

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 315**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/50** (2006.01)

**A61K 9/50** (2006.01)

**A61K 31/282** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2008** **E 08864169 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015** **EP 2224950**

54 Título: **Medicamento para el tratamiento del cáncer de páncreas**

30 Prioridad:

**24.12.2007 FR 0760345**

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

**05.06.2015**

73 Titular/es:

**ERYTECH PHARMA (100.0%)  
60 AVENUE ROCKEFELLER  
69008 LYON, FR**

72 Inventor/es:

**DUFOUR, EMMANUELLE-CÉCILE y  
GODFRIN, YANN**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 537 315 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

Medicamento para el tratamiento del cáncer de páncreas

5 **[0001]** La presente invención se refiere al tratamiento terapéutico de cáncer de páncreas. Se refiere, en particular, a una nueva composición para el tratamiento de este tipo de cáncer y un uso terapéutico asociado.

10 **[0002]** El cáncer de páncreas es la sexta causa más común de muerte por cáncer en Francia (7.181 muertes en 2000), y la quinta causa más común de muerte por cáncer en los países industrializados, y en Estados Unidos se ha convertido en la cuarta causa más común de muerte en el hombre. En Francia su incidencia es de 5 a 10/100.000 habitantes por año y aumenta ligeramente (1 a 2%) cada año. Representa el 7% de los cánceres del sistema digestivo y afecta a los hombres (60%) con más frecuencia que a las mujeres (40%). Dado que el diagnóstico se hace a menudo en la etapa avanzada, las metástasis se detectan en la mitad de los casos, con el resultado de que el tiempo medio de supervivencia en este tipo de cáncer es de sólo unos meses con de un 4 a un 6% de supervivientes a los 5 años. La mediana de supervivencia, todas las etapas combinadas, es de 4 a 7 meses y aumenta en 15 a 18 meses en pacientes que han sido sometidos a resección.

20 **[0003]** Si el tumor no es operable o muestra metástasis, la quimioterapia puede considerarse en pacientes informados en buen estado general. Las tasas de respuesta son del orden del 15 al 30%. Los medicamentos utilizados son gemcitabina (Burris et al., *European Journal of Cancer*, 1997, 33: 18-22), la combinación de gemcitabina y oxaliplatino (Zhao et al, *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2007, 6 (5): 461-463), y 5-fluorouracilo en combinación con un derivado de platino. Estas quimioterapias permiten incrementar moderadamente la mediana de supervivencia de los pacientes con metástasis, que es de 4 a 6 meses sin tratamiento.

25 **[0004]** A pesar de los avances registrados con nuevas quimioterapias, el pronóstico para el cáncer de páncreas sigue siendo muy malo. Incluso en los pacientes operados con fines curativos, la tasa de supervivencia es de sólo aproximadamente el 20% a los 5 años, debido a las recaídas locales y metastásicas.

30 **[0005]** En vista de la gravedad y el muy mal pronóstico asociado con el cáncer de páncreas, y el progresivo aumento de su incidencia en la población de los países occidentales, en particular, existe una necesidad real de proponer un tratamiento alternativo más eficaz que los actualmente propuestos.

35 **[0006]** La asparaginasa es una enzima producida a partir de microorganismos bacterianas (*E. coli* o *Erwinia chrysanthemi*) que se ha utilizado durante aproximadamente treinta años en quimioterapia contra la leucemia. Esta enzima hidroliza y agota la asparagina, un aminoácido esencial para la producción de las proteínas necesarias para la vida celular. Ahora, a diferencia de las células normales, ciertas células linfoblásticas cancerosas no tienen la capacidad de producir su asparagina por sí mismas y son dependientes de las fuentes extracelulares para la síntesis de sus proteínas. El tratamiento con asparaginasa les priva de este componente esencial y por lo tanto conduce a su muerte. Este agente antimetabólico es selectivo para células tumorales.

40 **[0007]** Sin embargo, la asparaginasa natural induce la producción de anticuerpos circulantes causando un aumento en la depuración de asparaginasa, y reacciones alérgicas, a veces muy graves (Wang B et al, *Leukemia*, 2003; 17 (8): 1583-1588). Además, la corta vida media de la enzima (24 horas) requiere inyecciones y hospitalizaciones repetidas. Estas limitaciones importantes llevaron al desarrollo de una forma pegilada, PEG-asparaginasa, que ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de primera línea de la leucemia linfoblástica aguda (LAL).

45 **[0008]** En la década de los 80, varios autores estudiaron los efectos de la asparaginasa *in vitro* en líneas celulares de cáncer de páncreas humano.

50 **[0009]** La primera evidencia de un efecto de la asparaginasa en una línea celular de cáncer pancreático humano (MIA Paca-2) se describió en 1977 por Yunis et al. (Yunis AA et al., *Int J Cancer*, 1977; 19 (1): 128-35). La asparaginasa, incubada en presencia de células MIA Paca2 tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de las células a una concentración de 0,1 UI/ml con inhibición total del crecimiento celular con muerte celular a concentraciones de 0,5 y 1 IU/ml.

55 **[0010]** Los autores también muestran que este efecto es específico para células pancreáticas ya que la asparaginasa (utilizada a una concentración de 1 UI/ml) tiene un efecto sobre otra línea pancreática cancerosa (PANC-1). Pero no se observa ningún efecto de asparaginasa en el crecimiento de las células pulmonares y melanoma humano. Los autores no determinaron el mecanismo de la sensibilidad de las células MIA Paca-2 a la asparaginasa.

60 **[0011]** Al año siguiente, los estudios de Wu et al. confirmaron estos resultados en células MIA Paca-2 y PANC-1 (Wu M. et al, *Int J Cancer*, 1978 22 (6): 728-33). Aunque el mecanismo todavía no está claro, estos autores sugirieron que la acción de la asparaginasa en células pancreáticas cancerosas se lleva a cabo a través de la inhibición de la síntesis de proteínas.

- 5 [0012] Estos resultados también se obtuvieron con otra enzima, glutaminasa asparaginasa de *Acinetobacter* (AGA), con una mejor eficacia que la asparaginasa (WU MC et al., *In Vitro*, 1982 septiembre; 18 (9): 750-4). Los autores muestran que esta enzima inhibe totalmente el crecimiento celular de las células MIA Paca-2 y PANC-1 a una concentración de 0,0025 UI/ml (sin efecto a esta concentración con asparaginasa) y que esta actividad también se lleva a cabo a través de la actividad glutaminasa de la enzima.
- 10 [0013] En 1977 Lessner et al. (Lessner HE, et al., *Digestion*, 1977, 16 (3):. 255) anunció un ensayo clínico para describir un posible papel de la L-Asp en el tratamiento del carcinoma de páncreas, sin embargo ellos ya muestran ninguna respuesta para dos de los pacientes y efectos secundarios. El interés en el uso de la asparaginasa en el tratamiento del cáncer de páncreas llegó a un abrupto fin después de la publicación de los resultados obtenidos durante el ensayo clínico de fase II destinado a probar la eficacia de la asparaginasa en el tratamiento del carcinoma de páncreas (Lessner HE, et al. *Cancer Treat Rep*, 1980; 64: 1359-1361). Se inyectó IV asparaginasa de *E. coli* a 1000 IU/kg/día en diez pacientes que sufrían cáncer de páncreas inoperable. Aparecieron rápidamente efectos secundarios graves. Por tanto, el tratamiento se interrumpió de forma anticipada. Así, el único ensayo clínico realizado concluyó que la asparaginasa no tenía ningún interés terapéutico en el caso de cáncer de páncreas.
- 15 [0014] Más recientemente, se ha observado una recuperación del interés con los estudios relativos a las formas pegiladas de asparaginasa.
- 20 [0015] En un estudio preclínico presentado en el Congreso AACR en 1999 (Denis LJ et al. *Proc Am Assoc Cancer Res.*, 1999: pág. 23), la adición de PEG-asparaginasa a 1 UI/ml hizo posible inhibir el crecimiento celular en un 61% (MIA Paca-2), 100% (PANC-1) y 51% para células BxPC-3 incubadas en presencia de 10 UI/ml de PEG-asparaginasa. La IC50 de PEG-asparaginasa para células MIA Paca-2 y PANC-1 es 0,13 y 0,25 IU/ml respectivamente. Los autores también llevaron a cabo un experimento *in vivo* implantando células MIA Paca-2 en ratones desnudos. Después del tratamiento de estos ratones mediante la inyección de PEG-asparaginasa (12,5 UI/g o 25 UI/g por día *i/p*) durante 14 días con o sin gemcitabina (80 mg/kg *i/p* en los días 1, 4, 7 y 10), los autores observan inhibición del crecimiento celular del 59% (PEG-asparaginasa sola), 63,5% (gemcitabina sola) y 85,9% (PEG-asparaginasa y gemcitabina).
- 25 [0016] Los resultados complementarios se presentaron en el Congreso AACR de 2006 (Supra P. et al. AACR noviembre de 2006). Este estudio presenta la evaluación *in vitro* e *in vivo* de PEG-asparaginasa (Oncaspar<sup>®</sup>, Enzon Pharmaceuticals) para el tratamiento de tumores sólidos (páncreas, ovario y linfoma). La citotoxicidad *in vitro* de PEG-asparaginasa (IC50) es 0,27 UI/ml (PANC-1), 0,66 UI/ml (MIA Paca-2), 0,46 UI/ml (PANC 10,05), y mayor de 20 UI/ml (CFPAC-2 y AsPC-1). La eficacia *in vivo* de la PEG-asparaginasa se determinó sobre xenoinjertos de células MIA Paca-2 ( $2,5 \times 10^6$  células) implantados en ratones. Por lo tanto, un tratamiento con PEG-asparaginasa (0,8 kUI/kg) hace que sea posible disminuir el volumen del tumor en un 14%, la gemcitabina (80 mg/kg) permite una disminución del 29% y la combinación de las dos permite una disminución del 48%. La combinación de PEG-asparaginasa (Oncaspar<sup>®</sup>) y gemcitabina (Gemzar<sup>®</sup>) tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de tumores sólidos.
- 30 [0017] Como la asparaginasa se ha utilizado durante más de 30 años, los efectos indeseables asociados con esta enzima son bien conocidos, siendo los principales ciertas alergias con síntomas clínicos, diabetes y pancreatitis, trastornos mentales y trastornos de la coagulación.
- 35 [0018] La administración de asparaginasa provoca reacciones de hipersensibilidad en el hombre. El mecanismo de aparición es complejo y en la actualidad no ha sido completamente dilucidado. La asparaginasa es un inmunógeno directo debido a su alto peso molecular (>100.000 Da) y su naturaleza proteica. Las reacciones de hipersensibilidad podrían derivar ya sea de un mecanismo dependiente de IgE (anafilaxia en el sentido clásico), o de la activación del complemento. En muchos pacientes, conduce a la formación de anticuerpos específicos. La asparaginasa provoca la aparición de IgG circulantes específicos que tienen propiedades neutralizantes que se manifiestan por un aumento en la depuración de la enzima y una reducción de su eficacia terapéutica (Müller HJ, Boos J., *Crit Rev Oncol/Hematol* 1998; (28): 97-113). Estos anticuerpos se han observado con las tres formas de asparaginasa (*E. coli*, *Erwinia* y PEG-asparaginasa), aunque la forma PEG parece ser la menos inmunogénica.
- 40 [0019] Los síntomas son más habitualmente un eritema localizado simple o incluso simplemente dolor en el sitio de inyección, hasta un edema laríngeo, broncoespasmo y/o hipotensión y, excepcionalmente, shock anafiláctico generalizado en los casos más graves (Zubrod CG, *Pediatrics*, 1970; (45): 555-9).
- 45 [0020] La incidencia de reacciones inmunoalérgicas debido a la asparaginasa no está clara: entre el 5 y el 70% de los pacientes tratados. En promedio, una cuarta parte de los niños desarrollan una reacción severa (Mathé G, Amiel JL, Clarysse A, *Recent Results Cancer Res* 1970 (33): 279-87; Woo MH et al, *Leukemia*, 1998 Octubre; 12 (10): 1527-1533; Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, *J Clin Oncol*, 2000 Abril; 18 (7): 1525-1532). Hay varios factores que pueden explicar esta variabilidad: preparaciones de asparaginasa de diferentes cepas bacterianas, uso de terapias concomitantes o vía de administración (IV o IM). La frecuencia de las reacciones aumenta con el número de inyecciones en un ciclo de tratamiento y el intervalo entre dos ciclos de tratamiento (Mathé 1970).
- 50 [0019] Los síntomas son más habitualmente un eritema localizado simple o incluso simplemente dolor en el sitio de inyección, hasta un edema laríngeo, broncoespasmo y/o hipotensión y, excepcionalmente, shock anafiláctico generalizado en los casos más graves (Zubrod CG, *Pediatrics*, 1970; (45): 555-9).
- 55 [0020] La incidencia de reacciones inmunoalérgicas debido a la asparaginasa no está clara: entre el 5 y el 70% de los pacientes tratados. En promedio, una cuarta parte de los niños desarrollan una reacción severa (Mathé G, Amiel JL, Clarysse A, *Recent Results Cancer Res* 1970 (33): 279-87; Woo MH et al, *Leukemia*, 1998 Octubre; 12 (10): 1527-1533; Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, *J Clin Oncol*, 2000 Abril; 18 (7): 1525-1532). Hay varios factores que pueden explicar esta variabilidad: preparaciones de asparaginasa de diferentes cepas bacterianas, uso de terapias concomitantes o vía de administración (IV o IM). La frecuencia de las reacciones aumenta con el número de inyecciones en un ciclo de tratamiento y el intervalo entre dos ciclos de tratamiento (Mathé 1970).
- 60 [0019] Los síntomas son más habitualmente un eritema localizado simple o incluso simplemente dolor en el sitio de inyección, hasta un edema laríngeo, broncoespasmo y/o hipotensión y, excepcionalmente, shock anafiláctico generalizado en los casos más graves (Zubrod CG, *Pediatrics*, 1970; (45): 555-9).
- 65 [0020] La incidencia de reacciones inmunoalérgicas debido a la asparaginasa no está clara: entre el 5 y el 70% de los pacientes tratados. En promedio, una cuarta parte de los niños desarrollan una reacción severa (Mathé G, Amiel JL, Clarysse A, *Recent Results Cancer Res* 1970 (33): 279-87; Woo MH et al, *Leukemia*, 1998 Octubre; 12 (10): 1527-1533; Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, *J Clin Oncol*, 2000 Abril; 18 (7): 1525-1532). Hay varios factores que pueden explicar esta variabilidad: preparaciones de asparaginasa de diferentes cepas bacterianas, uso de terapias concomitantes o vía de administración (IV o IM). La frecuencia de las reacciones aumenta con el número de inyecciones en un ciclo de tratamiento y el intervalo entre dos ciclos de tratamiento (Mathé 1970).

5 [0021] El desarrollo de anticuerpos específicos o de reacciones de hipersensibilidad es una causa común de la interrupción del tratamiento (Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, J Clin Oncol, 2000 Apr; 18 (7): 1525-1532). En pacientes que han desarrollado anticuerpos específicos, se observa una reducción en la eficacia terapéutica de asparaginasa, que se manifiesta por una disminución en la duración y/o la incidencia de remisiones y cambios en la farmacocinética de la asparaginasa. En pacientes que han mostrado una reacción de hipersensibilidad, el temor a una reacción más severa conduce a la interrupción del tratamiento como medida de precaución. Por razón de la interrupción prematura del tratamiento después de las reacciones alérgicas, el propósito terapéutico de la asparaginasa, que es lograr un agotamiento de la asparagina en plasma durante un período definido, a menudo no se consigue.

15 [0022] El páncreas es uno de los órganos diana para la toxicidad de asparaginasa, probablemente a causa de un alto nivel de síntesis de proteínas. Esta toxicidad puede adoptar la forma de pancreatitis aguda (más habitualmente) o diabetes.

[0023] El mecanismo de la pancreatitis aguda, cuyos síntomas clínicos van desde benignos, enfermedad que se resuelve espontáneamente, a complicaciones (hemorragias, pseudo-quiste), a la enfermedad fulminante mortal, es poco conocido.

20 [0024] La pancreatitis tóxica inducida por quimioterapias utilizadas en oncología no es infrecuente. Eso debido a la asparaginasa está bien documentado y se han descrito muchos casos en la literatura. La incidencia global debido a la asparaginasa en términos de pancreatitis, para todas las formas combinadas, incluyendo las formas de PEG, varía del 2 al 16% dependiendo del estudio (Knoderer HM et al., *Pediatr Blood Cancer*, 25 de agosto de 2006; Müller 1998, 2: 97-113; Alvarez OA et al., *Med Pediatr Oncol* 2000, 34 (3): 200-5). Esta pancreatitis puede complicarse por hemorragias y pseudo-quistes, pero las muertes siguen siendo raras. El inicio de la pancreatitis requiere la interrupción de la asparaginasa y la iniciación del tratamiento de la pancreatitis. A la luz de los estudios generales, la administración de dosis repetidas y relativamente altas de asparaginasa (3.000 UI a 60.000 UI/m<sup>2</sup>/dosis) es un factor predisponente.

30 [0025] La otra complicación pancreática posible del tratamiento con asparaginasa es la aparición de la diabetes en 1 a 14% de los casos, dependiendo del estudio. El mecanismo parece ser la disminución en la producción de insulina por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans. La hiperglucemia y glucosuria sin cetosis son los síntomas más comunes. Este efecto es reversible y desaparece en la interrupción del tratamiento. La hiperglucemia puede aumentarse mediante la administración concomitante con prednisona, pero el riesgo de su aparición es menor.

35 [0026] Por lo tanto, en el caso del tratamiento del cáncer de páncreas el uso de asparaginasa en pacientes cuyo páncreas está dañado podría ser peligroso y estos efectos no deseados deben ser tomados en consideración.

40 [0027] El ensayo clínico en el hombre con la forma natural de asparaginasa descrito anteriormente (Lessner et al., 1980) demostró que estos temores están perfectamente justificados. Por otro lado, las formas pegiladas aún no han demostrado que sean adecuadas para su uso clínico en humanos para el tratamiento del cáncer de páncreas. Los resultados obtenidos hasta la actualidad se limitan a resultados *in vitro* e *in vivo* en modelos de xenoinjerto de tumor de páncreas de ratón. Ahora, la idoneidad de las formas pegiladas para el uso clínico está lejos de establecerse en vista del hecho de que la molécula es, por una parte todavía alergénica (Müller et al., 1998) y por otro lado tóxica para el páncreas (Knoderer 2006; Müller 1998; Álvarez 2000). Además, el ensayo clínico realizado por Enzon Pharmaceuticals, descrito anteriormente, en relación con el uso de Oncaspar<sup>®</sup> para el tratamiento de tumores sólidos ha sido suspendido desde que se alcanzó la toxicidad antes de la eficacia (Cowen and Company, "Quick Take: Solide Q4 Results, But Oncaspar Solid Tumor Trial Hits a Snag", Speciality Pharmaceuticals, 14 de febrero de 2008).

50 [0028] La encapsulación de asparaginasa en eritrocitos con el fin de mejorar su índice terapéutico ha sido objeto de estudios de desarrollo. Se llevó a cabo un estudio de tolerancia en asparaginasa encapsulada en glóbulos rojos por Kravtsoff et al. (*Eur J Clin C. Pharmacol*, 1996; 51 (3-4): 221-5). A trece pacientes que en su mayoría sufrían de linfomas no Hodgkin se les administró una inyección de asparaginasa encapsulada en glóbulos rojos (30 a 200 UI/kg). El estudio demuestra una ausencia de reacción alérgica en comparación con la inyección directa de asparaginasa (27%). Además, la inyección de asparaginasa encapsulada en eritrocitos permite un agotamiento de asparagina durante 50 días consecutivos.

60 [0029] Por otro lado, diferentes estudios (WO-A-2006/016247; Millan CG et al., *Journal of Controlled Release*, 2004, 95 (1): 27-49; Kravtsoff R et al., *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1990, 42 (7): 473-476) describen la encapsulación de asparaginasa en glóbulos rojos y la mejora de las propiedades farmacocinéticas de la enzima encapsulada en el contexto de una aplicación para el linfoma y la leucemia linfoblástica aguda.

65 [0030] Aunque la forma encapsulada de asparaginasa muestra la ausencia de reacción alérgica, su administración encapsulada en glóbulos rojos deja una cierta duda en cuanto a las consecuencias a nivel de páncreas, en particular en pacientes con un estado general malo o que tienen cáncer de páncreas avanzado, en el sentido de que los

glóbulos rojos terminan siendo destruidos y liberan su contenido en el compartimiento vascular. Del mismo modo, su eficacia clínica no se ha demostrado.

5 [0031] Los inventores han demostrado por primera vez la eficacia de asparaginasa encapsulada en glóbulos rojos en el modelo de xenoinjerto de tumor pancreático de ratón. Al mismo tiempo, se han obtenido resultados que demuestran la ausencia de asparaginasa residual libre en el compartimiento vascular. También han demostrado que la mejora en la farmacocinética unida con el uso de los glóbulos rojos posibilita el uso de cantidades mucho más reducidas de la enzima en comparación con lo que sería necesario utilizar en forma libre o en forma PEG, reduciendo aún más los riesgos de toxicidad pancreática. Los resultados obtenidos por los inventores abren el camino para el uso de asparaginasa encapsulada en el tratamiento del cáncer de páncreas, incluyendo los pacientes que tienen una forma avanzada de este tipo de cáncer o pacientes sensibles.

15 [0032] Un primer objeto de la invención es por lo tanto una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan la asparaginasa como medicamento para tratar el cáncer de páncreas.

[0033] Un segundo objeto de la invención es una composición terapéutica o un medicamento destinado al tratamiento del cáncer de páncreas, que comprende una cantidad eficaz de una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan la asparaginasa.

20 [0034] Normalmente, los glóbulos rojos se encuentran en suspensión en una solución salina farmacéuticamente aceptable. Ésta puede ser un medio estándar para glóbulos rojos, en particular, una solución de NaCl (preferiblemente 0,9%) posiblemente con ingredientes añadidos, tales como glucosa, dextrosa, adenina y/o manitol. Los medios estándar que se pueden utilizar son SAG manitol y ADsol que son soluciones basadas en adenina, glucosa, manitol y cloruro de sodio. La solución puede contener además un conservante, tal como L-carnitina. La solución también puede contener uno o más de otro u otros principios activos, en particular, un agente o agentes quimioterapéuticos destinados para el tratamiento del cáncer de páncreas, tal como se describe a continuación, o un principio o principios activos destinados para el tratamiento de los síntomas o trastornos que pueden acompañar el cáncer de páncreas.

30 [0035] La suspensión puede estar lista para su uso y tener un hematocrito adecuado para la administración por inyección o por perfusión sin dilución.

[0036] también puede ser envasarse de manera que tiene que diluirse antes de la administración por inyección o por perfusión.

35 [0037] Según la invención, el hematocrito de la suspensión lista para su uso se encuentra ventajosamente entre aproximadamente el 40 y aproximadamente el 70%, preferiblemente entre aproximadamente el 45 y aproximadamente el 55%, y mejor aproximadamente el 50%.

40 [0038] En la forma para dilución, el hematocrito puede ser mayor, en particular encontrándose entre aproximadamente el 60 y aproximadamente el 90%.

[0039] La solución se envasa preferiblemente en un volumen de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 ml. El envase es preferiblemente en una bolsa de sangre del tipo adecuado para una transfusión de sangre. La totalidad de la cantidad de asparaginasa encapsulada correspondiente a la receta médica está contenida preferiblemente en la bolsa de sangre.

50 [0040] La cantidad de asparaginasa encapsulada puede encontrarse, en particular, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 300 UI por ml de suspensión de glóbulos rojos. Se encuentra preferiblemente entre aproximadamente 70 y aproximadamente 150 UI por ml.

[0041] Un objeto adicional de la invención es el uso de glóbulos rojos que encapsulan asparaginasa o una suspensión de dichos glóbulos rojos para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un cáncer de páncreas. Este uso tiene en cuenta las características presentadas para la suspensión y la composición terapéutica o medicamento.

[0042] La invención se refiere al tratamiento de pacientes en cualquier etapa de desarrollo del cáncer de páncreas, la forma histológica tomado por el cáncer y la probabilidad de pancreatitis de mayor o menor gravedad.

60 [0043] La invención se refiere en particular a:

- el tratamiento de un paciente que tiene un tumor primario del páncreas;
- el tratamiento de un paciente con adenopatía local, con o sin ganglios linfáticos locales afectados;
- el tratamiento de un paciente que tiene un cáncer de páncreas con metástasis distante;
- el tratamiento de un paciente que tiene cáncer de la cabeza del páncreas;
- 65 - el tratamiento de un paciente que tiene un cáncer de páncreas con adenocarcinoma ductal;
- el tratamiento de un paciente que tiene un cáncer de páncreas con cistoadenocarcinoma mucinoso;

- el tratamiento de un paciente que tiene un cáncer de páncreas con carcinoma intraductal mucinoso;
- el tratamiento de un paciente que tiene un carcinoma de páncreas con adenocarcinoma acinar;
- el tratamiento de un paciente que tiene un cáncer de páncreas con tumores quísticos, y posiblemente adenocarcinoma quístico;
- 5 - el tratamiento de un paciente que tiene un cáncer de páncreas con tumor de los canales excretores del páncreas;
- el tratamiento de un paciente que tiene un cáncer del páncreas endocrino;
- el tratamiento de un paciente después de la resección parcial o total del páncreas.

[0044] En una realización adicional, la invención se refiere al aumento de la supervivencia del paciente.

[0045] La administración se realiza por inyección intravenosa o intraarterial y preferiblemente por perfusión desde una bolsa de sangre o similar. La administración se realiza habitualmente por vía intravenosa en el brazo o a través de un catéter central.

[0046] En particular, se administra desde aproximadamente 10 a aproximadamente 250 ml de suspensión (una dosis), composición terapéutica o medicamento según la invención. Por encima de 20 ml, se prefiere el uso de la perfusión.

[0047] La cantidad de asparaginasa encapsulada puede encontrarse, en particular, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 300 UI por ml de suspensión de glóbulos rojos. Se encuentra preferiblemente entre aproximadamente 70 y aproximadamente 150 UI por ml.

[0048] Un tratamiento comprende la administración de una dosis o de varias dosis según el protocolo decidido. Esto puede proporcionar varias administraciones al mes, intervalos quincenales o semanales, durante la duración recomendada del tratamiento.

[0049] Este tratamiento puede consistir en la administración del equivalente de 20 a 500 UI de asparaginasa por kg de peso corporal cada vez (cada dosis). Preferiblemente, se administran de 50 a 150 UI por kg por dosis.

[0050] La presente invención también proporciona combinaciones de glóbulos rojos que encapsulan asparaginasa con productos quimioterapéuticos estándar para el tratamiento del cáncer de páncreas. De este modo, la combinación puede realizarse con gemcitabina, cisplatino, oxaliplatino, o 5-fluorouracilo en combinación con un derivado de platino, por ejemplo cisplatino u oxaliplatino. En un primer modo, la combinación se realiza dentro de la suspensión, composición terapéutica o medicamento según la invención. Según un segundo modo, la combinación es una combinación mediante administración separada, simultánea o escalonada para el mismo paciente.

[0051] La asparaginasa en sí se designa por el número CAS: 9015-68-3. Su nombre común es asparaginasa; otros nombres comunes para ella son: colaspasa, L-asparaginasa y L-asparagina aminohidrolasa.

[0052] El término asparaginasa en el sentido de la presente invención cubre asparaginasa de cualquier origen, que puede ser, en particular, de origen natural o recombinante, y cualquier derivado que incorpore asparaginasa, tal como por ejemplo una forma PEG, o un fragmento que conserva la actividad de la L-asparaginasa. También cubre asparaginasa cualquiera que sea su origen bacteriano. Por lo tanto, la asparaginasa puede ser del tipo de *E. coli*, en particular *E. coli* HAP-A-1-3, del tipo *Erwinia chrysanthemi* o del tipo el *Wolinella succinogenes*. "Tipo" se entiende que significa que puede obtenerse a partir de un cultivo de la bacteria en cuestión, o que puede ser recombinante, en otras palabras, una forma de asparaginasa de esa bacteria obtenida por ingeniería genética. En un modo de realización preferido, es del tipo *E. coli* HAP-A-1-3.

[0053] El término asparaginasa también cubre sustancias del tipo asparaginasa que en el sentido de la invención son enzimas bacterianas que tienen una actividad de L-asparagina aminohidrolasa. A modo de ejemplo, puede citarse la glutaminasa asparaginasa de *Acinetobacter* (AGA).

[0054] Las técnicas que permiten la encapsulación de principios activos en los glóbulos rojos son conocidas y la técnica básica por lisis-resellado, que se prefiere aquí, se describe en las patentes EP-A-101 341 y EP-A-679 101, a las que la persona experta en la técnica será capaz de hacer referencia. Según esta técnica, el compartimento principal de una unidad de diálisis (por ejemplo una bolsa de diálisis o cartucho de diálisis) se alimenta continuamente con una suspensión de glóbulos rojos, mientras que el compartimento secundario contiene una solución acuosa hipotónica con respecto a la suspensión de glóbulos rojos con el fin de lisar los glóbulos rojos; a continuación, en una unidad de resellado, se induce el resellado de los glóbulos rojos en presencia de asparaginasa mediante el aumento de la presión osmótica y/u oncótica, y a continuación, se recoge una suspensión de glóbulos rojos que contienen asparaginasa.

[0055] Entre las variaciones descritas hasta el presente, se prefiere el método descrito en el documento WO-A-2006/016247, que hace que sea posible encapsular asparaginasa de una manera eficaz, reproducible, fiable y estable. Este método comprende las siguientes etapas:

- 1 - suspensión de un residuo de glóbulos en una solución isotónica a un nivel de hematocrito superior o igual al 65%,

refrigeración entre +1 y +8°C,

2 - medición de la fragilidad osmótica utilizando una muestra de glóbulos rojos de este mismo residuo de glóbulos, siendo posible llevar a cabo las etapas 1 y 2 en cualquier orden (incluyendo en paralelo),

3 - procedimiento de lisis e interiorización de la asparaginasa, dentro de un mismo recipiente, a una temperatura mantenida de forma constante entre +1 y +8°C, que comprende el paso de la suspensión de glóbulos rojos a un nivel de hematocrito superior o igual a 65% y de una solución de lisis hipotónica refrigerada a entre +1 y +8°C en un cartucho de diálisis, ajustando los parámetros de lisis en base a la fragilidad osmótica medida anteriormente; y

4 - procedimiento de resellado llevado a cabo en un segundo recipiente en el interior del cual la temperatura se encuentra entre +30 y +40°C, y en presencia de una solución hipertónica.

[0056] "Internalización" se entiende que significa la penetración de la asparaginasa en el interior de los glóbulos rojos.

[0057] En particular, para la diálisis, el residuo de glóbulos se suspende en una solución isotónica a un alto nivel de hematocrito, mayor que o igual a 65%, y preferiblemente mayor que o igual a 70%, y esta suspensión se refrigera a entre +1 y +8°C, preferiblemente entre +2 y +6°C, habitualmente alrededor de +4°C. Según un modo particular, el nivel de hematocrito se encuentra entre 65 y 80%, preferiblemente entre 70 y 80%.

[0058] La fragilidad osmótica se mide ventajosamente en los glóbulos rojos justo antes de la etapa de lisis, en presencia o ausencia de asparaginasa en la suspensión. Los glóbulos rojos o la suspensión que los contiene están ventajosamente a una temperatura próxima o idéntica a la temperatura seleccionada para la lisis. Según otra característica ventajosa de la invención, la medición de la fragilidad osmótica llevada a cabo se utiliza rápidamente, en otras palabras, el procedimiento de lisis se lleva a cabo poco después de tomar la muestra. Preferiblemente, este transcurso de tiempo entre el muestreo y el comienzo de la lisis es inferior o igual a 30 minutos, todavía mejor inferior o igual a 25 e incluso a 20 minutos.

[0059] Para más detalles sobre la forma de operar el procedimiento de lisis-resellado, con medición y disponibilidad para la fragilidad osmótica, la persona experta en la técnica será capaz de hacer referencia al documento WO-A-2006/016247.

[0060] La presente invención se describirá ahora en más detalle mediante los modos de implementación tomados como ejemplos no limitativos.

Las figuras 1 y 2 son gráficos que ilustran los métodos de cálculo de la vida media de la asparaginasa o asparaginasa encapsulada.

La figura 3 es un gráfico que ilustra la inhibición del crecimiento tumoral en función del tiempo en ratones tratados de acuerdo con varios protocolos.

La figura 4 ilustra el volumen tumoral relativo frente al tiempo para cada grupo de ratones en un modelo de xenoinjerto.

La figura 5 es una representación gráfica de la supervivencia del ratón para cada grupo de tratamiento de ratones en un modelo de xenoinjerto.

#### Ejemplo 1: Método para la encapsulación de L-asparaginasa en glóbulos rojos murinos

[0061] La L-asparaginasa (Kidrolase®, OPI-EUSA Limonest France) se encapsula en glóbulos rojos murinos (ratones OF1) mediante el método de diálisis hipotónica en una bolsa de diálisis. La sangre se centrifuga previamente para eliminar el plasma y, a continuación, se lava tres veces con NaCl al 0,9%. El hematocrito se ajusta a 70% en presencia de la asparaginasa, se añade a una concentración final de 400 UI/ml de glóbulos rojos o corpúsculos rojos (RBC) antes de comenzar la diálisis. La diálisis dura 50 minutos a 4°C frente a un tampón de lisis de baja osmolaridad. Los glóbulos rojos murinos se resellan a continuación mediante la adición de una solución de alta osmolaridad y la incubación de 30 minutos a 37°C. Después de dos lavados con NaCl al 0,9% y un lavado con Sagmanitol complementado con albúmina de suero bovino BSA (6%), los glóbulos rojos se ajustan hasta el hematocrito 50%. Los glóbulos rojos que encapsulan la L-asparaginasa se denominan L-Aspa RBC. La encapsulación genera L-Aspa RBC a una concentración de 40 UI de asparaginasa/ml de RC en 50% de hematocrito.

[0062] Durante el procedimiento de encapsulación, se analizan la sangre completa, los RBC lavados, los RBC mezclados con la L-asparaginasa (antes de la diálisis) y los RBC cargados con L-asparaginasa (después de la diálisis) para:

- hematocrito (Ht)
- volumen corpuscular promedio (ACV)
- concentración de hemoglobina corpuscular promedio (ACHC)
- concentración de hemoglobina total y
- recuento de células.

[0063] Se extraen alícuotas de las suspensiones celulares antes y después de la diálisis hipotónica para la medición de la actividad de la enzima L-asparaginasa. La estimación de la L-asparaginasa se realizó de acuerdo con el

protocolo publicado en: Orsonneau et al, "Dosage automatique en cinétique de l'activité L-asparaginase plasmatique en suivi thérapeutique des leucémies aigües lymphoblastiques", Ann Biol Clin, 62: 568 -572.

Ejemplo 2: Determinación de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de L-Aspa RBC en el ratón

5 **[0064]** Se inyectaron L-Aspa RBC murinos en ratones OF1 a fin de determinar la vida media de L-Aspa RBC en circulación en el ratón y para demostrar el agotamiento de L-asparagina en plasma de ratón. Se inyectó una sola dosis de 200 UI/kg en cada ratón por vía intravenosa.

10 **[0065]** La vida media de los L-Aspa RBC es  $12,39 \pm 0,74$  días (cálculo basado en la actividad de la enzima). Cuando la vida media de los L-Aspa RBC murinos se calcula a través de marcaje celular (CFSE-L-Aspa RBC), el valor es  $16,52 \pm 3,13$  días, y  $15,83 \pm 3,31$  días para RBC simplemente marcados con CFDA-SE (CFSE RBC).

15 **[0066]** El agotamiento de L-asparagina en plasma es total ( $<2 \mu\text{M}$ ), y se obtiene 15 minutos después de la inyección de L-Aspa RBC y persiste durante al menos 20 días.

Tabla 1: Datos farmacocinéticos obtenidos para L-Aspa RBC y para RBC murinos marcados con CFDA-SE (CFSE RBC)

	RBC		L-asparaginasa	
	supervivencia a las 24 horas (%)	vida media (días)	supervivencia a las 24 horas (%)	vida media (días)
L-Aspa RBC	-	-	$57,9 \pm 2,5$	$12,39 \pm 0,74$
CFSE-L-Aspa RBC	$80,7 \pm 0,7$	$16,52 \pm 3,13$	$76,7 \pm 1,4$	$12,20 \pm 1,38$
CFSE RBC	$92,7 \pm 2,6$	$15,83 \pm 3,31$	-	-

20 **[0067]** La vida media se calculó de la siguiente manera:  
El punto de intercepción obtenido a partir de la ecuación trazada se divide por dos. A continuación, el valor correspondiente de la abscisa se calcula gracias a la representación.  
Un ejemplo del cálculo se muestra en la figura 1, en la que el punto de intercepción calculado es 2,8461.

25 La mitad del punto de intercepción: 1,42  
Cálculo del valor correspondiente de la abscisa:  $1,42 = (-0,1145 * X) + 2,8$

$$X = (1,42 - 2,8) / -0,1145 = -1,38 / -0,1145 = 12 \text{ días}$$

30 **[0068]** Se pueden calcular más tiempos medios reales con un segundo método en el que la escala de ordenadas es una escala logarítmica y la escala de las abscisas es una escala lineal tal como se muestra en la figura 2.

**[0069]** El tiempo medio se calcula de la siguiente manera:

35  $\text{Ln}(2)/\text{coeficiente de representación de la curva.}$

**[0070]** En el ejemplo de la figura 2 (que es el mismo ejemplo que en la figura 1) el tiempo medio es:

$$\text{Ln}(2)/0,083 = 8,3 \text{ días}$$

40 Tabla 2: Medición de la actividad de L-asparaginasa residual en función del tiempo para L-Aspa RBC y L-asparaginasa libre

	Tiempo						actividad de L-asparaginasa residual (%)
	15 min	24 h	3 d	9 d	14 d	20 d	
L-Aspa RBC	100	57,1	46,9	39,8	24,9	10,6	
L-Aspa libre	100	33	0	0	0	0	

45 **[0071]** Además, la estimación de la L-asparaginasa circulante en plasma muestra que más allá de 24 horas después de la inyección de L-Aspa RBC en ratones, los valores obtenidos están en el límite de detección del ensayo (entre 1 y 3 UI/litro).

50 Ejemplo 3: Inhibición del crecimiento de los tumores pancreáticos humanos en respuesta a una inyección de L-Aspa RBC en el ratón

[0072] El propósito de este experimento es inyectar L-Aspa RBC en ratones portadores de tumores pancreáticos humanos y observar la inhibición del crecimiento tumoral. Se seleccionó una línea celular sensible a L-asparaginasa *in vitro*, y deficiente en L-asparagina sintasa: Mia PaCa-2.

5 [0073] Para el estudio de la inhibición del crecimiento tumoral después de la inyección de L-Aspa RBC, se estableció un protocolo *in vivo* con 4 grupos de 12 ratones. En el protocolo se incluye un tratamiento de referencia para el cáncer de páncreas, gemcitabina.

10 Preparación de sustancias de prueba y controles

[0074] Sustancia de prueba 1: L-asparaginasa cargada en glóbulos rojos murinos (denominados L-Aspa RBC). El procedimiento para la preparación de L-Aspa RBC se describe anteriormente (véase el ejemplo 1).

15 Sustancia de prueba 2: Gemcitabina

Sustancia de control 2: PBS (tampón de absorción de gemcitabina)

Cultivo de células Mia PaCa-2

20 [0075] Se sometieron células tumorales pancreáticas humanas (Mia PaCa-2) en fase de crecimiento exponencial (origen ATCC: American Type Culture Collection) a digestión triptica, a continuación se contaron y se lavaron antes de finalmente se resuspenderse en un medio DMEM libre de suero con el fin de inyectarse por vía subcutánea en 48 ratones desnudos atímicos/desnudos.

25 Animales

[0076] Los 48 ratones desnudos atímicos/desnudos (balb/c desnudos) con edades entre 5-6 semanas y entre 18 y 22 g de peso, se suministraron por Harlan (Francia). Los animales se mantuvieron durante 7 días en una unidad SPF especializada (libre de patógenos específicos) antes del tratamiento.

30 [0077] Los 48 ratones se dividieron al azar en 4 grupos de 12 ratones.

[0078] Cuando el volumen del tumor alcanzó los 200 mm<sup>3</sup>, los ratones se sometieron a inyecciones de:  
- inyección única de L-Aspa RBC (200 UI/kg) por vía intravenosa en un volumen que no supera 10 ml/kg  
- cuatro inyecciones de gemcitabina (60 mg/kg) por vía intravenosa.

35 Planificación de tratamientos

[0079] La planificación se organizó de la siguiente manera:

40 Grupo 1: los ratones recibieron PBS

Grupo 2: los ratones recibieron 4 inyecciones de gemcitabina (60 mg/kg), 2 inyecciones por semana durante 2 semanas

Grupo 3: los ratones recibieron una inyección única de L-Aspa RBC y 4 inyecciones de gemcitabina (60 mg/kg), 2 inyecciones por semana durante 2 semanas

45 Grupo 4: los ratones recibieron una inyección única de L-Aspa RBC.

[0080] La inyección de los diferentes productos se efectuó en ciego.

50 [0081] La medición de los tumores se efectuó regularmente (cada 3 a 4 días) durante 57 días.

Resultados

55 [0082] La figura 3 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en los diferentes grupos en función del tiempo.

60 [0083] Los dos grupos de control (1 y 2) muestran un crecimiento regular del tumor de 0 a 1058 ± 939 mm<sup>3</sup> y 1353 ± 1016 mm<sup>3</sup>, respectivamente. El grupo 2 (gemcitabina) no muestra un efecto del medicamento sobre el crecimiento de los tumores pancreáticos en el ratón (inyección en un volumen de tumor de 196 ± 57 mm<sup>3</sup> y, en 57 días, 1353 ± 1016 mm<sup>3</sup>). En cambio, las inyecciones de L-Aspa RBC en combinación con gemcitabina retardan considerablemente el crecimiento del tumor: este tratamiento se inyectó cuando los tumores eran de 190 ± 43 mm<sup>3</sup> y después de 57 días el volumen del tumor es 494 ± 719 mm<sup>3</sup> en comparación con 1353 ± 1016 mm<sup>3</sup> para los ratones en el grupo 2 tratados sólo con gemcitabina. Por último, los L-Aspa RBC (grupo 4) son todavía más eficaces para la inhibición del crecimiento tumoral que en combinación con gemcitabina ya que después de la inyección a un volumen tumoral de 193 ± 46 mm<sup>3</sup> éste alcanza solamente 285 ± 225 mm<sup>3</sup> después de 57 días.

65

**[0084]** Los glóbulos rojos murinos que encapsulan L-asparaginasa (L-Aspa RBC) eran el tratamiento más eficaz para retardar el crecimiento de los tumores pancreáticos humanos implantados en el ratón. Sorprendentemente, los RBC L-Aspa solos son más eficaces para la inhibición del crecimiento tumoral que en combinación con gemcitabina.

5 Ejemplo 4: Estudio anti-tumoral in vivo de L-asparaginasa encapsulada en glóbulos rojos en ratones portadores de tumor de páncreas PANC-1

**[0085]** El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos antitumorales de la L-asparaginasa encapsulada en glóbulos rojos (L-aspa RBC) administrados en un modelo de xenoinjerto de tumor pancreático humano (PANC-1).

10 **[0086]** La PANC-1 es una línea celular pancreática humana, sensible in vitro a L-asparaginasa. En este estudio, 4 grupos de 15 ratones recibieron L-asparaginasa encapsulada en glóbulos rojos, gemcitabina (tratamiento de referencia en el cáncer de páncreas), una combinación de ambos agentes o un elemento de control. Un último grupo de 10 ratones no recibió ningún tratamiento y se utilizó como grupo de control.

15 Preparación de los elementos de prueba y control

**[0087]** Elemento de prueba 1: L-asparaginasa encapsulada en glóbulos rojos murinos (L-aspa RBC). Se llevó a cabo el procedimiento de producción de L-aspa RBC tal como se describe en el ejemplo 1. Elemento de prueba 2: gemcitabina (Gemzar<sup>®</sup>, Eli Lilly and Company)  
Elemento de control: PBS (solución salina)

Cultivo de la línea celular Panc-1

25 **[0088]** Se subclonó un cultivo en crecimiento logarítmico de células tumorales pancreáticas humanas, PANC-1, (obtenido de ECCAC, Reino Unido), y se seleccionó el clon no.6sC basándose en su capacidad de crecimiento y la sensibilidad a la asparaginasa.

30 **[0089]** El clon no. 6sC se tripsinizó, se contó, se lavó y se resuspendió en medio DMEM libre de suero para la inyección subcutánea a 100 ratones atímicos nu/nu.

Animales

35 **[0090]** Se suministraron cien ratones desnudos atímicos de 5 semanas de edad, con un peso de 20 g +/- 3 g por Harlan France. Los animales se sometieron a un período de aclimatación de 12 días y se mantuvieron en condiciones SPF (libre de patógenos específicos) y condiciones de temperatura, humedad, fotoperíodo e intercambio de aire controladas continuamente.

40 **[0091]** Cuatro días después de la implantación de células, se midieron y clasificaron los volúmenes tumorales según el tamaño y se calculó la mediana. Treinta y cinco ratones con un volumen de tumor por encima de la mediana y 35 ratones con un volumen de tumor por debajo de la mediana se incluyeron en el estudio (70 ratones en total).

45 **[0092]** Estos animales fueron asignados al azar en 4 grupos de 15 ratones y 1 grupo de 10 ratones siguiendo una tabla de aleatorización preestablecida. Los ratones recibieron:

- una sola inyección i.v. de L-aspa RBC (200 UI/kg). El volumen de administración no fue superior a 8 ml/kg o un décimo del volumen de sangre del animal.
- 4 inyecciones i.v. de gemcitabina (80 mg/kg)
- 4 inyecciones i.v. de PBS

50 Protocolo de tratamiento

**[0093]**

Grupo 1: los ratones recibieron 4 inyecciones de PBS cada 3 días

Grupo 2: los ratones recibieron 4 inyecciones de gemcitabina cada 3 días

55 Grupo 3: los ratones recibieron una sola inyección de L-aspa RBC y 4 inyecciones de gemcitabina cada 3 días

Grupo 4: los ratones recibieron una sola inyección de L-aspa RBC

Grupo 5: sin tratamiento

60 **[0094]** Las mediciones de los tumores se registraron 3 veces a la semana (los lunes, miércoles y viernes) durante 43 días.

Resultados

65 **[0095]** La figura 4 ilustra el volumen tumoral relativo frente al tiempo para cada grupo. El volumen tumoral relativo se calcula dividiendo el volumen del tumor en un día determinado por el volumen del tumor antes del tratamiento para evitar el sesgo debido a la diferencia estadística en el volumen del tumor entre grupos en el día de la inyección.

5 **[0096]** La figura 4 muestra que el volumen tumoral relativo en los grupos de gemcitabina y L-aspa RBC combinados con gemcitabina aumentó más lentamente que en el grupo de PBS ( $51,8 \pm 17,1$ ;  $46,3 \pm 29,7$  y  $75,1 \pm 31,0$  en el día 43, respectivamente). Cabe destacar que el tratamiento de combinación tiende a ser más eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral que la gemcitabina sola.

10 **[0097]** Esta representación pone de manifiesto la eficacia de una inyección única de L-aspa RBC ya que se encontró que el volumen tumoral relativo aumentaba más lentamente que en el grupo de control ( $49,3 \pm 32,2$  frente a  $75,1 \pm 31,0$  en el día 43).

15 **[0098]** La figura 5 es una representación gráfica de la supervivencia del ratón para cada grupo de tratamiento. El tratamiento con L-aspa RBC o gemcitabina solos no fue mejor que PBS ya que los gráficos se solapan casi por completo (sólo el 20% de los ratones permanecieron en el grupo de gemcitabina, 33% para el grupo de ratón de L-aspa RBC y 13% de los ratones permanecieron en el grupo de PBS en el día 43). Las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, la supervivencia del ratón mejoró en gran medida mediante la combinación de gemcitabina con L-aspa RBC (60% de los ratones todavía estaban vivos en el día 43) y se encontró que la diferencia era significativa ( $p < 0,01$ ). Además, la gemcitabina en combinación con L-aspa RBC en comparación con la gemcitabina sola produjo una mejora estadísticamente significativa en la supervivencia del ratón ( $p < 0,05$ ).

20 **[0099]** Estos resultados indican que una sola inyección i.v. de L-aspa RBC inhibió el crecimiento del tumor en ratones portadores de línea celular pancreática humana, y que el tratamiento con gemcitabina se ve reforzado por la presencia de L-aspa RBC. Esta afirmación es apoyada por la mejor inhibición del crecimiento tumoral observado en comparación con los otros grupos y las proporciones de los animales supervivientes al final del estudio.

25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Suspensión de glóbulos rojos que encapsulan asparaginasa como medicamento para utilizar en el tratamiento del cáncer pancreático.
2. Composición terapéutica o medicamento que comprende una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan asparaginasa, para utilizar en el tratamiento del cáncer pancreático.
- 10 3. Suspensión, composición o medicamento para utilizar, según la reivindicación 1 ó 2, para el incremento de la supervivencia del paciente.
4. Suspensión, composición o medicamento para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está en una forma lista para usar o para diluir antes de usar.
- 15 5. Suspensión, composición o medicamento para utilizar, según la reivindicación 4, en los que para una forma destinada a la dilución antes de usar, el hematocrito antes de la dilución se encuentra entre el 60 y el 90%.
- 20 6. Suspensión, composición o medicamento para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en los que el hematocrito de la suspensión lista para usar se encuentra entre aproximadamente el 40 y aproximadamente el 70%, preferiblemente entre aproximadamente el 45 y aproximadamente el 55%, y mejor aproximadamente el 50%.
7. Suspensión, composición o medicamento para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene ente 30 y 300 UI de asparaginasa por ml, preferiblemente entre 70 y 150 UI por ml.
- 25 8. Suspensión, composición o medicamento para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene además un agente quimioterapéutico.
- 30 9. Suspensión, composición o medicamento para utilizar, según la reivindicación 8, que contiene gemcitabina, cisplatino, oxaliplatino o 5-fluorouracilo en combinación con un derivado de platino, por ejemplo, cisplatino u oxaliplatino, como agente quimioterapéutico.
10. Utilización de glóbulos rojos que encapsulan asparaginasa para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer pancreático.
- 35 11. Utilización, según la reivindicación 10, para el incremento de la supervivencia del paciente.
12. Utilización, según la reivindicación 10 u 11, para la preparación de un medicamento que contiene entre 30 y 300 UI de asparaginasa por ml, preferiblemente entre 70 y 150 UI por ml.
- 40 13. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, para la preparación de un medicamento en forma de una suspensión de 10 a 250 ml.
- 45 14. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, para la preparación de un medicamento destinado a liberar de 20 a 500 UI, preferiblemente de 50 a 500 UI, de asparaginasa por kg de peso corporal y por dosis.
15. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en la que se utiliza una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan asparaginasa y un agente quimioterapéutico para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer pancreático.
- 50 16. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en la que el medicamento se destina a la administración a un paciente al que también se le administra un agente quimioterapéutico.

Figura 1: Primer método de cálculo de la vida media

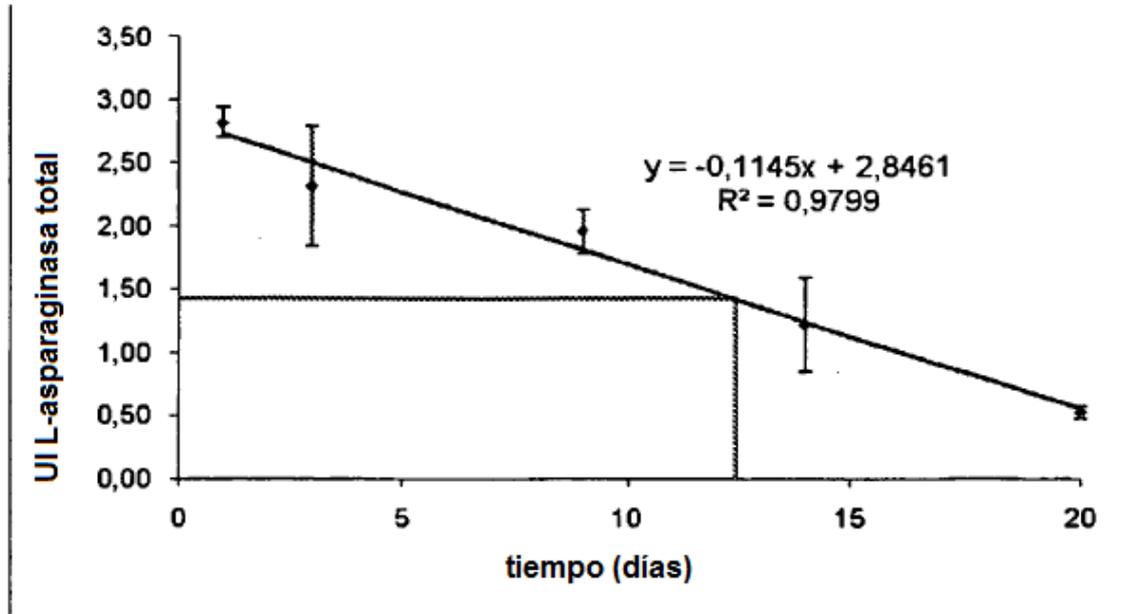
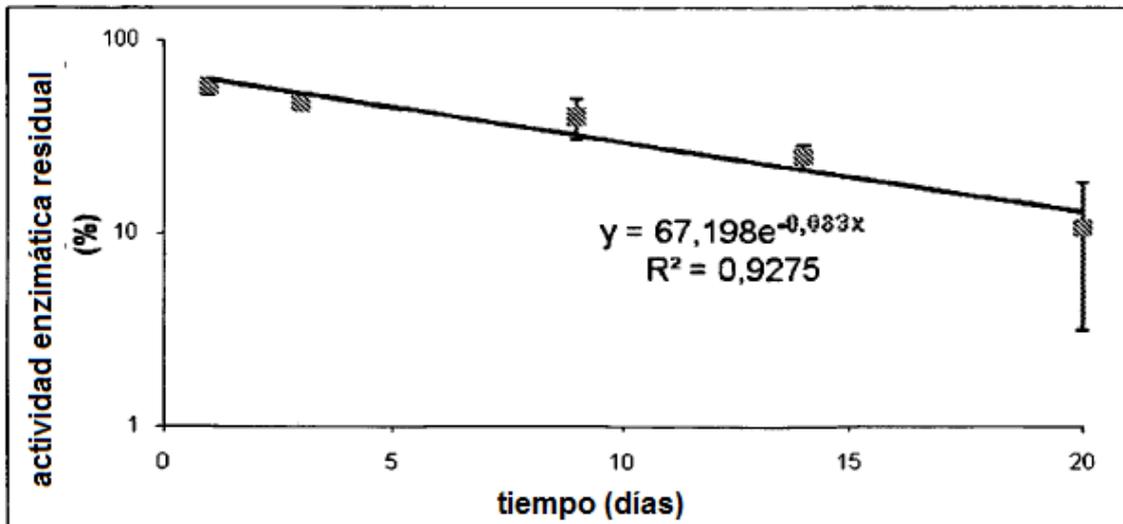
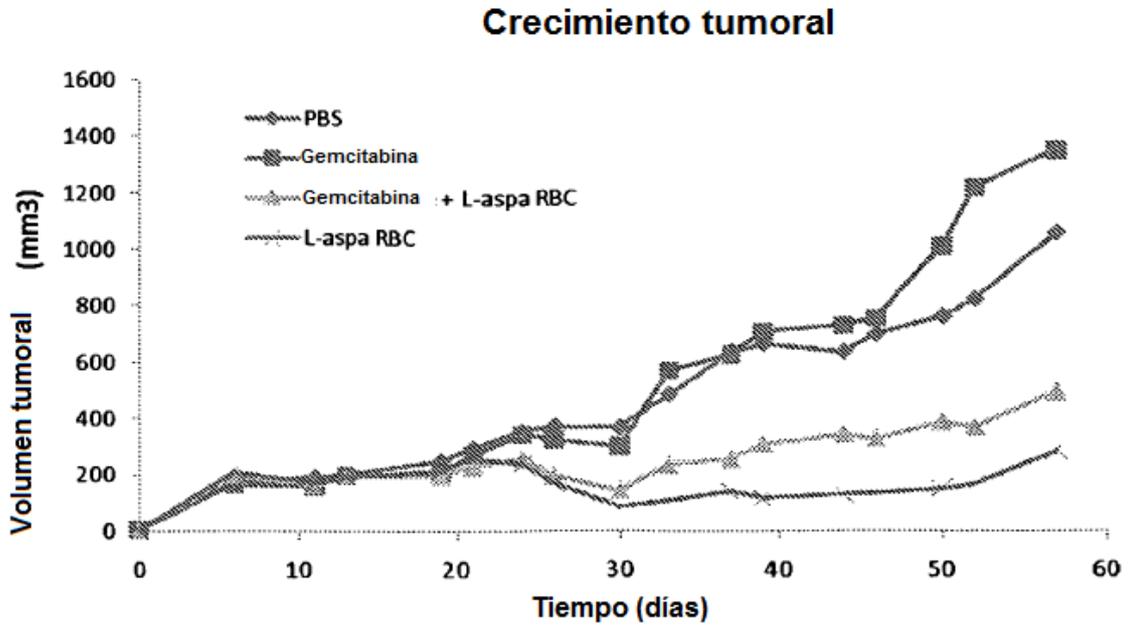


Figura 2: Segundo método de cálculo de la vida media



**Figura 3**



**Figura 4**

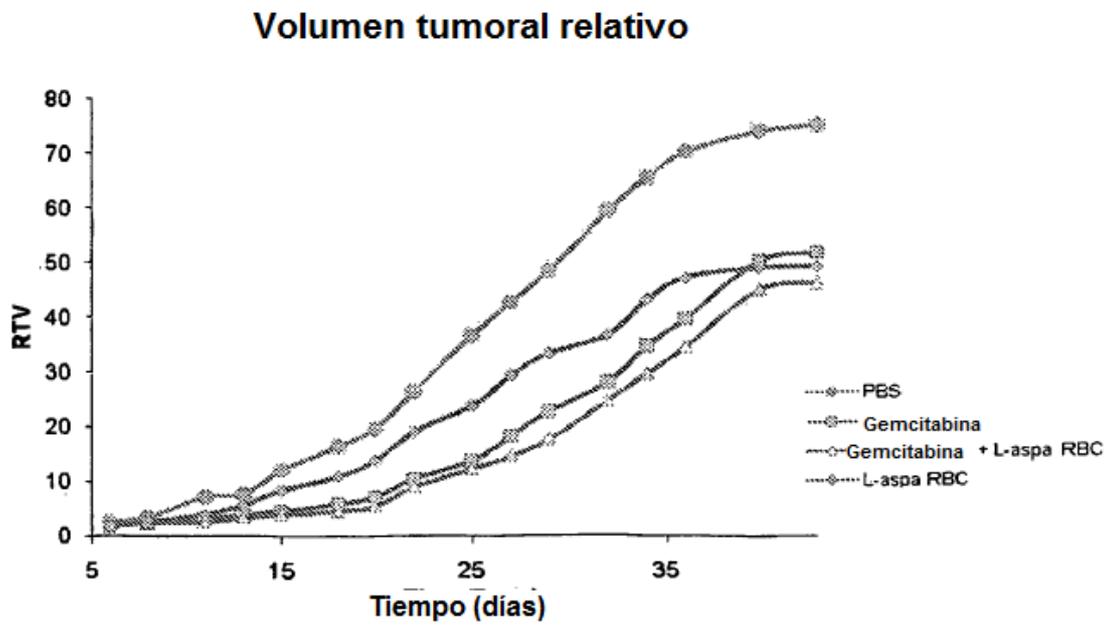


Figura 5

