bien conocido por ser tanto un veneno como un agente carcinógeno, existen muchos informes relativos al uso del arsénico en el tratamiento médico. Además de la anterior discusión, debe quedar claro que existen muchos tipos diferentes de leucemias, cada una de las cuales requiere un protocolo de tratamiento único que se modifica de acuerdo con la presencia de factores predictores del riesgo de un fracaso del tratamiento. Así, el desarrollo de un agente de amplio espectro contra la leucemia que se pueda usar solo o en combinación con otros fármacos existentes es extremadamente deseable.

3. Resumen de la invención

A pesar de los informes opuestos en la técnica relativos a los beneficios y riesgos de la administración de arsénico a los pacientes, los solicitantes han encontrado que el trióxido de arsénico y el compuesto orgánico de arsénico, melarsoprol, tienen amplia aplicabilidad en el tratamiento de varios tipos de leucemias, linfomas y tumores sólidos.

La invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de composiciones farmacéuticas que comprenden trióxido arsénico.

Como se ha descrito en el presente documento, el trióxido de arsénico se puede usar solo o en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos (incluidos quimioterapéuticos, radioprotectores y radioterapéuticos) o técnicas para mejorar la calidad de vida del paciente o para tratar la leucemia, el linfoma o el tumor sólido. Los compuestos de arsénico se pueden usar antes, durante o después de la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos conocidos, incluidos agentes antitumorales. Además, los compuestos de arsénico se pueden usar antes, durante o después del tratamiento con radiación.

Las composiciones farmacéuticas preparadas mediante el procedimiento de la invención son soluciones estériles adecuadas para inyección intravenosa o para perfusión.

Las composiciones concretas que se pueden producir mediante el procedimiento de la invención y sus usos se describen en las secciones y subsecciones siguientes.

4. Descripción detallada de la invención

En el presente documento se describen procedimientos y composiciones para el tratamiento de la leucemia, el linfoma o tumores sólidos. En concreto, se describe un procedimiento de tratar la leucemia aguda o crónica, el linfoma o los tumores sólidos en un ser humano, que comprende administrar a un ser humano que necesite dicha terapia una cantidad terapéuticamente eficaz y no letal de trióxido de arsénico. También se describe un procedimiento de tratar la leucemia en un ser humano que se ha convertido en resistente a otras formas de tratamiento, que comprende administrar a un ser humano trióxido de arsénico o melarsoprol en combinación con otro agente quimioterapéutico, por ejemplo ácido todo-trans retinoico (ATRA).

La invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de composiciones farmacéuticas que comprenden trióxido arsénico. Se prefiere que las composiciones farmacéuticas de la presente invención exhiban una toxicidad menor, mejor eficacia, mejor estabilidad durante el almacenamiento y uso, y que la composición tenga un pH fisiológicamente aceptable.

4.1. Los compuestos de arsénico

Puesto que las materias primas no formuladas de forma farmacéutica usadas en el procedimiento de la invención son bien conocidas, se pueden preparar a partir de técnicas químicas bien conocidas en la materia. (Véase por ejemplo, Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology 4ª ed. volumen 3 pps. 633-655 John Wiley & Sons).

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "un agente terapéutico", "pauta terapéutica", "radioprotector", "quimioterapéutico" significan fármacos y tratamientos farmacológicos convencionales, incluyendo vacunas, para tratar el cáncer, infecciones víricas, y otras neoplasias malignas conocidas por los expertos en la técnica. Los agentes "radioterapéuticos" son bien conocidos en la técnica.

Los compuestos de trióxido de arsénico o de melarsoprol se pueden usar solos o combinados con otros agentes terapéuticos conocidos (incluyendo agentes quimioterapéuticos, radioprotectores, y radioterapéuticos) o técnicas para mejorar tanto la calidad de vida del paciente, como para tratar la leucemia, el linfoma o el tumor sólido. Por ejemplo, el trióxido de arsénico se puede usar antes, durante o después de la administración de uno o más agentes antitumorales conocidos incluyendo, pero sin limitación, compuestos de tipo mostaza, mostaza de nitrógeno, clorambucilo, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, floxuridina, metotrexato, vincristina, vinblastina, taxol, etopósido, temipósido, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, mitomicina, cisplatino, carboplatino, fosfato de estramustina, hidroxurea, BCNU, procarbazona, VM-26, interferones, y ácido retinoico todo trans (ATRA), u otros retinoides (Véase, *por ejemplo*, Physician Desk References 1997). Además, los compuestos de arsénico se pueden usar antes, durante o después de la radioterapia.

4.2. Procedimientos de tratamiento

La expresión "un procedimiento para tratar la leucemia", como se usa en el presente documento, significa que la enfermedad y los síntomas asociados con la enfermedad se mitigan, reducen, curan, o se sitúan en un estado de remisión. Por ejemplo, los procedimientos de tratamiento de la invención pueden reducir el recuento de glóbulos blancos o reducir la linfocitosis en un ser humano en tratamiento.

La expresión "un procedimiento para tratar el linfoma", como se usa en el presente documento, significa que la enfermedad y los síntomas asociados con la enfermedad se mitigan, reducen, curan, o se sitúan en un estado de remisión.

La expresión "un procedimiento para tratar el tumor sólido", como se usa en el presente documento, significa que la enfermedad y los síntomas asociados con la enfermedad se mitigan, reducen, curan, o se sitúan en un estado de remisión

Además, la expresión "un procedimiento para tratar la infiltración leucémica" significa que la infiltración de células leucémicas en el exterior de la circulación y en dirección a otros órganos y sistemas, y los síntomas asociados con dicha infiltración se mitigan, reducen, curan, o se sitúan en un estado de remisión

El término "refractario" cuando se usa en el presente documento significa que por lo general la leucemia es resistente a la curación o al tratamiento.

Como se usa en el presente documento, célula "preneoplásica" se refiere a una célula que está en transición desde un estado normal a un estado neoplásico; o células que no consiguen diferenciarse normalmente; y la evidencia morfológica, respaldada crecientemente por estudios de biología molecular, indica que la preneoplasia evoluciona a través de varias etapas.

El trióxido de arsénico (As_2O_3) inhibe el crecimiento e induce apoptosis en células NB4 leucémicas promielocíticas agudas. La leucemia promielocítica aguda (LPA) está asociada con la translocación t(15;17), que genera una proteína de fusión LPM/RAR α entre LPM, un supresor del crecimiento ubicado en los cuerpos asociados a la matriz nuclear, y RAR α , un receptor nuclear del ácido retinoico (AR). Se ha propuesto que LPM/RAR α bloquea la

- diferenciación mieloides mediante la inhibición de la respuesta del receptor nuclear, tal como hace un mutante RAR α dominante negativo. Además, en células LPA, LPM/RAR α desplaza a LPM y al resto de antígenos del cuerpo nuclear (NB) sobre micromanchas nucleares, dando como resultado probablemente la pérdida de las funciones LPM y/o NB. Se ha sugerido que elevadas concentraciones de trióxido de arsénico promueven la apoptosis, mientras que las concentraciones bajas inducen la diferenciación parcial tanto en células NB4 como en células derivadas de pacientes de LPA. Se ha postulado que el As₂O₃ actúa mediante su capacidad para conseguir específicamente que LPM-RAR α de las células LPA se reubique en los cuerpos nucleares para su degradación (Zhu y col., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 3978-3983). Sin embargo, estos hallazgos tienden a limitar el uso de trióxido de arsénico a un subconjunto de leucemias. Véase Konig y col., 1997, Blood, 90: 562-570.
- 5 El As₂O₃ puede inhibir el crecimiento celular e inducir la apoptosis en varias líneas celulares mieloides de leucemia de una forma independiente de LPM y LPM-RAR α y es eficaz contra una amplia gama de leucemias con independencia del mecanismo molecular subyacente que origina la neoplasia. En las Secciones 5.1 y 5.2 se proporcionan ejemplos de trabajo del efecto de los compuestos de arsénico sobre numerosas líneas celulares leucémicas.
- 10 De acuerdo con esto, el trióxido de arsénico de la presente invención se puede usar contra varias leucemias, incluidas, entre otras:
- Leucemia linfoblástica aguda (LLA)
 - Leucemia linfoblástica aguda de células B
 - Leucemia linfoblástica aguda de células T
- 20 Leucemia mieloblástica aguda (LMA)
- Leucemia promielocítica aguda (LPA)
 - Leucemia monoblástica aguda
 - Leucemia eritroleucémica aguda
 - Leucemia megacarioblástica aguda
- 25 Leucemia mielomonocítica aguda
- Leucemia indiferenciada aguda
 - Leucemia mielocítica crónica (LMC)
 - Leucemia linfocítica crónica (LLC)

El experto en la técnica reconocerá que otras leucemias se pueden tratar de acuerdo con la presente invención,

30 4.3. Procedimiento para fabricar la solución estéril de trióxido de arsénico

El trióxido de arsénico de la invención se puede formular como preparaciones farmacéuticas estériles para administrar a los seres humanos para el tratamiento de leucemias, linfomas y tumores sólidos. Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible se pueden preparar, envasar, etiquetar para su tratamiento y usarse para el tratamiento de la leucemia, el linfoma y tumor sólido indicados.

La invención proporciona un procedimiento para fabricar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz y no letal de trióxido de arsénico (As₂O₃). El trióxido de arsénico (materia prima) es un compuesto inorgánico sólido comercializado en una forma muy pura. Sin embargo, el As₂O₃ es difícil de disolver en disolución acuosa. Además, los inventores desconocen cualquier enseñanza publicada acerca de cómo formular As₂O₃ en una composición farmacéutica adecuada para inyectarla directamente a un ser humano. El arsénico está presente en la solución en el estado de valencia +5 (pentavalente) o el estado de valencia +3 (trivalente). Por ejemplo, el arsenito de potasio (KAsO₂; que está presente en la solución de Fowler) y las sales del ácido arsenioso contienen arsénico pentavalente. Se sabe que una forma del arsénico es más tóxica que la otra (Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª edición, capítulo 66, 1660, 1997). Una solución reciente de trióxido de arsénico que contiene arsénico en su estado trivalente se oxidará gradualmente al estado pentavalente si está expuesta al aire durante un periodo prolongado y, como resultado de la acumulación del arsénico pentavalente, la toxicidad relativa de la solución de As₂O₃ cambiará con el tiempo. (*Id.*) Además, se ha observado que la cantidad total de arsénico en solución disminuye con el tiempo. Esta pérdida de material se origina en la conversión progresiva del arsénico contenido en la solución en arsina (AsH₃) que es un compuesto gaseoso a temperatura ambiente. Esto resulta especialmente problemático en aplicaciones farmacéuticas si la concentración de principio activo en el material inyectado no se puede controlar. También es indeseable dejar escapar la arsina desde la

solución hasta la atmósfera, porque la arsina también es tóxica.

Los inventores han experimentado y desarrollado con éxito un procedimiento para formular el trióxido de arsénico que supera los problemas de solubilidad y estabilidad anteriormente descritos. El procedimiento comprende solubilizar As_2O_3 sólido de alta pureza en una solución acuosa a pH elevado, tal como un pH superior a 12. Por ejemplo, se puede usar una solución 5 M de hidróxido de sodio. Para ayudar a solubilizar y obtener una solución transparente y homogénea, se pueden aplicar agitación mecánica y/o un suave calentamiento. También se puede obtener una solución de As_2O_3 disolviendo el compuesto sólido durante la noche. De forma típica, se obtiene por este procedimiento una solución de As_2O_3 1 M. Sin embargo, esta solución es demasiado básica para que sea útil en una composición farmacéutica.

Para ajustar el pH de la solución de As_2O_3 , la solución en primer lugar se diluye con agua, por ejemplo, hasta una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, pH 12. La solución de As_2O_3 se vuelve a valorar con ácido, como ácido clorhídrico (HCl de 1 M a 5 M), con agitación constante hasta que el pH sea de aproximadamente 8,0 a 8,5. El HCl muy concentrado no es adecuado porque origina la precipitación de la solución de As_2O_3 . La solución de As_2O_3 parcialmente neutralizada se puede esterilizar a continuación, por ejemplo por filtración (por ej., a través de un filtro de 0,22 mm) y almacenarse en viales estériles.

Para preparar una composición farmacéutica que se pueda inyectar directamente a un sujeto, la composición debe ser estéril, se pueden usar técnicas estandarizadas de esterilización conocidas del experto en la técnica para la esterilización. Véase, por ej., Remington's Pharmaceutical Science, el pH de la solución de As_2O_3 parcialmente neutralizada se puede ajustar adicionalmente hasta un pH casi fisiológico por disolución (10-100 veces) con una solución de dextrosa al 5 %. Por ejemplo, se pueden añadir 10 ml de una solución de As_2O_3 parcialmente neutralizada a 500 ml de una solución de dextrosa al 5 % para dar un pH final de aproximadamente 6,5 a 7,5. El procedimiento documento de la invención reduce la oxidación del arsénico en solución. Las composiciones farmacéuticas que contienen trióxido de arsénico fabricado según el procedimiento de la presente invención muestran una estabilidad mejorada y una prolongada duración en almacenamiento.

4.4. Composición farmacéutica y modos de administración

La magnitud de una dosis terapéutica de un compuesto de arsénico en la gestión de la leucemia aguda o crónica variará con la gravedad de la dolencia a tratar y la ruta de administración. La dosis y, quizás, la frecuencia de la dosis también variarán según la edad, peso corporal, estado y respuesta del paciente individual. En general, los intervalos de dosis diarias de trióxido de arsénico para las dolencias descritas en el presente documento son por lo general de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal administrada en dosis divididas de forma parenteral u oral o tópica. Una dosis diaria total preferida es de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 40 mg de trióxido de arsénico. Preferiblemente la formulación de trióxido de arsénico de la presente invención se administra durante un máximo de 60 días, o hasta remisión, seguida de dos a diez ciclos adicionales, con una duración de aproximadamente 25 días cada uno. Por ejemplo, dependiendo del peso corporal de un paciente con leucemia promielocítica aguda, se puede administrar una dosis diaria de trióxido de arsénico superior o inferior a 10 mg. Alternativamente, tras la pauta terapéutica basada en el peso, se puede obtener un efecto terapéutico con una dosis diaria de trióxido de arsénico inferior a 10 mg.

Para el tratamiento del tumor sólido, una pauta posológica preferida implica la infusión intravenosa de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal al día durante 5 días. Este protocolo de tratamiento de cinco días se repite una vez al mes hasta que el crecimiento del tumor se inhibe o cuando el tumor muestra signos de regresión.

El efecto del tratamiento con trióxido de arsénico o melarsoprol sobre el desarrollo y la progresión del cáncer se pueden vigilar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, la determinación de: niveles de antígenos tumorales específicos y posibles biomarcadores, por ej., antígenos carcinoembrionarios (CEA), alfa-fetoproteína; y cambios en la morfología y/o el tamaño usando exploraciones por tomografía computerizada y/o ecografías.

Los niveles en sangre deseables se pueden mantener por infusión continua de un compuesto de arsénico como se puede dilucidar por los niveles plasmáticos. Debe tenerse en cuenta que el médico a cargo del paciente sabrá cómo y cuando finalizar, interrumpir o ajustar el tratamiento a una dosis inferior por motivos de toxicidad, o debido a una disfunción en la médula ósea, hígado o riñón. Inversamente, el médico a cargo del paciente también sabrá cómo y cuando ajustar el tratamiento a un nivel superior si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo efectos secundarios tóxicos).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden trióxido de arsénico como principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, específicamente solución de dextrosa al 5 %, y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos, por ejemplo, ácido todo trans retinoico.

En el caso en el que se emplea una composición para inyección o infusión intravenosa, un intervalo de dosificación adecuado para uso es, por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente 40 mg trióxido de arsénico diario total; de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mg trióxido de arsénico por kg de peso corporal diario total,

o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg de melarsoprol por kg de peso corporal diario total.

Un ciclo de tratamiento ilustrativo de un paciente con leucemia, linfoma o cáncer sólido puede implicar la administración diaria mediante infusión intravenosa de trióxido de arsénico en una solución acuosa a una dosis diaria de aproximadamente 0,01 a 1 mg de trióxido de arsénico por kg de peso corporal del paciente. Preferiblemente, se usan aproximadamente 0,15 mg de trióxido de arsénico por kg de peso corporal al día. El ciclo de tratamiento puede continuar hasta observar remisión de la médula ósea o cuando los efectos secundarios sean graves. El ciclo de tratamiento puede repetirse hasta diez veces a lo largo de aproximadamente 10 meses con un descanso de aproximadamente 3 a 6 semanas entre ciclos. El ciclo de tratamiento posterior a la remisión implica la infusión de trióxido de arsénico a una dosis diaria de aproximadamente 0,15 mg por kg de peso corporal del paciente un día o varios días a la semana durante un total acumulado de 25 días.

5. Ejemplos

A continuación se describen ejemplos de usos de los compuestos de arsénico de la invención en el tratamiento de varios tipos de leucemia. En estos y otros experimentos, se ha encontrado que la formulación de trióxido de arsénico de la presente invención era bien tolerada en seres humanos. Por ejemplo, se administraron 10 mg de la formulación de trióxido de arsénico de la presente invención a tres pacientes una vez al día (dosis plana) en dosis intravenosa.

5.1. El trióxido de arsénico y melarsoprol inducen la apoptosis en líneas celulares de leucemia mieloide

Se investigó la actividad de As_2O_3 y melarsoprol frente a líneas celulares de leucemia mieloide, incluyendo la línea celular de LPA NB4-306 (una línea celular resistente a ácido retinoico derivada de NB4 que ya no expresa la proteína de fusión LPM-RAR α intacta), HL60, KG-1, y la línea celular mielomonocítica U937. Para examinar el papel de LPM en la mediación de la actividad del arsénico, los inventores ensayaron también dichos agentes en fibroblastos de murino embrionario (MEF) y médula ósea (BM), en los que el gen LPM se había inactivado mediante recombinación homóloga. Inesperadamente, se ha encontrado que ambos compuestos inhibían el crecimiento celular e inducían la apoptosis en todas las líneas celulares ensayadas. Melarsoprol fue más potente que As_2O_3 en concentraciones equimolares en un intervalo de 10^{-7} a 10^{-5} mol/l. As_2O_3 relocalizó LPM y LPM-RAR α en los cuerpos nucleares, lo que fue seguido por la degradación de LPM tanto en la línea celular NB4 como en las líneas HL60 y U937. Aunque melarsoprol fue más potente para inhibir el crecimiento e inducir la apoptosis, no afectó a la ubicación nuclear de los LPM y/o LPM-RAR α . Además, tanto As_2O_3 como melarsoprol inhibieron de forma comparable el crecimiento e indujeron la apoptosis de los LPM+/+ y LPM-/-MEF e inhibieron el eritroide de la unidad formadora de colonias (UFC-E) y la formación de UFC de granulocito-monocito en cultivos de BM de progenitores LPM+/+ y LPM-/- . Wang y col., Blood, 1998, 92:1497-1504 proporcionan una descripción detallada de los procedimientos, materiales, y resultados de estos experimentos.

Los resultados de los experimentos muestran que el efecto citotóxico de ambos compuestos de arsénico en estas líneas celulares no está mediado por mecanismos que sean dependientes de la expresión de LPM o LPM-RAR α . En la mayor parte de las líneas, melarsoprol fue algo más potente comparado con As_2O_3 en la inhibición del crecimiento e inducción de apoptosis, y los efectos de ambos fármacos fueron dependientes de la dosis. Como se ha indicado anteriormente, se confirma que As_2O_3 relocalizó la proteína LPM sobre los cuerpos nucleares e indujo la degradación de LPM y LPM-RAR α en células NB4 a la vez que desencadena la apoptosis. Sin embargo, también se observaron efectos análogos en células HL60 y U937 que no contienen el gen de fusión LPM-RAR α . Además, melarsoprol indujo apoptosis en todas las líneas celulares ensayadas sin alterar LPM y/o LPM-RAR α .

La acción diferenciadora de As_2O_3 y melarsoprol parece despreciable in vitro, y no pareció depender de la expresión y/o de la modulación de cualquiera de LPM y/o LPM-RAR α . De hecho, el pequeño efecto observado por los inventores en los cultivos a largo plazo (hasta 2 semanas) fue comparable en todas las líneas celulares ensayadas con ambos compuestos.

También se ha encontrado que la regulación por defecto de bcl-2, que se había vinculado anteriormente a los efectos antileucémicos de As_2O_3 en LPA, tampoco fue dependiente de la expresión de proteína LPM-RAR α , porque se produjo en el subclon 306 de NB4 en el que no se puede detectar la proteína intacta. Finalmente, para ensayar si la expresión de LPM era fundamental para los efectos antileucémicos de los compuestos de arsénico, ambos agentes se ensayaron en fibroblastos de ratón embrionario y células de BM procedentes de animales en los que el LPM se había eliminado mediante recombinación homóloga. En estas células que carecen totalmente de la expresión de LPM, tanto As_2O_3 como melarsoprol fueron igualmente eficaces para inhibir el crecimiento e inducir la apoptosis, y ambos tuvieron efectos similares sobre la formación de colonias UFC-E y UFC-GM normales. Además, no se observaron diferencias entre las células naturales y las LPM-/- . Sin desear quedar limitados por teoría alguna, conjuntamente, estos datos respaldan fuertemente la teoría de que los efectos antileucémicos de los compuestos de arsénico se producen independientemente de la expresión de LPM o de LPM-RAR α . Estos resultados tienen correspondencia con los antecedentes de uso médico de los compuestos de arsénico en enfermedades no caracterizadas por alteraciones en la proteína LPM como, por ejemplo, la leucemia mielocítica crónica.

Los resultados indican que tanto As_2O_3 como melarsoprol son ampliamente activos como agentes contra la leucemia en enfermedades tanto mieloides como linfoides. En conclusión, los datos indican que la actividad citotóxica no está

mediada por la proteína LPM y por tanto no está limitada a enfermedades que están asociadas con alteraciones en la expresión de LPM. Así, los compuestos de arsénico de la presente invención tienen un papel terapéutico potencialmente más amplio que no queda limitado a la LPA.

5.2. Estudio clínico de melarsoprol en pacientes con leucemia avanzada

5 Melarsoprol, un compuesto orgánico de arsénico sintetizado mediante la formación de complejos de óxido de melarsén con dimercaprol, se ha usado principalmente para el tratamiento de la tripanosomiasis africana. Se han investigado los efectos de melarsoprol tras la inducción de la apoptosis en líneas celulares representativas de trastornos linfoproliferativos crónicos de linfocitos B, y los resultados se describen a continuación.

10 El melarsoprol (suministrado como Arsobal [36 mg/ml] por Rhone Poulenc Rorer, Collegetteville, PA) se diluyó en propilenglicol a una concentración de almacenamiento de 10^{-4} mol/l y se almacenó a temperatura ambiente. As_2O_3 (Sigma, St. Louis, MO) se disolvió en 1,65 mol/l de hidróxido de sodio (NaOH) como disolución de almacenamiento de 10^{-3} mol/l. La dilución en serie (de 10^{-6} a 10^{-7} mol/l se hizo en medio RPMI 1640. Una línea celular prolinfocítica B transformada con el virus de Epstein-Barr (VEB) (JVM-2), una línea celular de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-LLC) transformada con el virus de Epstein-Barr (VEB) (I83CLL), y una línea celular B-LLC no transformada con el virus de Epstein-Barr (VEB) (WSU-LLC) se usaron como dianas. Los experimentos de dosis respuesta con melarsoprol (10^{-7} a 10^{-9} mol/l) se realizaron durante 96 horas.

15 Inesperadamente, los inventores han encontrado que melarsoprol produjo una inhibición dependiente de la dosis y del tiempo de la supervivencia y el crecimiento en las tres líneas celulares. Por el contrario, el As_2O_3 a similares concentraciones, no tuvo efecto sobre la viabilidad o el crecimiento. Tras 24 horas, las tres líneas celulares tratadas con melarsoprol (10^{-7} mol/l) mostraron características morfológicas de apoptosis. Se observó una regulación por defecto del ARNm prominente dependiente de la concentración de bcl-2 después de 24 horas de exposición a melarsoprol en células WSU-LLC, I83CLL, y JVM-2. La disminución de la expresión de proteína bcl-2 también se observó en las tres líneas celulares, mientras que As_2O_3 no tuvo efecto sobre este parámetro.

20 Dado que los datos *in vitro* anteriores han demostrado una actividad antileucémica inesperadamente amplia para el melarsoprol contra células tanto mieloides como linfoides, y generalmente a concentraciones menores que en As_2O_3 , se inició un estudio para evaluar la farmacocinética, seguridad y eficacia potencial del melarsoprol en pacientes humanos con recidiva de leucemia o leucemia refractaria.

25 Los pacientes aptos fueron tratados con una corta inyección IV diaria durante 3 días, repetida semanalmente durante 3 semanas, con un ciclo adicional de 3 semanas en los pacientes con respuesta al tratamiento. La dosis inicial fue de 1 mg/kg el Día 1, 2 mg/kg el Día 2, y 3,6 mg/kg el Día 3 y el resto de días posteriormente. En paralelo, los estudios *in vitro* incluyeron sensibilidad del cultivo de células leucémicas recientes tanto a melarsoprol como a As_2O_3 , junto con un estudio de citometría de flujo en serie de la expresión del antígeno superficial, apoptosis, y expresión de bcl-2. Tras pacientes con LMA y un paciente con LMC entraron en el estudio.

30 Usando un procedimiento basado en la cromatografía líquida de alto rendimiento que es sensible a aproximadamente 10 mg/ml, los datos farmacocinéticos preliminares muestran que las concentraciones punta de fármaco en plasma se obtuvieron inmediatamente tras inyección con una C_{max} que oscilaba de 1,2 ng/ml el día 1 a 2,4 ng/ml el día 3. Aunque la fase de distribución inicial fue rápida, un $T_{1/2\gamma}$ prolongado sugirió liberación desde un compartimento profundo. Las áreas de plasma bajo la concentración x curvas de tiempo (ABC) fueron proporcionales a la dosis administrada, oscilando de 0,48 ng·h/ml el día 1 a 1,48 ng·h/ml el día 3. Se encontraron en el plasma concentraciones detectables del fármaco una semana tras la dosificación inicial. El fármaco fue relativamente bien tolerado. Los efectos adversos incluyeron dolor transitorio en el punto de inyección y leve náusea. No se observaron signos de "encefalopatía reactiva" (observada ocasionalmente durante el tratamiento de la tripanosomiasis del SNC).

35 Los resultados de estos estudios sugieren que melarsoprol puede tener una actividad más amplia que el As_2O_3 inorgánico y que, las concentraciones que son citotóxicas para las células leucémicas *in vitro*, y por tanto terapéuticas, se alcanzan rápidamente *in vivo*.

5.3. El trióxido de arsénico induce la apoptosis en células K562 de leucemia mielógena crónica (LMC)

40 La línea celular K562 de LMC positiva para el cromosoma Philadelphia se usó para determinar si el trióxido de arsénico (As_2O_3) promueve la apoptosis en LMC. Cultivos en suspensión de las células en la fase logarítmica se expusieron a As_2O_3 a concentraciones de 1×10^{-5} M, 5×10^{-6} M, y 1×10^{-6} M. Se analizaron alícuotas de las células en diferentes puntos temporales durante 72 horas para evaluar la viabilidad y la apoptosis. La viabilidad se midió usando exclusión de azul tripán; a la vez, la apoptosis se detectó mediante morfología, citometría de flujo y electroforesis en gel de ADN.

45 El trióxido de arsénico a una concentración de 1×10^{-6} M no tuvo efecto sobre el crecimiento o la viabilidad de las células K562. El mayor efecto sobre el crecimiento celular y la supervivencia se observó a 1×10^{-5} M de As_2O_3 . Los datos de crecimiento celular y viabilidad de las células K562 tras 72 horas de exposición se registran en la Tabla 1:

Tabla 1:

	% Afectación del crecimiento celular	% Viabilidad	Valor p
Control	0	92,1 ± 0,9	
5 x 10 ⁻⁶ M As ₂ O ₃	63.0	78,8 ± 0,5	0,0001
1 x 10 ⁻⁵ M As ₂ O ₃	75.3	61,9 ± 2,9	0,0223

Se analizó la evidencia de que esta disminución de la viabilidad inducida por el arsénico representó apoptosis. Los rasgos morfológicos de la apoptosis, incluyendo abollonaduras en la membrana y la condensación nuclear fueron evidentes en los citoespinos teñidos de las células K562 incubadas con 10⁻⁵ M de As₂O₃ durante 72 horas. Esto se correspondió con evidencias de daños internucleosomales en el ADN visualizado mediante electroforesis en gel del ADN extraído de las células K562 expuestas a 10⁻⁵ M de As₂O₃. La evaluación cuantitativa de la apoptosis, medida por el procedimiento TUNEL, demostró que un 75,6 % ± 8,6 (1 x 10⁻⁵ M de As₂O₃) de las células mostraron apoptosis en comparación con un 6,3 % ± 3,0 (control) a las 72 horas. El tratamiento de las células K562 con 10⁻⁵ M de As₂O₃ dio como resultado una regulación en exceso del ARNm de p21 según fue detectado mediante análisis de transferencia Northern, sugiriendo una detención de las células en la fase G1 del ciclo celular. Estos datos indican que trióxido de arsénico es un agente terapéutico para la LMC.

5.4. Ensayos terapéuticos con ácido retinoico y trióxido de arsénico (As₂O₃) en ratones transgénicos LPM-RAR α y PLZF-RAR α

La leucemia promielocítica aguda (LPA) está asociada con translocaciones en los cromosomas que invariablemente implican la translocación del locus del receptor α de ácido retinoico (RAR α) en el cromosoma 17 a otros loci del genoma, tales como en la mayoría de casos de LPA, el gen de LPM ubicado en el cromosoma 15, y en pocos casos, el gen PLZF en el cromosoma 11. Los pacientes que tienen la t(15;17) son sensibles al tratamiento con ácido retinoico todo trans (ATRA), con tasas de remisión completa del 75 % al 95 %. La LPA asociada a t(11;17) (PLZF-RAR α) muestra una respuesta mala al ATRA.

Para probar la eficacia del As₂O₃ en el tratamiento de LPA, se crearon modelos de la enfermedad en ratones transgénicos. Los ratones transgénicos se generaron por técnicas convencionales en las que la expresión de las proteínas de fusión LPM-RAR α o PLZF-RAR α se ha colocado bajo el control de un minigen mieloide-promielocítico específico de la catepsina-G humana (hCG). Ambos ratones transgénicos hCG-LPM/RAR α y hCG-PLZF-RAR α desarrollaron leucemia mieloide con rasgos de LPA similares a los que aparecen en seres humanos.

Se iniciaron ensayos terapéuticos realizados sobre estos ratones leucémicos con las siguientes pautas posológicas: 1) ATRA: 1,5 mg por gramo de peso corporal por día administrado oralmente; y 2) ATRA: 6 μ g por gramo de peso corporal al día administrado por vía intraperitoneal. Se extrajo sangre de los ratones una vez a la semana para evaluar la respuesta.

Las leucemias LPM/RAR α respondieron bien al ATRA con elevadas tasas de remisión (80 % con la pauta 1). Sorprendentemente, *in vitro*, ATRA indujo la diferenciación, e inhibió el crecimiento de las células leucémicas así como la formación de colonias leucémicas en los progenitores situados en la médula ósea y el bazo en ambos tipos de leucemias LPM-RAR α y PLZF-RAR α . Además, en experimentos, *ex vivo*, las células leucémicas de los ratones PLZF-RAR α perdieron su capacidad tumorigénica cuando se trasplantaron a un ratón receptor lampiño tras preincubación con ATRA, mientras que las células no tratadas fueron tumorigénicas. Sin embargo, *in vivo*, las leucemias PLZF-RAR α respondieron mal al ATRA (28 % con la pauta 1), mientras que dosis más elevadas de ATRA parecieron más eficaces (50 % con la pauta 2). En conclusión, las leucemias de los ratones transgénicos PLZF-RAR α son sensibles al tratamiento con ATRA, pero podrían requerir pautas terapéuticas con dosis más elevadas de ATRA. Estos hallazgos tienen implicaciones directas en el tratamiento de los pacientes de LPA con t(11;17).

En ambas leucemias LPM-RAR α y PLZF-RAR α , ATRA prolongó la supervivencia, pero las leucemias recidivaron poco después de alcanzar la remisión, y resultaron refractarias a tratamiento posterior con ATRA. Los dos modelos de ratón transgénico también se usaron para ensayar la eficacia y dosificación de As₂O₃, y ATRA+As₂O₃ combinado para el tratamiento de pacientes de LPA resistentes a ATRA, y en LPA asociado con t(11;17). Se administró intraperitonealmente una pauta de As₂O₃ a 6 μ g por día o una combinación de As₂O₃ a 6 μ g con ATRA a 1,5 o 6 μ g por gramo de peso corporal por día. Se extrajo sangre de los ratones una vez a la semana para evaluar la remisión de la LPA.

5.5. Fabricación y estabilidad de la formulación farmacéutica

El trióxido de arsénico (As₂O₃) ultrapuro se solubilizó en una solución 5 M de hidróxido de sodio (NaOH). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos lo que resultó en una solución transparente y homogénea. La solución de As₂O₃ (2 ml, 1,0 M) se añadió a 393,6 ml de H₂O en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, que proporcionó una concentración de As₂O₃ de 1 mg/ml a pH = 12. Se preparó una solución de HCl 5,0 M por dilución de HCl (49,26 ml, 37 % p/p, 10/15 M) con H₂O (50,74 ml) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. La solución

de HCl se transfirió posteriormente mediante una jeringa a un envase de 1000 ml vacío evacuado. La solución de As_2O_3 se volvió a valorar con HCl (0,725 ml, 5,0 M) hasta pH 8,0. Aproximadamente 10 ml de solución de As_2O_3 vuelta a valorar se filtraron a través de una unidad de filtro Millex-GS de 0,22 μm y se añadieron a cada uno de aproximadamente 30 viales estériles evacuados. Para preparar la composición farmacéutica a inyectar por vía intravenosa a los pacientes, 10 ml de esta solución se retiraron de dos de los viales y se agregaron a 500 ml de una solución de dextrosa al 5 %, lo que produjo un pH final de 6,5.

La elevada pureza del material de partida a granel se confirmó (véase la Tabla 1) por espectroscopía de absorción atómica. Se ensayaron muestras duplicadas de cuatro soluciones intermedias o finales para determinar el contenido total en arsénico. El ensayo del polvo a granel confirmó la pureza extremadamente elevada del material de partida. Los datos del contenido en arsénico de las soluciones intermedias y de producto terminado se presentan en la Tabla 2 a continuación.

Los datos mostrados a continuación muestran que las soluciones son estables, ya que no aparece indicación de ninguna pérdida de peso de arsénico con el tiempo.

Tabla 2 Contenido en arsénico (ppm) de la formulación intermedia y la solución de producto terminado de trióxido de arsénico.

Código de la muestra	A-01*	A-02	A-03	A-04	A-05
Alícuota A	140.600	600	707	629	680
Alícuota B	139.000	564	703	688	687
Varianza del ensayo	1,1 %	6 %	0,57 %	8,7 %	

* Identidad de los códigos de las muestras:

A-01: solución de producto intermedio tras solubilización inicial en NaOH.

A-02: solución de producto intermedio antes de la valoración con HCl.

A-03: producto intermedio antes de la filtración en Millex.

A-04: producto terminado a partir de 10 ml de un vial llenado estéril inmediatamente tras la fabricación.

A-05: producto terminado procedente de viales tapados dos meses después de la fabricación

6. Ejemplos: ensayos clínicos en pacientes de LPA

Se evaluó el trióxido de arsénico en pacientes con LPA para determinar si este agente inducía citodiferenciación o apoptosis. 12 pacientes con recidiva que se habían sometido a un extenso tratamiento anterior se trataron con trióxido de arsénico en dosis comprendidas de 0,06 a 0,2 mg/kg por día hasta conseguir remisión de la médula ósea. Las células mononucleares de la médula ósea se vigilaron en serie mediante citometría de flujo para determinar el inmunofenotipo, hibridación in situ con fluorescencia (FISH), reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para determinar la expresión de LPM/RAR- α y determinación mediante transferencia Western de las proteínas asociadas con la apoptosis, las caspasas 1, 2 y 3. Los resultados demostraron que bajas dosis de trióxido de arsénico son muy eficaces para inducir la remisión completa en pacientes con recidiva de LPA. La respuesta clínica se asoció a la citodiferenciación incompleta y la inducción de apoptosis con activación de la caspasa en las células leucémicas.

6.1. Procedimientos

Protocolo clínico: los requisitos de elegibilidad incluyeron un diagnóstico de LPA confirmado por citogenética o análisis de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) con translocación t(15;17), o mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para determinar LPM/RAR- α . Los pacientes deberían tener recidiva del tratamiento convencional con ácido retinoico todo trans más una combinación de fármacos citotóxicos. Se requirió la firma de un consentimiento informado, y el protocolo fue revisado y aprobado por los comités de revisión institucional del centro.

Tratamiento con trióxido de arsénico: el trióxido de arsénico se suministró como una solución acuosa en viales de 10 ml que contenían 1 mg/ml de fármaco. El fármaco se diluyó adicionalmente en 500 ml de solución de dextrosa al 5 % y se perfundió por vía intravenosa durante de 2 a 4 horas una vez al día. Aunque el grupo inicial de pacientes recibió bien 10 o 15 mg/día como dosis plana, la derivación de dos niños llevó a la invención a una pauta basada en el peso (0,15 mg/kg/día) que hasta el momento era desconocida. El fármaco se proporcionó diariamente hasta que se observó remisión de la médula ósea. Los pacientes que alcanzaron la remisión completa fueron candidatos a tratamiento con ciclos adicionales de tratamiento de 3 a 6 semanas tras el ciclo anterior. Se proporcionaron por lo general ciclos posteriores a una dosis de 0,15 mg/kg/día durante un total acumulado de 25 días, administrados bien diariamente o en un calendario de algunos días a la semana, para un total de 6 ciclos durante aproximadamente 10 meses. Seguimiento durante el estudio: los pacientes con coagulopatía recibieron una transfusión de plaquetas y plasma fresco-congelado para mantener el recuento de plaquetas y fibrinógeno en los niveles deseados ≥ 50.000 células/mm³ y de ≥ 100 mg/dl. Se obtuvieron series de recuentos sanguíneos, estudios de coagulación, perfiles de química sérica, análisis de orina y electrocardiogramas. Se realizó una aspiración de médula ósea y/o una biopsia al inicio del ensayo y periódicamente después hasta documentar la remisión. Se usaron los criterios de respuesta

convencionales, que incluyeron recuperación de la médula ósea hasta $\leq 5\%$ de blastos, leucocitos de la sangre periférica ≥ 3.000 células/mm³ y plaquetas ≥ 100.000 células/mm³.

Estudios del inmunofenotipo celular: se recogieron médula ósea o muestras de sangre heparinizadas, y se aislaron las células mononucleares por centrifugación Ficoll-Hypaque. Se detectaron los antígenos de superficie de la membrana mediante tinción de inmunofluorescencia directa con isotionato de fluoresceína (FITC) o anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina: CD16 (Leu 11a) CD11b, CD33 (Leu M9), HLA-DR, CD45, y CD14, adquiridos bien de Becton-Dickinson (Mountainview, CA) o de Immunotech Immunology (Marsella, Francia). La tinción de doble color se llevó a cabo incubando las células simultáneamente con dos anticuerpos monoclonales incluyendo CD33-PE/CD11b-FITC y CD33-PE/CD16-FITC. Los controles negativos usaron inmunoglobulinas monoclonal irrelevantes del mismo isotipo y se analizaron al mismo tiempo. Los análisis de citometría de flujo se llevaron a cabo en un citómetro de flujo EPICS Profile II (Coulter Electronics) equipado con un láser de argón a 488 nm. Se determinaron los parámetros celulares de dispersión frontal y lateral, y se combinaron con la tinción CD45/CD14 para identificar las poblaciones de interés y para excluir los monocitos de la rejilla de análisis. Se usaron un sistema de adquisición datos multiparamétrico y un sistema de visualización (MDADS, Coulter Electronics) para adquirir y analizar los datos.

Hibridación con fluorescencia in situ (FISH): muestras específicas que se habían sometido a tinción de inmunofluorescencia para determinar CD33 y CD11b se clasificaron para determinar las células que expresaban simultáneamente ambos antígenos mediante un clasificador celular FACStar Plus (Becton-Dickinson). Las células separadas se incubaron en medio de cultivo a 37 °C durante una hora, se trataron con solución hipotónica de KCl 0,075M durante 5 minutos, se fijaron con fijador de metanol:ácido acético 3:1, y se dejaron secar al aire. Se llevó a cabo una FISH de interfase usando una sonda de doble color específica de la translocación LPM/RAR- α (Vysis; Downer's Grove, IL). En resumen, el ADN procedente de las células en interfase se desnaturalizó sumergiendo los portas en una solución de formamida/2xSSC al 50 % a 73 °C durante 5 minutos; a continuación los portas se deshidrataron en alcohol y se secaron al aire. Se aplicó una mezcla de sondas en la mezcla de hibridación, se taparon con un cubre, y se precintaron con cemento de caucho. La hibridación se llevó a cabo a 37° C en una cámara húmeda durante aproximadamente de 12 a 16 horas. Tras la hibridación, la sonda no unida se eliminó lavando los portas a 45° C en una solución de formamida/2x5SC al 50 % a 45 °C tres veces durante 10 minutos cada una, seguida por lavado en una solución de 2xSSC/0,1 NP-40 a 45 °C durante 5 minutos. Los portas se secaron después al aire, y se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol y se taparon con un cubre de vidrio. El análisis de las células en interfase para determinar las señales fluorescentes se realizó con una cámara Photometrics Sensys colocada en un axioscopio Zeiss. Se estudiaron un mínimo de 300 células de cada muestra.

Análisis de transferencia Western: las células se lisaron en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, ácido etilenglicol [bis]-[aminocacil] tetraacético 0,5 mM, NaCl 170 mM, ditiotreitól 1mM, NP-40 al 0,2 %, aprotinina 0,01 U/ml, 10 μ g/ml de leupeptina, 10 mg/ml de pepstatina y fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 μ M (todos de Sigma). Los lisados se sonicaron a continuación con un homogeneizador ultrasónico (serie 471c, Cole Parmer Instruments, Chicago, IL) y se centrifugaron a 7.500 g (Sorvall Instruments, Newtown, CT). El contenido en proteína de los lisados se determinó mediante un kit de ensayo de proteínas de BioRad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a 595 nm con un patrón de BSA. Se añadió un tampón de muestra que contenía glicerol al 10 %, SDS al 0,4 %, azul de bromofenol al 0,3 %, pironina Y al 0,2 %, en 1x de tampón de apilación (base Tris 0,5 M, SDS al 0,8 %), 2-mercaptoetanol al 20 %, a los lisados celulares, que se desnaturalizaron térmicamente a 95 °C durante 3 min. Posteriormente, se cargaron, 15 μ g/hilera de proteína en un gel de SDS-poliacrilamida que contenía poliactilamida al 12,5 % y que se fraccionó por tamaños mediante electroforesis. Las proteínas se electrotransfirieron a medio de transferencia (Bio-Rad) y se tiñeron con Ponceau-S como control interno de carga. Se agregaron anticuerpos monoclonales de conejo dirigidos contra Ig humana, incluyendo, caspasa 1, caspasa 2 (ambas de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), y caspasa 3 (PharMingen, San Diego, CA), y los anticuerpos unidos se detectaron mediante un equipo de detección de quimioluminiscencia ECL™ (Amersham, Arlington Heights, IL). Las bandas de proteína se cuantificaron mediante densitometría informatizada.

Análisis RT-PCR para determinar LPM/RAR- α : el análisis mediante RT-PCR se llevó a cabo con procedimientos anteriormente descritos (Miller y col., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. 89:2694-8; Miller y col., 1993, Blood, 82:1689-94).

6.2. Resultados

Pacientes: se trataron doce pacientes con LPA en recidiva o bien refractaria. Todos los pacientes habían recibido amplio tratamiento anterior con fármacos retinoides y citotóxicos (Tabla 3). Dos pacientes presentaban recidiva tras un trasplante alógeno de médula ósea, uno de los cuáles también había tenido un fracaso con reinfusión de linfocitos T procedentes de donante. Uno de los pacientes estaba sometido a hemodiálisis debido a insuficiencia renal crónica.

Eficacia clínica: once de los doce pacientes alcanzaron la remisión completa tras el tratamiento con trióxido de arsénico. El paciente sometido a hemodiálisis tuvo una hemorragia intracraneal el día 1 y falleció el día 5. La duración promedio del tratamiento en los pacientes con respuesta positiva fue de 33 días (intervalo de 12 a 39 días), la dosis diaria promedio fue de 0,16 mg/kg (intervalo, 0,06 a 0,2 mg/kg), y la dosis acumulada media durante la inducción fue 360 mg (intervalo, 160 a 515 mg) (Tabla 3). Se alcanzó remisión completa según todos los criterios en

un tiempo promedio de 47 días (intervalo, 24 a 83 días) tras el inicio del tratamiento. La remisión según los criterios de la médula ósea —el factor determinante para suspender el tratamiento— se había alcanzado primero, seguido secuencialmente por la recuperación de los leucocitos de la sangre periférica y las plaquetas. En el intervalo de dosis usado en este estudio, no fueron evidentes diferencias en la eficacia o el tiempo de respuesta. Tras 2 ciclos de tratamiento, 8 de los 11 pacientes ensayados habían convertido el resultado de sus ensayos mediante RT-PCR para determinar LPM/RAR- α de positivo a negativo.

Los 11 pacientes en remisión completa completaron al menos un ciclo de tratamiento posterior a la remisión con trióxido de arsénico. Cada uno de cuatro, dos y un paciente completó un total de tres, cuatro y cinco ciclos de tratamiento, respectivamente. La duración media de la remisión es 5+ meses (intervalo, 1 a 9+ meses). Sin embargo, 3 de los 11 pacientes presentaron recidiva durante el segundo ciclo de tratamiento; ninguno de estos pacientes había convertido el resultado de sus ensayos mediante RT-PCR y parece que cada uno de ellos había adquirido rápidamente resistencia al fármaco. Desde entonces, dos de estos individuos fallecieron debido a leucemia progresiva.

Acontecimientos adversos: el estado clínico de los pacientes de este estudio fue muy variable, lo que reflejaba su amplio tratamiento anterior. El protocolo no requirió hospitalización; tres pacientes completaron el tratamiento de inducción en su totalidad como pacientes extrahospitalarios, y otra persona fue hospitalizada exclusivamente para colocar un catéter venoso. Sin embargo, 8 pacientes fueron hospitalizados debido a complicaciones de la leucemia, 5 de los cuáles requirieron transferencia a una unidad de cuidados intensivos, intubación endotraqueal, y ventilación asistida debido a complicaciones que incluían hemorragia pulmonar, insuficiencia renal, sepsis, enfermedad de injerto contra hospedador, infiltrados pulmonares no específicos, o hipotensión. Un paciente requirió inserción de un marcapasos permanente tras desarrollar un bloqueo cardiaco de segundo grado en el marco de acidosis metabólica grave, hiperpotasemia, hipotensión e insuficiencia renal. Sin embargo, el bloqueo cardiaco revertió a pesar de volver a tratarse con un tratamiento adicional de trióxido de arsénico. El fármaco se retiró temporalmente debido a complicaciones médicas intercurrentes en 5 pacientes durante un promedio de 2 días (intervalo, 1 a 5 días). Dos pacientes desarrollaron síntomas análogos a los del "síndrome del ácido retinoico"; ambos presuntamente fueron tratados con dexametasona y mejoraron. Solamente dos pacientes no necesitaron trasplante de plaquetas en cualquier caso; el número promedio de unidades de plaquetas trasfundidas fue de 61 (intervalo, 0 a 586 unidades).

La mediana del recuento total de leucocitos en sangre periférica fue a la entrada de 4.700 células/mm³ (intervalo, 500 a 144.000 células/mm³). Seis pacientes desarrollaron leucocitosis (es decir, ≥ 20.000 células/mm³) el intervalo fue de 20.800 a 144.200 células/mm³. No se administró tratamiento adicional a estos pacientes, y la leucocitosis se resolvió en todos los casos sin intervención adicional.

Las reacciones adversas habituales incluyeron mareos durante la infusión, fatiga, dolor musculoesquelético, e hiperglucemia leve. Tres pacientes desarrollaron disestesias presumiblemente debidas a neuropatía periférica. Sin embargo, 2 de estos pacientes habían estado inmovilizados durante periodos prolongados debido a ventilación asistida, y el otro paciente tenía antecedentes clínicos de neuropatía.

Estudios del inmunofenotipo: la LPA se caracteriza por células que expresan CD33, un antígeno asociado normalmente con las células mieloides primitivas. El tratamiento con trióxido de arsénico indujo una disminución progresiva en la proporción de células que expresaban exclusivamente CD33, junto con un aumento en la proporción de células que expresaban CD11b, un antígeno asociado con elementos mieloides maduros. Aunque estos cambios se anticiparían para cualquier agente que indujera la remisión de LPA, el trióxido de arsénico también indujo la expresión de las células que expresaban simultáneamente ambos antígenos. En la mayor parte de los casos, estas células de doble expresión dominaron la población celular mieloides, y persistieron durante periodos prolongados tras alcanzarse la remisión completa según los criterios clínicos.

Análisis de hibridación con fluorescencia in situ: las células mononucleares de la médula ósea tomadas de un paciente al inicio y después tras la remisión completa, se clasificaron mediante citometría de flujo en busca de la expresión simultánea de CD33 y CD11b. Mediante análisis de hibridación con fluorescencia in situ (FISH), se examinaron trescientas células al inicio de la remisión. De forma similar a las células LPA de control, la mayoría de estas células proporcionaron una señal híbrida, indicando una translocación entre los genes LPM y RAR- α en su origen procedente del clon neoplásico. Sin embargo, cuando estas células del mismo paciente se clasificaron de nuevo, usando los mismos parámetros posteriormente en la remisión, solo se detectó el modelo normal de las señales de fluorescencia, indicando su derivación de los progenitores hematopoyéticos normales.

Análisis de transferencia Western: los extractos de proteína procedentes de las células mononucleares de la médula ósea se analizaron en serie mediante análisis de transferencia Western. El análisis demostró que las formas precursoras de caspasa 2 y caspasa 3 estaban reguladas en exceso in vivo en respuesta al tratamiento con el trióxido de arsénico. Además, este tratamiento también indujo la expresión de fragmentos escindidos de caspasa 1, indicando activación de la enzima. Esto es también alguna indicación de que la expresión de la forma escindida de la caspasa 3 había aumentado. El anticuerpo usado en estos experimentos no reacciona con la forma escindida de la caspasa 2.

6.3. Discusión

En este estudio, con pocas excepciones, los pacientes admitidos en el ensayo tenían varias recidivas y eran resistentes a la quimioterapia convencional, retinoides o trasplante de médula ósea. Al inicio, los pacientes del estudio sufrieron numerosas complicaciones relacionadas con la leucemia, incluyendo insuficiencia respiratoria, infección diseminada por varicela zóster, aspergilosis de la cavidad oral, insuficiencia renal crónica y enfermedad de injerto contra hospedador. Además, 5 de los 12 pacientes necesitaron ingreso en una unidad de cuidados intensivos para recibir ventilación asistida y cuidados de apoyo, pero estas complicaciones no estuvieron directamente relacionadas con el tratamiento con trióxido de arsénico.

Casi todos los pacientes con un diagnóstico confirmado de LPA consiguieron la remisión de una mortalidad temprana asociada con el tratamiento con retinoides. Aunque observado con menos frecuencia en comparación con el tratamiento con ácido retinoico todo trans, el trióxido de arsénico indujo una leucocitosis notable en algunos pacientes. Tras la retirada de otros fármacos citotóxicos, la leucocitosis desapareció en cuanto los pacientes alcanzaron la remisión. A pesar de 3 recidivas tempranas, 8 de 11 pacientes tratados convirtieron el resultado de sus ensayos mediante RT-PCR para determinar LPM/RAR- α (un marcador molecular de la enfermedad residual) en negativo, un fenómeno que es inusual tras el tratamiento exclusivo con ácido retinoico todo trans. Finalmente, el trióxido de arsénico es activo para la LPA en un intervalo de al menos tres veces el intervalo de 0,06 a 0,20 mg/kg.

El ácido todo-trans retinoico induce una diferenciación "terminal" de las células de LPA, pero los efectos citodiferenciales del trióxido de arsénico parecen ser incompletos. El arsénico induce una población de células que expresa simultáneamente antígenos de superficie característicos de células tanto maduras como inmaduras (es decir, CD11b y CD33, respectivamente). En una etapa temprana de la inducción, estas células retienen la translocación t(15;17) que caracteriza la LPA. Inesperadamente, estas células persistieron en la médula ósea a pesar de haber conseguido una remisión clínicamente completa; sin embargo, más adelante en la remisión, las células que expresaban simultáneamente ambos antígenos –aunque seguían siendo detectables– dejaron de ser positivas mediante hibridación in situ. El aspecto morfológico de las células leucémicas durante el tratamiento es también francamente distintivo del observado durante el tratamiento con ácido retinoico todo trans. De hecho, las células leucémicas procedentes de varios pacientes presentaron pocos cambios morfológicos durante 10 o más días, tras lo cual, la proporción de células leucémicas disminuyó de forma progresiva.

Tras la diferenciación "no terminal" el trióxido de arsénico pareció inducir apoptosis, coincidente con el aumento en la expresión y la conversión de cisteína proteasas (denominadas caspasas) a partir de precursores inactivos en enzimas activas. Solo recientemente se ha caracterizado la ruta de las caspasas como una ruta importante en la muerte celular programada. Reconocida inicialmente debido a la homología entre la proteína ced-3 de *C. elegans* y la enzima convertidora de la interleucina-1 β (ICE), la familia de las caspasas abarca en la actualidad al menos 10 proteínas diferentes que escinden numerosos polipéptidos. En las líneas celulares leucémicas, la activación de caspasa se puede inducir con numerosos agentes citotóxicos, incluyendo el ácido retinoico todo trans. Puesto que estos enzimas inducen una amplia proteólisis, se puede pensar que LPM/RAR- α es un sustrato de la caspasa.

Una similitud final compartida por el trióxido de arsénico y el ácido retinoico todo trans es el rápido desarrollo de resistencia clínica en algunos individuos. Las células leucémicas tomadas de dos pacientes que sufrieron recidiva retuvieron la sensibilidad in vitro en concentraciones comprendidas de 10^{-4} M a 10^{-7} M. Se ha descrito una resistencia al arsénico relativa debida a la disminución del transporte celular asociada a la regulación por defecto de los transportadores de membrana codificado por el operón *ars* en células bacterianas. La resistencia en células de mamífero está menos bien caracterizada, pero las alteraciones en el transporte de membrana o el eflujo son probablemente factores importantes.

En resumen, el trióxido de arsénico induce la remisión completa en pacientes con LPA que sufrieron recidiva con tratamiento extensivo anterior. Este fármaco ocasiona una citodiferenciación parcial pero incompleta de las células leucémicas, seguido por activación de la caspasa e inducción de apoptosis.

Tabla 3: Características clínicas y resultados de la terapia de inducción de pacientes con leucemia promielocítica aguda tratadas con trióxido de arsénico.

Edad (años)	Nº de recidivas	Duración del tratamiento (días)	Dosis diaria (mg/kg)	Dosis acumulada (mg)	Tiempo hasta la remisión (días)	Plaquetas \geq 100.000/mm ³	Leucocitos \geq 3.000/mm ³
36	1*	36	0,16	360	54	36	54
45	3*a	39	0,12	390	83	39	83
31	3a,b	37	0,18	370	41	39	41
25	2	16	0,06	160	24	16	16
62	2*d	30	0,11	300	41	41	31
75	1	12	0,20	180	30	30	30
40	1*	33	0,16	495	47	47	43
13	2*a,b	27	0,18	270	50	41	52
9	1*	33	0,17	165	28	28	28

(cont.)

70	1 ^c	28	0,16	420	77	77	49
28	2 [*]	36	0,15	515	54	47	54
25	3	5	0,15	75	†	†	†

5 Todos los pacientes habían recibido anteriormente uno o más ciclos de ácido todo-trans retinoico más el antibiótico antraciclina más citosina arabinósido. *Denota personas con resistencia demostrada a retinoides (es decir, falta de respuesta durante la reinducción o recidiva durante el tratamiento de mantenimiento con retinoides); † Denota un paciente que falleció tempranamente. Otro tratamiento: ^a mitoxantrona/etopósido; ^b trasplante alogénico de médula ósea; ^c metotrexato/vincristina/6-mercaptopurina; ^d ácido retinoico 9-cis más M195 (anticuerpo monoclonal anti-CD33).

7. Ejemplos: uso clínico en linfoma

10 Basándose en el descubrimiento inicial de los efectos antitumorales del trióxido de arsénico in vitro contra líneas celulares de linfocitos B, los inventores trataron un paciente con linfoma macrocítico de grado intermedio que había experimentado recidiva a partir de múltiples formas de tratamiento convencional, incluyendo trasplante autólogo de médula ósea. A pesar de la rápida evolución de su enfermedad antes de iniciar el tratamiento con el trióxido de arsénico, el tratamiento con trióxido de arsénico consiguió un acortamiento importante (>50 %) en el tamaño de sus ganglios linfáticos cancerosos y bazo, que también se asoció con una importante mejora en su calidad de vida.

15 8. Ejemplos: uso clínico en cáncer no hematopoyético

20 El trióxido de arsénico también se usó para tratar el cáncer de colon. En una prueba preliminar, un paciente con cáncer de colon que recibió tratamiento con trióxido de arsénico mostró una reducción importante en su nivel sérico de CEA (antígeno carcinoembrionario). El paciente recibió una infusión intravenosa diaria de 0,1-5 mg de trióxido de arsénico por kg de peso corporal al día durante cinco días. Se observó una variación en el nivel de CEA desde 19.901 ng/ml a 15.266 ng/ml, una reducción del 23 %. Es bien sabido que un nivel reducido del CEA sérico está asociado con la respuesta antitumoral.

Los datos clínicos confirman que el trióxido de arsénico también se puede usar para tratar otros cánceres hematopoyéticos, como el cáncer de colon.

9. Ejemplos: estudios farmacocinéticos

25 Se realizaron varios estudios de fijación de dosis para examinar la farmacocinética (FC) y los efectos biológicos del As₂O₂ en pacientes con LPA y en pacientes con otras enfermedades hematológicas. En pacientes con LPA, las células mononucleares de la médula ósea se analizaron en serie mediante citometría de flujo para determinar el inmunofenotipo, la hibridación con fluorescencia in situ (FISH), y la expresión de la transferencia Western de las proteínas relacionadas con la apoptosis, las caspasas 1, 2 y 3. Las células que expresaban simultáneamente CD11b
30 y CD33, y que según el análisis mediante FISH contienen la translocación t(15;17) aumentaron progresivamente durante el tratamiento y persistieron desde el principio de la remisión completa. El As₂O₂ también indujo la expresión in vivo de las proenzimas de caspasa 2 y caspasa 3 y la activación tanto de la caspasa 1 como de la caspasa 3. El análisis FC de sangre y orina para determinar el contenido en arsénico elemental (As) mostró que el As estaba distribuido en las fracciones tanto plasmática como eritrocítica de la sangre completa. Las curvas de eliminación paralela sugirieron que estos 2 compartimentos se intercambiaban libremente, y que disminuían desde los valores punta con semividas iniciales de aproximadamente 60 min. El AUC medio en el día 1 fue de aproximadamente 400
35 ng·h/ml. Aproximadamente un 20 % de la dosis administrada se recuperó en la orina en las primeras 24 h.

40 A continuación, los inventores iniciaron un estudio de fijación de dosis en pacientes con enfermedades diferentes a LPA usando una pauta diaria de dosificación intravenosa durante un total acumulado de 25 días por ciclo de tratamiento cada 3-5 semanas en niveles de dosis de 0,1 y 0,15 mg por kg de peso corporal por día. Hasta la fecha, 10 pacientes fueron admitidos, incluyendo pacientes con LLC (2 pacientes), AML (3 pacientes), linfoma (4 pacientes), y LMC (1 paciente). Cinco pacientes se retiraron del estudio anticipadamente por la rápida evolución y 5 completaron en ciclo planificado de 25 días. Durante este intervalo de dosis, el fármaco ha demostrado que es bien tolerado; los efectos adversos incluyeron erupción dérmica, mareos durante la infusión, fatiga, y prolongación del
45 intervalo QTc en el ECG. Los resultados de este estudio en curso muestran que el uso clínico del As₂O₃ induce diferenciación parcial y apoptosis en LPA, pero que los efectos terapéuticos de este agente no están confirmados para este trastorno.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende trióxido de arsénico, que comprende las etapas de:

- 5
- a. solubilizar el trióxido de arsénico en una solución acuosa a un pH superior a 12 para formar una solución de trióxido de arsénico.
 - b. neutralizar la solución de trióxido de arsénico con un ácido hasta un pH de 8 a 8,5;
 - c. diluir la solución de trióxido de arsénico de la etapa (b) en una solución de dextrosa al 5 % que estabiliza y disminuye el pH a aproximadamente 7,0; y
 - d. esterilizar la composición farmacéutica.

10