

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 242**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2011** **E 11805201 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015** **EP 2646000**

54 Título: **Composición de quimioembolización que comprende agentes antiangiogénicos**

30 Prioridad:

29.11.2010 CH 19972010

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

03.08.2015

73 Titular/es:

**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE
VAUDOIS (100.0%)
Rue du Bugnon 21
1011 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**DENYS, ALBAN;
BIZE, PIERRE;
JORDAN, OLIVIER;
DOELKER, ERIC y
BOULENS, NATHALIE**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 542 242 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

Composición de quimioembolización que comprende agentes antiangiogénicos.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método de preparación de una composición de quimioembolización para la administración de agentes antiangiogénicos. La invención se refiere además a una composición de quimioembolización obtenida mediante el método de invención y al uso de la composición de quimioembolización en el método para tratar cánceres de tumores sólidos.

Antecedentes de la invención

Se han desarrollado recientemente perlas con elución de fármaco (DEB) como un nuevo medio de administración de agentes quimioterápicos de modo dirigido y controlable. Las DEB, usadas en terapias de quimioembolización, tales como quimioembolización transarterial (TACE), son perlas embolizantes que pueden cargarse con agentes quimioterápicos y que pueden liberarlos lentamente en la vasculatura del tumor con la ventaja de menor toxicidad sistémica y actividad local sostenida. Por tanto, TACE combina los efectos terapéuticos de la oclusión arterial periférica con la administración local de agentes quimioterápicos. El esquema de TACE ideal debe permitir una concentración máxima y sostenida del agente quimioterápico dentro del tumor con mínima exposición sistémica combinada con una obstrucción calibrada de los vasos del tumor.

Recientemente, se ha notificado que las DEB tienen la capacidad para secuestrar activamente clorhidrato de doxorubicina de una disolución y liberarlo de modo controlado y sostenido. Han mostrado que disminuyen sustancialmente la cantidad de agente quimioterápico que llega a la circulación sistémica, aumentando por tanto significativamente la concentración local del fármaco y la eficacia antitumoral. Por ejemplo, se ha informado sobre perlas de alginato cargadas con doxorubicina (Yao Xue Xue Bao. agosto de 2006; 41 (8):778-83), o también se ha informado sobre perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con grupos sulfonato cargadas con doxorubicina (Clin Cancer Res. 15 de abril de 2006;12(8):2563-7), para quimioembolización del hígado y demostraron una administración sostenida *in vivo*. También se ha notificado recientemente la comparación de la carga de fármaco y administración de doxorubicina e irinotecán para diferentes perlas (Jordan *et al*, J Vase Int Radiol 21:1084-1090, 2010). Estos sistemas usan las propiedades de intercambio iónico del polímero de las perlas para secuestrar fármacos cargados catiónicamente tales como clorhidrato de doxorubicina, y proporcionan un método de administración intraarterial posterior controlada y sostenida en un sitio específico dentro del cuerpo. En los documentos WO 2004/071495 y WO 2006/027567, se dan a conocer perlas que comprenden polímero insoluble en agua, que tiene una carga aniónica global y asociado electrostáticamente con el polímero un compuesto de antraciclina o camptotecina. Las DEB pueden usarse para embolizar tumores, por ejemplo un carcinoma hepatocelular. El documento WO 2008/138758 también da a conocer perlas (microesferas) cargadas con clorhidrato de nemorubicina.

Sin embargo, preparar perlas cargadas con fármaco no es un procedimiento sencillo, especialmente si deben cargarse con agentes quimioterápicos de baja solubilidad en medios acuosos. Esta solubilidad puede ser insuficiente para llegar a una dosis terapéutica útil, tal como para tosilato de sorafenib. En el caso en el que la solubilidad aparente es suficiente para llegar a una dosis terapéutica útil, puede parecer que se produce cierta precipitación retardada; haciendo imposible la utilización de tal preparación en un entorno clínico. Por ejemplo, puede disolverse malato o base de sunitinib en medios convencionales usados para la carga de fármacos de antraciclina, tales como doxorubicina. Sin embargo en tales soluciones convencionales, el malato o la base de sunitinib precipitan en un corto periodo de tiempo, lo que hace que sea muy problemático cargar sunitinib en perlas y obtener disoluciones estables en perlas cargadas con fármaco. Además, no está disponible comercialmente ninguna disolución líquida oral o parenteral de ninguna sal de sunitinib, que pudiera usarse para cargar las DEB. Sólo se han propuesto en la bibliografía suspensiones de sunitinib en medios ácidos para la vía oral (Navid F *et al*, Ann Pharmacotherapy 42:962-966, 2008; Sistla A *et al* Drug Dev Ind Pharm 30(1):19-25, 2004), pero esto no es adecuado para cargar las DEB. El documento WO 2007/090897 da a conocer además un método para cargar perlas con agentes quimioterápicos insolubles en agua usando disolventes orgánicos. Sin embargo, un enfoque de este tipo no es adecuado para la preparación extemporánea por parte del personal médico.

Por tanto, sigue habiendo una necesidad no satisfecha de proporcionar perlas cargadas con fármaco con agentes quimioterápicos de baja solubilidad en agua, tal como agentes antiangiogénicos, más particularmente tales como sunitinib.

Sumario de la invención

Los solicitantes han desarrollado un método novedoso para cargar perlas con elución de fármaco con agentes antiangiogénicos que tienen baja solubilidad en agua, tales como sunitinib.

La presente invención proporciona un método de preparación de una composición de quimioembolización para la

administración de agentes antiangiogénicos caracterizado porque dicho método comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar perlas con elución de fármaco, seleccionadas del grupo que comprende perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato o perlas de poli(alcohol vinílico-co-acrilato de sodio) modificado con carboxilo,

b) preparar una disolución acuosa de agente antiangiogénico, en el que dicha disolución acuosa tiene un pH de 2,5 a 5 y en el que dicho agente antiangiogénico tiene baja solubilidad en agua menor de 5 mg/ml y que está cargado positivamente,

c) añadir una disolución de azúcar o poliol a la disolución antiangiogénica de la etapa b)

d) poner en contacto la disolución antiangiogénica de la etapa c) con perlas con elución de fármaco de la etapa a).

Por tanto, la presente invención proporciona además una composición de quimioembolización para la administración de agentes antiangiogénicos obtenida mediante el método de la presente invención caracterizada porque comprende un agente antiangiogénico cargado en perlas con elución de fármaco aniónicas, en la que dicho agente antiangiogénico se selecciona del grupo que comprende sunitinib, angiostatina K1-3, arresteno, DL- α -difluorometilornitina, fumagilina, genisteína, estaurosporina, ($\pm$)-talidomida, tumstatina, axitinib, bortezomib, bosutinib, gefitinib, pazopanib, semaxanib, sorafenib, vandetanib, vatalanib, canertinib, dovitinib, dasatinib, erlotinib, imatinib, lapatinib, masutinib, mubitinib, lestaurtinib, pazopanib, tandutinib, vismodegib, y en la que dichas perlas con elución de fármaco aniónicas se seleccionan del grupo que comprende perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato y perlas de poli(alcohol vinílico-co-acrilato de sodio) modificado con carboxilo.

La presente invención también proporciona la composición de quimioembolización de la invención para su uso en el método para tratar cánceres de tumores sólidos.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el porcentaje de fármaco restante en 2 ml de disolución de sobrenadante que tiene una concentración inicial de sunitinib 10 mg/ml. Se observa la absorción completa de 20 mg de sunitinib por g de perla ya tras 90 min.

La figura 2 muestra el porcentaje de fármaco restante en diferentes volúmenes de disolución de sunitinib 10 mg/ml usados para la incubación de 1 g de DCbead. La leyenda en la parte derecha indica la cantidad inicial de fármaco inicialmente presente en el medio de incubación en mg, por g de DCbead.

La figura 3 muestra el sunitinib liberado por DCbead cargada en 30 ml de NaCl al 0,9%, usando el método 4 de flujo continuo de la USP. La liberación parcial se atribuye al mecanismo de intercambio iónico de NaCl-fármaco. El periodo de 1,3 h necesario para llegar al 75% de la concentración de meseta indica una liberación gradual del fármaco.

La figura 4 muestra el porcentaje de concentración de sobrenadante restante para la carga de Quadrasphere de 25 mg de sunitinib por mg de microesfera seca.

La figura 5 muestra el nivel medio de ALT (UI/l) 6 y 24 horas tras la administración intraarterial de 2 ml de DCBeads cargadas con 6 mg de sunitinib en la arteria hepática común en un modelo de conejo.

La figura 6 muestra el nivel medio de AST (UI/l) 6 y 24 horas tras la administración intraarterial de 2 ml de DCBeads cargadas con 6 mg de sunitinib en la arteria hepática común en un modelo de conejo.

La figura 7 - Niveles plasmáticos de sunitinib (ng/ml) tras la administración intraarterial de 2 ml de DCBeads cargadas con 6 mg de sunitinib en la arteria hepática común en 9 conejos.

La figura 8 - Niveles plasmáticos de sunitinib (ng/ml) tras la administración oral de 6 mg de en 3 conejos.

La figura 9 muestra mediciones de los niveles de sunitinib (ng/ml) en el hígado 6 horas (n=1) y 24 horas (n=3) tras la administración de 2 ml de DCBeads cargadas con 6 mg de sunitinib en la arteria hepática común.

La figura 10 muestra las curvas de supervivencia de conejos en los 3 grupos tratados respectivamente con DCBeads cargadas con 1,5 mg de sunitinib (grupo 1, n=6), DCBeads solas (grupo 2, n=5), y NaCl inyectado directamente en la rama arterial que riega el lóbulo hepático izquierdo.

La figura 11 muestra el nivel medio de ALT (UI/l) tras la administración intraarterial de 0,05 ml de DCBeads cargadas con 1,5 mg de sunitinib en la rama arterial que riega el lóbulo lateral izquierdo del hígado en un modelo de conejo (grupo 1).

La figura 12 muestra el nivel medio de AST (UI/l) tras la administración intraarterial de 0,05 ml de DCBeads cargadas con 1,5 mg de sunitinib en la rama arterial que riega el lóbulo lateral izquierdo del hígado en un modelo de conejo (grupo 1).

La figura 13 - Nivel medio de ALT (UI/l) tras la administración intraarterial de 0,05 ml de DCBeads en la rama arterial que riega el lóbulo lateral izquierdo del hígado (grupo 2).

La figura 14 - Nivel medio de AST (UI/l) tras la administración intraarterial de 0,05 ml de DCBeads en la rama arterial que riega el lóbulo lateral izquierdo del hígado (grupo 2).

La figura 15 - Nivel medio de ALT (UI/l) tras la administración intraarterial de 0,05 ml de NaCl al 0,9% en la rama arterial que riega el lóbulo lateral izquierdo del hígado (grupo 3).

La figura 16 - Nivel medio de AST (UI/l) tras la administración intraarterial de 0,05 ml de NaCl al 0,9% en la rama arterial que riega el lóbulo lateral izquierdo del hígado (grupo 3).

La figura 17 - Niveles plasmáticos de sunitinib (ng/ml) tras la administración intraarterial de 0,05 ml de DCBeads cargadas con 1,5 mg de sunitinib en la arteria hepática común en 6 conejos.

La figura 18 - Análisis de inmunotransferencia de tipo Western que muestra que la embolización con DCBeads + sunitinib inhibe la actividad de las RTK y que la embolización con DCBeads insípidas aumenta la actividad de RTK tras 24h.

La figura 19 - Examen histopatológico del tumor 15 días tras la embolización con DCBeads cargadas con sunitinib. Aspecto de tumor necrótico al microscopio óptico con tinción de HE. El tumor parece ser necrótico en el 100%.

La figura 20 - Examen histopatológico del tumor 15 días tras la embolización con DCBeads cargadas con sunitinib. La tinción de TUNEL confirma el 100% de necrosis.

La figura 21 - Examen histopatológico del tumor tras la embolización con DCBeads cargadas con sunitinib que muestra DCBeads ubicadas en la periferia del tumor y en espacios portales.

Descripción detallada de la invención

En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria, incluyendo las definiciones. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece el contenido del presente documento. Tal como se usa en el presente documento, se proporcionan las siguientes definiciones con el fin de facilitar la comprensión de la presente invención.

El término “comprender” se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir permitir la presencia de una o más características o componentes.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares “un(o)”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “sujeto” o “paciente” están bien reconocidos en la técnica, y, se usan en el presente documento para referirse a un mamífero y lo más preferiblemente un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto que necesita tratamiento o un sujeto con cánceres de tumores sólidos. En otras realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto que se ha sometido a resección tumoral o radioterapia y/o quimioterapia. El término no indica una edad o sexo particular. Por tanto, se pretende que estén cubiertos sujetos adultos y recién nacidos, ya sean hombres o mujeres.

Se ha demostrado que la isquemia inducida por embolización provoca un aumento de la actividad de VEGF y neoangiogénesis, particularmente en la periferia del tumor. Esta neoangiogénesis probablemente explica el nuevo crecimiento de células tumorales residuales tras el tratamiento mediante quimioembolización transarterial (TACE). Por tanto, los solicitantes estimaron que TACE podría ser más eficaz cuando se asocie con terapia anti-VEGF, por ejemplo la asociación de TACE con diferentes agentes antiangiogénicos.

Los solicitantes han desarrollado una terapia de quimioembolización que combina los efectos terapéuticos de la oclusión arterial periférica con la administración local de un agente antiangiogénico. La quimioembolización es una combinación de administración local de quimioterapia y un procedimiento denominado embolización para tratar cánceres de tumores sólidos. Cánceres de tumores sólidos que pueden tratarse mediante quimioembolización son sarcomas, carcinomas y linfomas. Pueden desarrollarse tumores sólidos prácticamente en cualquier tejido u órgano, tal como pulmones, mama, próstata, piel, hígado y colon. En una realización preferida de la presente invención, los

cánceres de tumores sólidos son tumores malignos hipervascularizados, tales como hepatoma o carcinoma hepatocelular (cáncer de hígado primario) y metástasis (diseminación) al hígado de: cáncer de colon, cáncer de mama, tumores carcinoides y otros tumores neuroendocrinos, tumores de células de los islotes del páncreas, melanoma ocular, sarcomas, otros tumores vasculares primarios en el cuerpo. Se ha demostrado cierto éxito con

5 pacientes cuyo cáncer se ha diseminado a otras zonas del cuerpo, tales como el tórax, el riñón, los órganos pélvicos o la cavidad bucal. La quimioembolización es lo más beneficioso para pacientes cuya enfermedad son predominantemente tumores malignos hipervascularizados, tales como de hígado, ya haya empezado el tumor en el hígado o se haya diseminado hasta el hígado (metastatizado) desde otro órgano.

10 En la quimioembolización, se inyectan fármacos anticancerígenos directamente en el vaso sanguíneo que alimenta un tumor canceroso. Además, se coloca material sintético denominado agente embólico, tal como perlas, en el interior de los vasos sanguíneos que suministran sangre al tumor, atrapando en efecto la quimioterapia en el tumor.

15 Tal como se usa en el presente documento, "inyectado directamente en el vaso sanguíneo que alimenta un tumor canceroso" o "colocado en el interior de los vasos sanguíneos que suministran sangre al tumor" se refiere a la deposición del agente embólico, tal como perlas, en una arteria suficientemente próxima al tumor diana. Tal deposición puede lograrse mediante varios medios incluyendo, sin limitación, el uso de catéteres e inyección directa. Ambos de estos métodos de administración de agentes embólicos, tales como perlas, a un sitio local específico en el cuerpo de un paciente los conocen bien los expertos en la técnica.

20 Dependiendo del número y tipo de tumores, la quimioembolización puede usarse como el único tratamiento o puede combinarse con otras opciones de tratamiento tales como cirugía (resección tumoral), quimioterapia y/o radioterapia convencionales. Por ejemplo, puede aplicarse quimioembolización antes y/o tras cirugía (resección tumoral), quimioterapia y/o radioterapia convencionales.

25 El término "quimioterapia convencional" se refiere generalmente a un tratamiento de un cáncer usando agentes quimioterápicos/químicos específicos. Un agente quimioterápico se refiere a un agente farmacéutico usado generalmente para tratar cáncer. Los agentes quimioterápicos para tratar cáncer que interfieren en la síntesis de ADN incluyen, por ejemplo, cisplatino, carboplatino, etopósido, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina, ifosfamida, paclitaxel, gemcitabina, docetaxel e irinotecán y agentes anticancerígenos a base de platino, incluyendo cisplatino y carboplatino. Otros fármacos anticancerígenos comprenden inhibidores de tirosina cinasa tales como gefitinib, imatinib; inhibidores de la farnesil transferasa incluyendo lonafarnib; inhibidores de dianas de mamífero de rapamicina (mTOR) tales como evereolímús; inhibidores de PKC; PI3K y AKT y anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores celulares para moléculas de señalización tales como bevacizumab, cetuximab, panitumumab y trastazumab.

35 El término "radioterapia convencional" se refiere al uso de radiación ionizante como parte del tratamiento de cáncer para controlar las células malignas. Preferiblemente, la radiación ionizante son rayos X o rayos γ . También es común combinar radioterapia con cirugía, quimioterapia, terapia hormonal, o combinaciones de los mismos. Los tipos de

40 cáncer más comunes pueden tratarse habitualmente con radioterapia. La intención de tratamiento precisa (curativa, adyuvante, neoadyuvante o paliativa) dependerá del tipo, la ubicación y la fase del tumor, así como la salud general del sujeto que necesita el mismo.

45 La quimioterapia y radioterapia convencionales pueden ser también quimio-radioterapia concomitante. El término "quimio-radioterapia concomitante" se usa cuando estos dos tratamientos (quimioterapia y radioterapia) se administran o bien al mismo tiempo, o bien casi al mismo tiempo, por ejemplo una tras otra, o en el mismo día.

La presente invención proporciona un método de preparación de una composición de quimioembolización para la administración de agentes antiangiogénicos caracterizado porque dicho método comprende las siguientes etapas:

50 a) proporcionar perlas con elución de fármaco, seleccionadas del grupo que comprende perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato o perlas de poli(alcohol vinílico-co-acrilato de sodio) modificado con carboxilo,

55 b) preparar una disolución acuosa de agente antiangiogénico, en el que dicha disolución acuosa tiene un pH de 2,5 a 5 y en el que dicho agente antiangiogénico tiene baja solubilidad en agua menor de 5 mg/ml y que está cargado positivamente,

60 c) añadir una disolución de azúcar o poliol a la disolución antiangiogénica de la etapa b)

d) poner en contacto la disolución antiangiogénica de la etapa c) con perlas con elución de fármaco de la etapa a).

Opcionalmente, se retira solución salina de las perlas con elución de fármaco aniónicas en la etapa a).

65 Habitualmente, la etapa d) se lleva a cabo suspendiendo perlas con elución de fármaco en la disolución antiangiogénica de la etapa c). Normalmente, las perlas con elución de fármaco se dejan en contacto con la

disolución antiangiogénica durante de 1 a 5 horas, preferiblemente 1 hora y 30 minutos y 3 horas y 30 minutos, más preferiblemente durante 2 horas.

Preferiblemente, dicho agente antiangiogénico se selecciona del grupo que comprende sunitinib, angiostatina KI-3, arresteno, antitrombina antiangiogénica (aaAT), canstatina, DL- α -difluorometil-ornitina, endostatina, fumagilina, genisteína, minociclina, estaurosporina, ($\pm$)-talidomida, tumstatina, axitinib, bortezomib, bosutinib, gefitinib, pazopanib, semaxanib, sorafenib, vandetanib, vatalanib, canertinib, dovitinib, dasatinib, erlotinib, imatinib, lapatinib, masutinib, mubitinib, nilotinib, lestaurtinib, pazopanib, tandutinib, vismodegib.

Más preferiblemente, dichos agentes antiangiogénicos se seleccionan del grupo que comprende sunitinib, angiostatina KI-3, arresteno, DL- α -difluorometil-ornitina, fumagilina, genisteína, estaurosporina, ($\pm$)-talidomida, tumstatina, axitinib, bortezomib, bosutinib, gefitinib, pazopanib, semaxanib, sorafenib, vandetanib, vatalanib, canertinib, dovitinib, dasatinib, erlotinib, imatinib, lapatinib, masutinib, mubitinib, lestaurtinib, pazopanib, tandutinib, vismodegib.

Lo más preferiblemente, dicho agente antiangiogénico es sunitinib o imatinib.

Los solicitantes han desarrollado un método ventajoso para cargar agentes antiangiogénicos que tienen baja solubilidad en agua menor de 5 mg/ml en perlas con elución de fármaco. Según este método, puede incorporarse agente antiangiogénico en las perlas con elución de fármaco poniendo en contacto perlas hinchadas suspendidas en un vehículo líquido continuo, tal como agua, con una disolución acuosa de azúcar o poliol del agente antiangiogénico, a lo largo de un periodo de tiempo, normalmente de 2 horas, mediante lo cual el fármaco se absorbe en el cuerpo de las perlas.

Según la presente invención, la disolución acuosa de azúcar del agente antiangiogénico se prepara normalmente disolviendo el agente antiangiogénico en agua, si es necesario mediante acidificación con cualquier ácido adecuado, para obtener una disolución acuosa que tiene un pH de 2,5 a 5, preferiblemente pH de 3 a 4,5. Normalmente, la concentración del agente antiangiogénico está en el intervalo de 0 a 25 mg/ml, preferiblemente de 1 a 25 mg/ml o de 1 a 15 mg/ml, más preferiblemente de 2 a 25 mg/ml o de 2 a 15 mg/ml, lo más preferiblemente de 5 a 15 mg/ml. También está englobada por la presente invención una alta concentración tal como de 15 a 25 mg/ml de agente antiangiogénico. La disolución se agita suavemente hasta la disolución completa del agente antiangiogénico. Entonces se añade un azúcar o un poliol para conseguir una disolución con presión osmótica adecuada.

Un ácido adecuado puede ser cualquier ácido mineral, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido nítrico, o cualquier ácido orgánico, por ejemplo ácido láctico, ácido acético o ácido fórmico. Preferiblemente, el ácido es ácido clorhídrico. Por ejemplo para sunitinib, normalmente se usa disolución de HCl 0,1 N, en una cantidad equimolar o una cantidad ligeramente mayor a la de sunitinib, tal como 1 - 1,05 moles de HCl por 1 mol de sunitinib.

Según la presente invención, un azúcar o poliol se selecciona del grupo que comprende glucosa, sacarosa, dextrano, manitol, sorbitol o trehalosa. Normalmente, la disolución de azúcar o poliol es al 2 - 15%, preferiblemente al 3 al 7% y más preferiblemente al 5%. Preferiblemente, la disolución de azúcar es disolución de glucosa al 5%.

Los solicitantes han encontrado que sorprendentemente, en presencia del azúcar, preferiblemente glucosa al 5%, la disolución de sunitinib mostró ser estable, sin ninguna precipitación, en contraposición con disoluciones de ácido clorhídrico o solución salina. Ventajosamente, esta disolución es isotónica con respecto al plasma humano y es segura para las aplicaciones parenterales. Cabe destacar que el azúcar no se limita a glucosa. Podrían usarse otros azúcares o polioles tales como sacarosa, dextrano, manitol, sorbitol o trehalosa.

El vehículo de hinchamiento puede retirarse posteriormente, o de manera conveniente, puede retenerse con las perlas como parte del producto.

Las perlas hinchadas pueden usarse en forma hinchada en forma de suspensión espesa, es decir sin líquido o sin una gran cantidad de líquido fuera de las perlas hinchadas. En efecto, para aumentar la eficacia de carga, se encontró que era preferible retirar la solución salina, normalmente disolución de fosfato de sodio, de la disolución de perlas para dejar una suspensión espesa, antes de poner en contacto las perlas hinchadas con la disolución acuosa de azúcar del agente antiangiogénico. Por tanto, opcionalmente, se la retira la solución salina de las perlas con elución de fármaco aniónicas en la etapa a).

Alternativamente, las perlas cargadas con fármaco pueden retirarse de cualquier disolución de carga de fármaco restante y secarse las perlas mediante cualquiera de las técnicas clásicas empleadas para secar productos de base farmacéutica. Esto podría incluir, pero no se limita a, secado al aire a temperaturas elevadas o ambiente o a presión reducida o vacío; liofilización clásica; liofilización a presión atmosférica; dispersión mejorada en disolución de fluidos supercríticos (SEDS). Alternativamente, las perlas cargadas con fármaco pueden deshidratarse usando un disolvente orgánico para reemplazar agua en una serie de etapas, seguido por evaporación del disolvente orgánico más volátil. Debe seleccionarse un disolvente que sea un no disolvente para el fármaco.

Un procedimiento típico de liofilización clásica podría proceder de la siguiente manera: se toman alícuotas de la muestra en viales de vidrio parcialmente tapados, que se colocan en un estante enfriado, de temperatura controlada dentro del liofilizador. Se reduce la temperatura de estante y se congela la muestra hasta una temperatura uniforme, definida. Tras la congelación completa, la presión en el secador se disminuye hasta una presión definida para iniciar el secado primario. Durante el secado primario, se retira progresivamente vapor de agua de la masa congelada mediante sublimación mientras que se controla la temperatura de estante a una baja temperatura constante. Se inicia el secado secundario aumentando la temperatura de estante y reduciendo la presión de la cámara adicionalmente de modo que el agua absorbida en la masa semiseca puede retirarse hasta que el contenido de agua residual disminuye hasta el nivel deseado. Los viales pueden sellarse, *in situ*, bajo una atmósfera protectora si se requiere.

La liofilización a presión atmosférica se logra haciendo circular rápidamente aire muy seco sobre un producto congelado. En comparación con el procedimiento de liofilización clásica, la liofilización sin vacío tiene varias ventajas. El gas seco circulante proporciona una transferencia de masa y calor mejorada desde la muestra congelada. De particular interés es el hecho de que usando procedimientos de secado por pulverización atmosférica, en lugar de una torta, se obtiene un polvo fluido, fino. Pueden obtenerse partículas que tienen diámetros submicrométricos; es decir, diez veces más pequeños de lo que puede obtenerse generalmente mediante molienda. La naturaleza particulada, con su alta área superficial da como resultado un producto fácilmente rehidratable.

Aunque la composición de quimioembolización de la invención puede estar compuesta por perlas y agente quimioterápico catiónicamente cargado inmediatamente antes de la administración, también es posible que la composición de quimioembolización se suministre precargada con el fármaco. Para este último caso, perlas secadas cargadas con fármaco pueden hidratarse inmediatamente antes de su uso. Alternativamente, la composición de quimioembolización que se suministra puede combinarse por completo y comprende preferiblemente perlas con elución de fármaco con agente antiangiogénico absorbido o adsorbido y disolución acuosa de azúcar empapada.

El nivel de agente antiangiogénico en la composición de quimioembolización de la invención, que se administra, está preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 500 mg por ml de composición, preferiblemente de 10 a 100 mg por ml. Preferiblemente, el tratamiento se repite de una a cinco veces y, para cada dosis, la cantidad de agente antiangiogénico administrado está en el intervalo de 0,1 a 100 mg por ml, preferiblemente de 10 a 100 mg por ml. La cantidad de la composición de quimioembolización administrada en un tratamiento normal está en el intervalo de 1 a 6 ml. La cantidad total de agente antiangiogénico administrado por dosis está preferiblemente en el intervalo de 10 a 1000 mg, más preferiblemente de 25 a 250 mg. Basándose en los datos de liberación mostrados en los ejemplos más adelante, los solicitantes creen que esto proporcionará concentraciones terapéuticamente eficaces en el tumor y que deben tener lugar niveles significativos de administración intracelular, mediante lo cual se logrará un efecto terapéutico. Deben evitarse los efectos secundarios sistémicos adversos de la administración del agente antiangiogénico.

La presente invención proporciona además una composición de quimioembolización para la administración de agentes antiangiogénicos obtenida mediante el método de la presente invención caracterizada porque comprende un agente antiangiogénico cargado en perlas con elución de fármaco aniónicas, en la que dicho agente antiangiogénico se selecciona del grupo que comprende sunitinib, angiostatina K1-3, arresteno, DL- α -difluorometilornitina, fumagilina, genisteína, estaurosporina, ($\pm$)-talidomida, tumstatina, axitinib, bortezumib, bosutinib, gefitinib, pazopanib, semaxanib, sorafenib, vandetanib, vatalanib, canertinib, dovitinib, dasatinib, erlotinib, imatinib, lapatinib, masutinib, mubitinib, lestaurtinib, pazopanib, tandutinib, vismodegib, y en la que dichas perlas con elución de fármaco aniónicas se seleccionan del grupo que comprende perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato y perlas de poli(alcohol vinílico-co-acrilato de sodio) modificado con carboxilo.

Preferiblemente, dicho agente antiangiogénico es sunitinib o imatinib. También preferiblemente, dichas perlas con elución de fármaco aniónicas son perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato o perlas de poli(alcohol vinílico-co-acrilato de sodio) modificado con carboxilo. Lo más preferiblemente, dichas perlas con elución de fármaco aniónicas son perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato.

En una realización adicional, la presente invención también se refiere a una composición de quimioembolización para la administración de agente antiangiogénico obtenida mediante el método de la presente invención caracterizada porque comprende un agente antiangiogénico, que tiene baja solubilidad en agua menor de 5 mg/ml y que está cargado positivamente, cargado en perlas con elución de fármaco aniónicas, en la que dichas perlas con elución de fármaco aniónicas se seleccionan del grupo que comprende perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato y perlas de poli(alcohol vinílico-co-acrilato de sodio) modificado con carboxilo.

El término "baja solubilidad en agua" se refiere a un agente antiangiogénico de la invención, o bien la sal o bien la base libre acidificada del mismo, que tiene una solubilidad en el medio sin azúcar menor que la dosis terapéutica que puede incorporarse en las perlas con elución de fármaco (microesferas) cuando dichas perlas con elución de fármaco se ponen en contacto con la disolución de agente antiangiogénico. Normalmente, baja solubilidad en agua en la presente solicitud se refiere a un compuesto que tiene una solubilidad en agua (sin azúcar) que es menor de o igual a 5 mg/ml, cuando se mide a la temperatura ambiental (es decir, 18-27°C).

Los términos “agente antiangiogénico” y “inhibidor de la angiogénesis”, o bien la sal o bien la base libre del mismo, se usan de manera intercambiable en el presente documento e incluyen cualquier agente que pueda impedir o inhibir la formación de vasos sanguíneos. En el contexto de la presente invención, los ejemplos específicos de agentes antiangiogénicos incluyen, pero no se limitan a, sunitinib, angiostatina K1-3, arresteno, antitrombina antiangiogénica (aaAT), canstatina, DL- α -difluorometil-ornitina, endostatina, fumagilina, genisteína, minociclina, estaurosporina, ($\pm$)-talidomida, tumstatina, axitinib, bortezomib, bosutinib, gefitinib, pazopanib, semaxanib, sorafenib, vandetanib, vatalanib, canertinib, dovitinib, dasatinib, erlotinib, imatinib, lapatinib, masutinib, mubitinib, nilotinib, lestaurtinib, pazopanib, tandutinib, vismodegib.

Preferiblemente, agentes antiangiogénicos se seleccionan del grupo que comprende sunitinib, angiostatina K1-3, arresteno, DL- α -difluorometil-ornitina, fumagilina, genisteína, estaurosporina, ($\pm$)-talidomida, tumstatina, axitinib, bortezomib, bosutinib, gefitinib, pazopanib, semaxanib, sorafenib, vandetanib, vatalanib, canertinib, dovitinib, dasatinib, erlotinib, imatinib, lapatinib, masutinib, mubitinib, lestaurtinib, pazopanib, tandutinib, vismodegib.

Más preferiblemente, el agente antiangiogénico es sunitinib y imatinib.

Se ha encontrado que la presente invención resulta útil para formular composiciones de quimioembolización que contienen agentes quimioterápicos que tienen propiedades antiangiogénicas y baja solubilidad en agua. La invención resulta útil de manera particular para, por ejemplo, sunitinib.

Sunitinib es una molécula pequeña que inhibe múltiples tirosina cinasas receptoras (RTK) tales como receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) y receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), que desempeñan un papel tanto en la angiogénesis tumoral como en la proliferación de células tumorales. Sunitinib también inhibe otras RTK tales como KIT (CD 117) que, cuando se activan de manera inapropiada por mutaciones, dirige la mayoría de los tumores de células del estroma gastrointestinal. En estos tumores, se ha recomendado sunitinib como terapia de segunda línea para pacientes cuyos tumores son resistentes a imatinib, o en pacientes que se vuelven intolerantes al fármaco. Además, sunitinib también inhibe otras RTK como RET, CSF-1R, FLT3. Por tanto, la inhibición simultánea de estas dianas conduce a una reducción de la vascularización del tumor y a un aumento de la muerte de células cancerosas y, en última instancia, a la reducción del tumor.

Se aprobó sunitinib por la FDA para el tratamiento de carcinoma de células renales (RCC) y tumor del estroma gastrointestinal (GIST) resistente a imatinib el 26 de enero de 2006. Sunitinib demostró actividad antitumoral en estudios preclínicos en modelos de cáncer colorrectal (CRC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), melanoma, carcinoma de células renales (RCC) y carcinoma de células escamosas (SCC). Se demostró la actividad clínica en cáncer neuroendocrino, de colon y de mama en estudios de fase II. La dosis oral inicial aprobada actualmente de sunitinib es de 50 mg/día, lo que es suficiente para producir concentraciones plasmáticas de al menos 50 ng/ml (la concentración mínima prevista a partir de ensayos de base celular y química para inhibir VEGFR y PDGFR).

El hecho de que sunitinib seleccione como diana muchos receptores diferentes, da como resultado muchos efectos secundarios. Hipertensión y astenia parecen ser los efectos adversos más comunes con sunitinib. Diarrea, anorexia, disgeusia, estomatitis y síndrome mano-pie (HFS) son los otros efectos secundarios clínicamente relevantes. HFS puede requerir la interrupción del tratamiento durante unos cuantos días y/o reducción de la dosis. La fatiga puede estar relacionada con el desarrollo de hipotiroidismo durante la terapia con sunitinib. Se requieren reducciones de la dosis en el 50% de los pacientes tratados para RCC para manejar las toxicidades significativas de este agente. Se producen acontecimientos adversos graves (grado 3 ó 4) en $\leq 10\%$ de los pacientes. Las anomalías de laboratorio asociadas con la terapia con sunitinib incluyen niveles aumentados de lipasa y amilasa, recuentos reducidos de neutrófilos, linfocitos y plaquetas. Por tanto, la administración de sunitinib mediante DEB podría reducir la toxicidad sistémica a la vez que mantiene una eficacia antitumoral local, siempre que sunitinib no precipite en las perlas con elución de fármaco.

Las perlas con elución de fármaco (DEB) son perlas esféricas o sustancialmente esféricas (microesferas), basadas en un material polimérico biocompatible hidrófilo, aunque insoluble en agua, tal como poli(alcohol vinílico) (PVA) modificado o copolímero acrílico. Estos polímeros portan grupos cargados negativamente para retener agentes quimioterápicos cargados positivamente, tales como agentes antiangiogénicos. Normalmente, las perlas (microesferas) tienen tamaños, cuando se equilibran en agua a 37°C, en el intervalo de 1-1000 μm , más preferiblemente en el intervalo de 50 a 500 μm , lo más preferiblemente en el intervalo de 100-300 μm . El diámetro se determina preferiblemente mediante la medición del tamaño de las perlas antes de la carga con el agente quimioterápico cargado positivamente.

Los ejemplos específicos de perlas con elución de fármaco según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato y perlas de poli(alcohol vinílico-co-acrilato de sodio) modificado con carboxilo.

El hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato, usado para preparar perlas conocidas como DCBead™ (Biocompatibles), es un material de embolización microesférico, blando y deformable aprobado por la FDA para el tratamiento de tumores hipervasculares y malformaciones arteriovenosas. Se compone de un hidrogel de polímero de poli(alcohol vinílico) (PVA) que se ha modificado mediante la adición de un componente que contiene ácido sulfónico (ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico), conocido como PVA (con dimetilacetal de N-acriloil-aminoacetaldehído) copolimerizado con la sal de sodio de 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato, y formulado mediante polimerización en suspensión inversa en perlas de tamaño variable desde 50 hasta 1200 µm. La presencia del resto cargado negativamente permite que las perlas interaccionan con agentes quimioterápicos con carga opuesta. Las perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato se almacenan habitualmente en una disolución de envasado de fosfato.

Perlas de poli(alcohol vinílico-co-acrilato de sodio) modificado con carboxilo, conocidas como Hepasphere™ en Europa o Quadrasphere™ en los EE.UU. (Biosphere Medical) son perlas calibradas con precisión, esféricas, hidrófilas y microporosas. Se suministran como un producto seco que pueden rehidratarse antes de su uso. Las propiedades elásticas permiten la deformación temporal de la esfera, lo que facilita el paso a través de sistemas de administración pequeños. Permiten una oclusión completa de tumores hipervascularizados o malformaciones arteriovenosas. El polímero se modifica con grupos carboxilo, lo que facilita la carga de fármaco catiónico.

Según la presente invención, también pueden usarse las perlas BeadBlock™ (Biocompatibles). Estas perlas son también perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato, pero contienen menor grupos sulfonato que la DCBead™ mencionada anteriormente.

Según la presente invención, el agente antiangiogénico cargado positivamente (catiánicamente) se asocia con las perlas aniónicas preferiblemente de modo que se permite la liberación controlada del agente antiangiogénico a lo largo de un periodo. Este periodo puede ser de desde varios minutos hasta semanas, preferiblemente de al menos unos cuantos días, preferiblemente hasta 72 horas. El agente antiangiogénico se une electrostáticamente al polímero de las perlas. La presencia de grupos aniónicos en las perlas permite el control de la liberación de agente antiangiogénico cargado positivamente (catiánicamente). Es importante que el agente antiangiogénico no esté unido covalentemente a la matriz de polímero.

La presente invención proporciona además la composición de quimioembolización de la invención para su uso en el método para tratar cánceres de tumores sólidos.

En una realización preferida de la presente invención, cánceres de tumores sólidos son tumores malignos hipervascularizados, tales como hepatoma o carcinoma hepatocelular (cáncer de hígado primario) y metástasis (diseminación) al hígado de: cáncer de colon, cáncer de mama, metástasis de GIST en hígado, cáncer renal, tumores carcinoides y otros tumores neuroendocrinos, tumores de células de los islotes del páncreas, melanoma ocular, sarcomas, otros tumores vasculares primarios en el cuerpo.

Por tanto preferiblemente, dichos tumores malignos hipervascularizados se seleccionan del grupo que comprende carcinoma hepatocelular (HCC), metástasis en hígado, colangiomas, tumores neuroendocrinos, metástasis de GIST en hígado y cáncer renal.

La presente invención también proporciona un método de tratamiento de cánceres de tumores sólidos en un sujeto que padece los mismos que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de quimioembolización de la invención. Preferiblemente, dichos cánceres de tumores sólidos son tumores malignos hipervascularizados. Más preferiblemente, dichos tumores malignos hipervascularizados se seleccionan del grupo que comprende carcinoma hepatocelular (HCC), metástasis en hígado, colangiomas, tumores neuroendocrinos, metástasis de GIST en hígado y cáncer renal.

El método de esta invención puede usarse para tratar cualquier cáncer de tumor sólido al que se suministra sangre mediante una arteria relativamente alcanzable, dedicada tal como las arterias renales, hepáticas, pulmonares y cardíacas. En un aspecto de esta invención, el cáncer de tumor sólido es un carcinoma hepatocelular.

“Tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Las personas que necesitan tratamiento incluyen aquellas que ya tienen el trastorno, por ejemplo cáncer de tumor sólido, así como aquellas en las que va a prevenirse el trastorno, por ejemplo cáncer de tumor sólido. Así, el mamífero, preferiblemente ser humano, que va a tratarse en el presente documento puede haberse diagnosticado que tiene el trastorno, por ejemplo cáncer de tumor sólido, o puede estar predispuesto o ser susceptible al trastorno, por ejemplo cáncer de tumor sólido. “Mamífero” para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, monos, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de una composición de quimioembolización eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno en un mamífero. En el caso de cáncer de tumor sólido, la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de quimioembolización puede reducir el tamaño del tumor; inhibir (es

decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierto grado, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer de tumor sólido. En la medida en que la composición de quimioembolización de la presente invención puede prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en el presente documento para significar una cantidad suficiente para prevenir, o preferiblemente reducir en al menos aproximadamente el 30 por ciento, preferiblemente en al menos el 50 por ciento, preferiblemente en al menos el 70 por ciento, preferiblemente en al menos el 80 por ciento, preferiblemente en al menos el 90%, un cambio clínicamente significativo en el crecimiento o la progresión o la actividad mitótica de una masa celular diana, grupo de células cancerosas u otra característica de la patología.

La dosis diaria de la composición de quimioembolización de la presente invención se variará necesariamente dependiendo del huésped tratado, la vía de administración particular y la gravedad y la clase de la dolencia que esté tratándose. Por consiguiente, el médico que está tratado a cualquier paciente particular puede determinar la dosificación óptima. Además, se observa que el médico clínico o doctor que esté aplicando el tratamiento sabrá cómo y cuándo iniciar, interrumpir, ajustar o terminar la terapia según la respuesta del paciente individual. Para cualquier composición de quimioembolización usada en el método de la presente invención, puede estimarse una dosis terapéuticamente eficaz inicialmente a partir de ensayos en cultivo celular, modelos animales o con la microdosificación de sujetos humanos.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Ha de entenderse que la invención incluye todas de tales variaciones y modificaciones sin apartarse del espíritu o las características esenciales de la misma. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones o dos cualesquiera o más de dichas etapas o características. La presente divulgación ha de considerarse por tanto en todos sus aspectos como ilustrativa y no restrictiva, estando indicado el alcance de la invención por las reivindicaciones adjuntas, y se pretende que estén abarcados en la misma todos los cambios que se encuentren dentro de su significado y rango de equivalencia.

La anterior descripción se entenderá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, tales ejemplos son a modo de ejemplo de métodos de puesta en práctica de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: carga de sunitinib en las DEB

Se usó un vial de DCbead™ (100-300 micrómetros de diámetro, Biocompatibles R.U.), tras retirar tanto sobrenadante de solución salina como fue posible (aproximadamente 6 ml) del vial. Se dejaron aproximadamente 2 ml de perlas en el fondo del vial. Se prepararon 4 ml de una disolución 10 mg/ml de base de sunitinib de la siguiente manera: a 40 mg de base de sunitinib (es decir, $1,3 \cdot 10^{-4}$ mol) se le añadieron 1,4 ml de HCl 0,1 N (es decir, una razón molar de 1,05 con respecto a sunitinib). Se agitó suavemente el sunitinib hasta la disolución completa. Entonces, se añadió una disolución de glucosa al 5% p/p para llegar a un volumen final de 4 ml correspondiente a una concentración de sunitinib de 10 mg/ml.

Se añadió la disolución al vial de DCbead™, se agitó suavemente una vez, y se dejó a temperatura ambiente durante dos horas. Se extrajeron alícuotas en diferentes puntos de tiempo para valoración espectrofotométrica a 430 nm. Se muestra el porcentaje de concentración de sobrenadante restante en la figura 1. Casi todo (>98%) el fármaco desapareció del sobrenadante, indicando una carga progresiva en las perlas. Finalmente, se obtuvo una cantidad de fármaco de 20 mg de sunitinib por g de DCbead™. Esto se designa a continuación en el presente documento como carga de perlas (en mg de sunitinib por g de perlas).

Ejemplo 2: Variaciones del protocolo de carga de fármaco

Se repitió el protocolo de carga del ejemplo 1, añadiendo diversos volúmenes de la disolución de sunitinib a 10 mg/ml al vial de DCbead™, dando como resultado por tanto diferentes cargas nominales de perlas, de desde 20 mg por g de DCbead™ hasta 85 mg por g de DCbead™. Se ilustra la evolución temporal de la concentración de sobrenadante en la figura 2. El porcentaje de fármaco incorporado en la perla tras una incubación de 2 horas, con relación al fármaco contenido en la disolución, disminuyó con el volumen creciente de la disolución de sunitinib. Estos resultados muestran que podrían lograrse altas cargas útiles de fármaco en un periodo de carga de 2 h.

Ejemplo 3: Propiedades de liberación de fármaco

Se cargaron DCbead tal como se describió en el ejemplo 1. Se realizaron experimentos de liberación usando el método 4 (flujo continuo) de la USP, con un aparato CE 6 de Sotax, a 37°C, con flujo constante (bomba CY7 a

5 ml/min) en NaCl al 0,9%, con n=6 células en paralelo. Se usó determinación espectrofotométrica a 430 nm para medir la concentración de fármaco. Se muestran los resultados en la figura 3, que demuestra una liberación gradual a lo largo de 6 horas. La cantidad de fármaco eluido era una función del contenido de sal total del baño receptor, tal como se esperaba para un mecanismo de intercambio iónico de la administración.

Ejemplo 4: Carga de sunitinib en Quadrasphere™

Se usó un vial de 25 mg de Quadraspheres™ secas de 50-100 micrómetros (Biosphere Medical). Para permitir el hinchado completo de las perlas, tiene que usarse un volumen suficientemente grande (10 ml) de disolución, preparada de la siguiente manera: a 25 mg de base de sunitinib se le añadieron 0,88 g de HCl 0,1 N, es decir una razón molar de 1,05 molar con respecto a sunitinib. Se agitó suavemente el vial hasta la disolución completa. Entonces se añadió una disolución de glucosa al 5% p/p para llegar a un volumen final de 10 ml correspondiente a una concentración de sunitinib de 2,5 mg/ml. Entonces se vertieron 10 ml de la disolución de sunitinib en el vial de Quadrasphere™ que contenía 25 mg de microesferas secadas.

Se retiraron diez microlitros de sobrenadante en puntos de tiempo predefinidos y se midió la absorbancia a 430 nm. Tras 15 min, pudo encontrarse menos del 1% del fármaco en el sobrenadante. Tras 2 horas, pudo cargarse el 99,6% del fármaco en Quadrasphere. Esto demuestra la adsorción completa del sunitinib por las microesferas Quadrasphere™.

Ejemplo 5: Evaluación de la farmacocinética y toxicidad de perlas con elución de sunitinib en el conejo

Materiales y métodos

Modelo animal.

Se usaron conejos blancos de Nueva Zelanda macho adultos (n=12) que pesaban entre 3,2-3,8 kg.

Preparación de DEB cargadas con sunitinib.

Se usaron DCBeads que medían entre 100-300 µm (Biocompatibles). Se estimó que el volumen máximo de DCBeads que pueden administrarse al hígado de conejos es de aproximadamente 0,2 ml. Se cargaron DCBeads a 30 mg de sunitinib/ml. Se cargaron DCBeads con sunitinib mediante suspensión durante 2 horas en una disolución de sunitinib para conseguir la concentración requerida de sunitinib por ml de perlas. Se prepararon pequeñas alícuotas de 0,2 ml que contenían 6 mg de sunitinib en jeringas individuales para embolización de todo el hígado. Se ha verificado previamente la estabilidad del fármaco mediante análisis de HPLC. Estudios *in vitro* mostraron que el fármaco cargado puede liberarse en el plazo de unas pocas horas (T75% = 1,3 horas) en un medio de solución salina. La cinética y el grado de liberación exactos dependen de la concentración y el volumen de solución salina, tal como se esperaba para un mecanismo de intercambio iónico.

Protocolo experimental.

Se separaron los animales en 3 grupos. Los primeros dos grupos (grupos 1 y 2, n=4 y 4 respectivamente) recibieron 0,2 ml de DEB + sunitinib (6 mg) administrado por vía intraarterial en la arteria hepática. Se sacrificaron cuatro animales (grupo 1) 6 horas tras la embolización y se sacrificaron 4 animales (grupo 2) 24 horas tras la embolización. El tercer grupo (grupo 3, n=4) recibió sunitinib por vía oral en una única dosis de 6 mg, que debía producir una concentración plasmática terapéutica (C_{max}) de 45-55 ng/ml según estudios farmacológicos previos (*FDA drug online Sunitinib p78*). Se sacrificaron dos animales en el grupo 3 a las 6 horas y 2 a las 24 horas.

Dosificación de enzimas hepáticas tras la administración.

Se midieron las enzimas hepáticas a partir de muestras de sangre obtenidas mediante un catéter colocado en la vena de la oreja del conejo, inmediatamente antes de la embolización o la administración oral del fármaco y a las 6 horas. Se obtuvo una muestra de sangre adicional a las 24 horas para el grupo 2 y se sacrificaron esos animales a las 24 horas en el grupo 3.

Dosificación de sunitinib tras la administración.

Se midieron los niveles plasmáticos de sunitinib inmediatamente antes y tras el final del procedimiento de embolización así como a las 1, 2, 3, 4, 5, 6 horas tras la administración. Se obtuvo una muestra de sangre adicional a las 24 horas para el grupo 2 y se sacrificaron esos animales a las 24 horas en el grupo 3. Se extrajeron muestras de sangre completa en tubos de EDTA-K y se centrifugaron. Se protegieron las muestras de plasma frente a la luz y se almacenaron congeladas hasta el análisis mediante CL-espectrometría de masas en tándem EM/EM [16]. Se realizó la determinación de la concentración de sunitinib en el hígado usando el mismo método de espectrometría de masas tras el sacrificio de los animales en los 3 grupos.

Resultados

Este estudio se centró en la farmacocinética *in vivo* de sunitinib administrado por medio de DEB. La dosificación en serie de enzimas hepáticas permitió evaluar la posible toxicidad de esta modalidad de administración y los niveles plasmáticos de sunitinib tras el tratamiento permitieron evaluar el paso sistémico del fármaco que se espera que sea mínimo.

Evaluación de la función hepática:

La administración de sunitinib/DCBeads provocó una elevación significativa de ALT, AST compatible con citólisis como es habitual tras TACE en el hígado. No se vieron afectados los niveles plasmáticos de bilirrubina por el tratamiento permaneciendo por debajo del umbral de detección en todas las mediciones. La administración de sunitinib por vía oral no produjo ninguna alteración de las enzimas hepáticas.

Nivel plasmático de sunitinib:

Tras la administración de DCBeads + sunitinib en la arteria hepática, el sunitinib plasmático permaneció <50 ng/ml (concentración mínima prevista a partir de ensayos de base celular y química para inhibir VEGFR y PDGFR).

Nivel de sunitinib en el tejido hepático:

Se realizaron los niveles de sunitinib en el tejido hepático 6 horas (n=1) y 24 horas (n=3) tras la administración de 2 ml de DCBeads cargadas con 6 mg de sunitinib en la arteria hepática común. Se obtuvieron cuatro muestras de cada hígado para evitar diferencias debidas a la perfusión no homogénea del hígado durante la administración. Los niveles medios fueron de 3870 ng/ml a las 6 horas y de 4741,7 ng/ml a las 24 horas, lo que está bastante por encima de la concentración mínima prevista a partir de ensayos de base celular y química para inhibir VEGFR y PDGFR.

Conclusión

La administración de sunitinib por medio de DCBeads cargadas inyectadas directamente en la arteria hepática no provocó una toxicidad inesperada. La determinación de sunitinib en el tejido hepático tras el tratamiento mostró que el fármaco se eluye de manera eficaz mediante las DCBeads en los tejidos con obtención de una alta concentración en tejido hepático. Mediciones plasmáticas en serie mostraron una baja liberación (infraterapéutica) en la circulación sistémica.

Ejemplo 6: Evaluación del efecto antitumoral de perlas con elución de sunitinib en un modelo de tumor de conejo VX2

Materiales y métodos

Modelo animal.

Se usaron conejos blancos de Nueva Zelanda macho adultos (n=15) que pesaban entre 3,0 y 3,8 kg.

Protocolo experimental.

Se implantaron los tumores en el lóbulo hepático izquierdo de los conejos mediante laparotomía con anestesia general según la técnica descrita por Lee *et al* [17]. Se separaron los conejos en tres grupos: el grupo 1 (n=7) recibió DEB+sunitinib hepático por vía intraarterial, el grupo 2 (n=6) recibió DEB hepático por vía intraarterial sin fármaco y el grupo 3 (n=6) recibió una embolización simulada con agua destilada. Se realizó arteriografía hepática selectiva 2 semanas tras la implantación del tumor, con anestesia general. Se evaluaron en primer lugar la anatomía arterial, tinción, vascularidad, tamaño y ubicación del tumor mediante una arteriografía hepática común. Entonces se realizó la posterior cateterización del vaso que alimenta al tumor y se administró el tratamiento (DEB + sunitinib). Se sacrificó un animal en cada grupo a las 24 horas y los otros se mantuvieron vivos hasta el 15º día.

Preparación de DEB cargadas con sunitinib.

Se usaron las mismas DCBeads que medían entre 100-300 μ m (Biocompatibles) en este experimento. Se cargaron DCBeads con sunitinib mediante suspensión durante 2 horas en una disolución de sunitinib para conseguir una concentración de 30 mg/ml. Se prepararon pequeñas alícuotas de 0,05 ml de DCBeads que contenían 1,5 mg de sunitinib para la embolización supraselectiva del tumor.

Mediciones de enzimas hepáticas plasmáticas tras la administración.

Se midieron las enzimas hepáticas a partir de muestras de sangre obtenidas mediante un catéter colocado en la vena de la oreja del conejo, inmediatamente antes y tras la administración, y cada día hasta el 7º día. Se obtuvo una

muestra de sangre adicional en el 15º día en los animales todavía vivos.

Medición de los niveles plasmáticos de sunitinib tras la administración.

- 5 Se extrajeron muestras de sangre para determinar los niveles circulantes (es decir, “exposición sistémica”) de sunitinib. Se extrajeron muestras a partir de un catéter colocado en la vena de la oreja del conejo, inmediatamente antes y tras la administración, y cada día hasta el 7º día. Se obtuvo una muestra de sangre adicional en el 15º día en los animales todavía vivos. Se extrajeron muestras de sangre completa en tubos de EDTA-K y se centrifugaron. Se protegió el plasma frente a la luz y se almacenó congelado hasta el análisis mediante un método de CL-EM/EM validado. Se realizaron cálculos toxicocinéticos usando el enfoque no compartimental.

Evaluación anatomopatológica.

- 15 Tras el sacrificio de los animales, se recogieron los hígados. Se midieron los niveles de sunitinib en tejido tumoral mediante CL-EM/EM como en el estudio farmacocinético. Se fijó el resto del tumor en formaldehído para la preparación histopatológica. Se estimaron los porcentajes de necrosis y MVD mediante análisis histopatológico usando el método TUNEL y marcaje con CD-31. Se evaluó la fosforilación de VEGFR-2 mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western de homogeneizados de tumor como lectura indirecta de la actividad de VEGF.

20 Resultados

Este estudio tenía como objetivo confirmar la eficacia antitumoral local de sunitinib cuando se administra por vía intraarterial por medio de DEB en conejos que portan VX2.

- 25 El cateterismo de la rama arterial que riega el lóbulo lateral izquierdo del hígado y la administración del tratamiento programado fueron satisfactorios en todos los animales.

Supervivencia:

- 30 En el grupo 1, no murió ningún animal durante el seguimiento. En los grupos 2 y 3, murieron 2 y 3 animales respectivamente durante el seguimiento. En el grupo 2, murió un animal el 3º día por perforación gástrica y murió un animal el 14º día por insuficiencia respiratoria debida a metastatización pulmonar masiva. En el grupo 3, murió un animal el 3º día por perforación gástrica, uno presentó paraplejia el 7º día debida probablemente a una fractura de la columna vertebral durante la manipulación y se sacrificó por tanto y uno murió el 9º día por insuficiencia respiratoria debida a metastatización pulmonar masiva. No se observó ninguna metástasis en pulmón en la autopsia de animales en el grupo 1.

Función hepática:

- 40 En el grupo 1, la administración de sunitinib/DCBeads provocó una elevación significativa de ALT, AST que se produjo alrededor del 2º y 3º día tras el tratamiento. No se vieron afectados los niveles plasmáticos de bilirrubina. No pareció variar el nivel de PAL y LDH de manera significativa tras el tratamiento.

- 45 En el grupo 2, la administración de DCBeads sin sunitinib en la rama arterial que riega el lóbulo lateral izquierdo del provocó una elevación tanto de AST como de ALT. No se vieron afectados los niveles plasmáticos de bilirrubina. No pareció variar el nivel de PAL y LDH de manera significativa tras el tratamiento.

En el grupo 3, la administración de NaCl en la rama arterial que riega el lóbulo lateral izquierdo del hígado en el grupo 3 no provocó ningún efecto de tratamiento significativo sobre los niveles plasmáticos de enzimas hepáticas.

- 50 Niveles plasmáticos de sunitinib:

- En el grupo 1, las mediciones en serie de los niveles plasmáticos de sunitinib realizadas en el grupo 1 mostraron que se produjo un pico en la concentración inmediatamente tras la administración i.a. seguido por una disminución lenta hasta el 3º-4º día.

La concentración plasmática de sunitinib permaneció <50 ng/ml (concentración mínima prevista a partir de ensayos de base celular y química para inhibir VEGFR y PDGFR).

- 60 *Evaluación de la fosforilación de RTK mediante inmunotransferencia de tipo Western:*

En el grupo 1, hubo una ausencia evidente de fosforilación de RTK 24 horas tras la embolización con DCBeads cargadas con sunitinib. En el grupo 2, hubo un aumento de la fosforilación de RTK 24 horas tras la embolización con DCBeads insipidas. No se observó ninguna diferencia significativa 15 días tras el tratamiento.

Evaluación histopatológica del efecto antitumoral:

5 En la evaluación histopatológica se observó que la mayor parte de los tumores recogidos a los 15 días eran necróticos en una gran proporción. Fue imposible diferenciar la necrosis debida a la evolución espontánea del modelo de tumor VX2 de la necrosis inducida por el tratamiento. Sin embargo, de manera interesante no se observó ningún caso de metástasis distante en el grupo 1 tratado mediante perlas cargadas con sunitinib.

Conclusión

10 Como en el estudio anterior, la administración de sunitinib por medio de DCBeads cargadas inyectadas directamente en la rama de la arteria hepática que riega el tumor se toleró bien. Este tratamiento parare ofrecer una ventaja de supervivencia en conejos que portan VX2 y, de manera interesante, ningún animal tratado con DCBeads cargadas con sunitinib presentó metástasis distantes en la autopsia. Pudo demostrarse la inhibición de las RTK mediante inmunotransferencia de tipo Western en muestras de tumores tras la embolización con DCBeads cargadas con sunitinib ya que hubo un aumento de la actividad de RTK en tumores tratados mediante DCBeads sin sunitinib. Este
15 hallazgo respalda el concepto de que la embolización con partículas cargadas con un agente antiangiogénico podría ser útil en el tratamiento de diversos tumores hipervascularizados. Actualmente están en marcha estudios adicionales para evaluar adicionalmente el efecto antitumoral de esta combinación en modelos animales e *in vitro*.

Ejemplo 7: Viabilidad de la carga de imatinib en DCbead

20 Se solubilizó imatinib a pH 4,5 usando HCl diluido en una disolución de glucosa al 5%. Se usó el fármaco a una concentración de 0,5 mg por ml de disolución. Se suspendieron DCbead (perlas de poli(alcohol vinílico) sulfonado, 100-300 micrómetros de diámetro, 1 ml) en 5 ml de esta disolución y se dejaron en contacto durante 2 horas. Se monitorizó la elución en solución salina (NaCl al 0,9%) mediante cromatografía de líquidos de alta presión (fase
25 móvil: agua/metanol/trietilamina 64/35/1 v/v/v, pH 4,8, detección UV a 268 nm). Tras 4 horas, pudo recuperarse aproximadamente el 40% de la cantidad del fármaco presente en la disolución de carga inicial, en el medio de elución, tal como se indica mediante el área bajo los picos de HPLC, que muestran la viabilidad de cargar imatinib en las perlas de hidrogel.

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de una composición de quimioembolización para la administración de agentes antiangiogénicos caracterizado porque dicho método comprende las siguientes etapas:
 - 5 a) proporcionar perlas con elución de fármaco, seleccionadas del grupo que comprende perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato o perlas de poli(alcohol vinílico-co-acrilato de sodio) modificado con carboxilo,
 - 10 b) preparar una disolución acuosa de agente antiangiogénico, en el que dicha disolución acuosa tiene un pH de 2,5 a 5 y en el que dicho agente antiangiogénico tiene baja solubilidad en agua menor de 5 mg/ml y que está cargado positivamente,
 - c) añadir una disolución de azúcar o poliol a la disolución antiangiogénica de la etapa b)
 - 15 d) poner en contacto la disolución antiangiogénica de la etapa c) con perlas con elución de fármaco de la etapa a).
2. Método según la reivindicación 1, en el que se retira solución salina de las perlas con elución de fármaco aniónicas en la etapa a).
- 20 3. Método según las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho agente antiangiogénico se selecciona del grupo que comprende sunitinib, angiostatina K1-3, arresteno, DL- α -difluorometil-ornitina, fumagilina, genisteína, estaurosporina, ($\pm$)-talidomida, tumstatina, axitinib, bortezomib, bosutinib gefitinib, pazopanib, semaxanib, sorafenib, vandetanib, vatalanib, canertinib, dovitinib, dasatinib, erlotinib, imatinib, lapatinib, masutinib, mubitinib, lestaurtinib, pazopanib, tandutinib, vismodegib.
- 25 4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho agente antiangiogénico es sunitinib.
5. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho agente antiangiogénico es imatinib.
- 30 6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho azúcar o poliol se selecciona del grupo que comprende glucosa, sacarosa, dextrano, manitol, sorbitol o trehalosa.
- 35 7. Método según las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha disolución de azúcar es disolución de glucosa al 5%.
8. Composición de quimioembolización para la administración de agentes antiangiogénicos obtenida mediante el método según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque comprende un agente antiangiogénico y cargado en perlas con elución de fármaco aniónicas, en la que dicho agente antiangiogénico se selecciona
 - 40 del grupo que comprende sunitinib, angiostatina K1-3, arresteno, DL- α -difluorometil-ornitina, fumagilina, genisteína, estaurosporina, ($\pm$)-talidomida, tumstatina, axitinib, bortezomib, bosutinib gefitinib, pazopanib, semaxanib, sorafenib, vandetanib, vatalanib, canertinib, dovitinib, dasatinib, erlotinib, imatinib, lapatinib, masutinib, mubitinib, lestaurtinib, pazopanib, tandutinib, vismodegib, y en la que dichas perlas con elución de fármaco aniónicas se seleccionan del grupo que comprende perlas de hidrogel de poli(alcohol vinílico) modificado con sulfonato y perlas de poli(alcohol vinílico-co-acrilato de sodio) modificado con carboxilo.
 - 45
9. Composición de quimioembolización según la reivindicación 8, en la que dicho agente antiangiogénico es sunitinib.
- 50 10. Composición de quimioembolización según la reivindicación 8, en la que dicho agente antiangiogénico es imatinib.
11. Composición de quimioembolización según las reivindicaciones 8 a 10 para su uso en el método para tratar cánceres de tumores sólidos.
- 55 12. Composición de quimioembolización según la reivindicación 11, en la que dichos cánceres de tumores sólidos son tumores malignos hipervascularizados.
13. Composición de quimioembolización según la reivindicación 12, en la que dichos tumores malignos hipervascularizados se seleccionan del grupo que comprende carcinoma hepatocelular (HCC), metástasis
 - 60 en hígado, colangiomas, tumores neuroendocrinos, metástasis de GIST en hígado y cáncer renal.

Figura 1

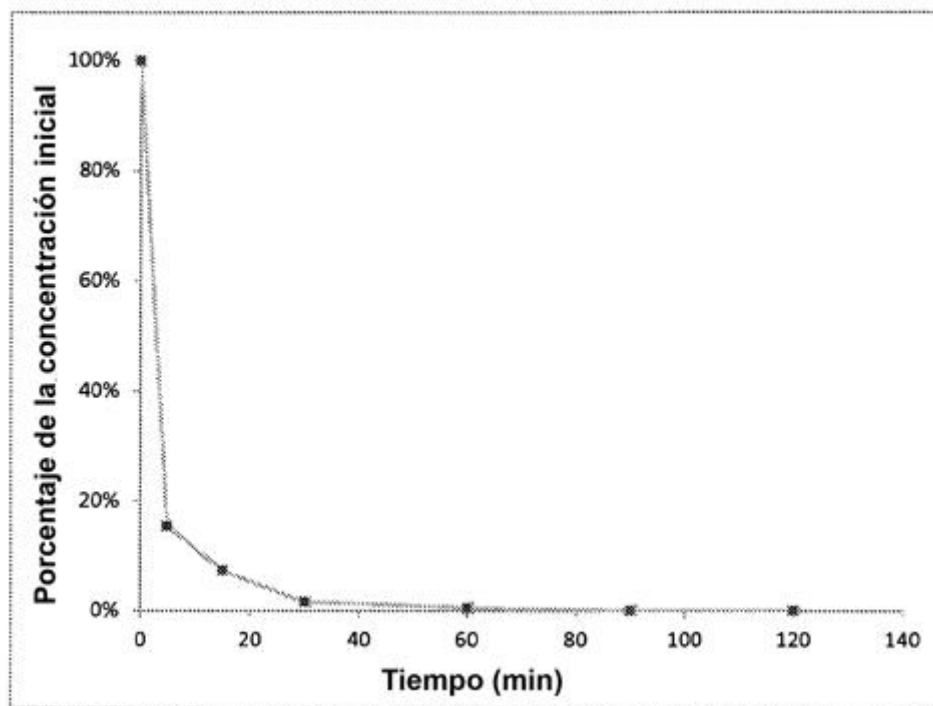


Figura 2

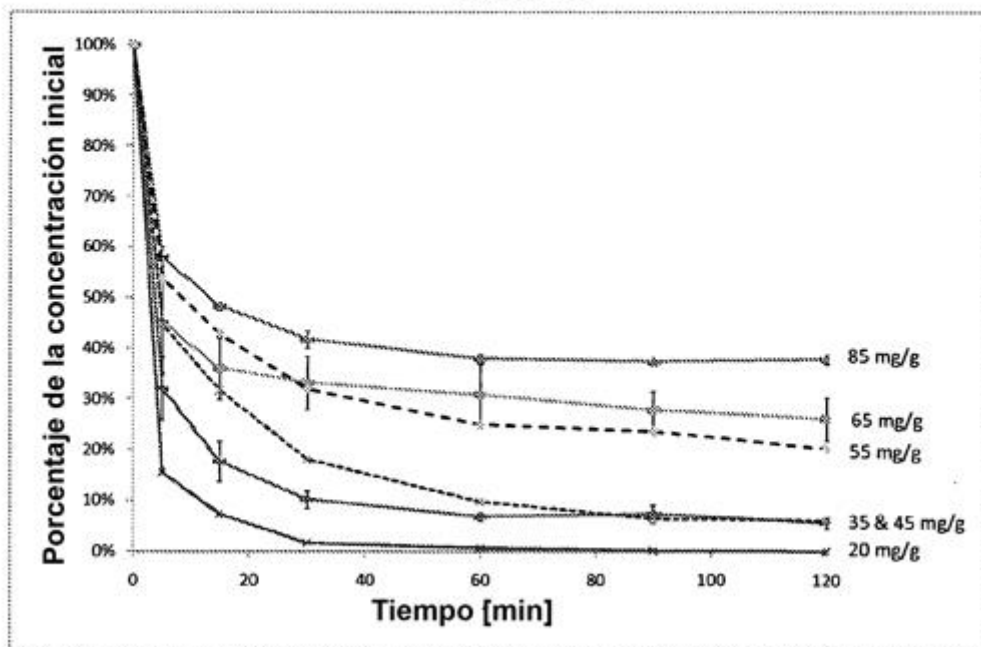


Figura 3

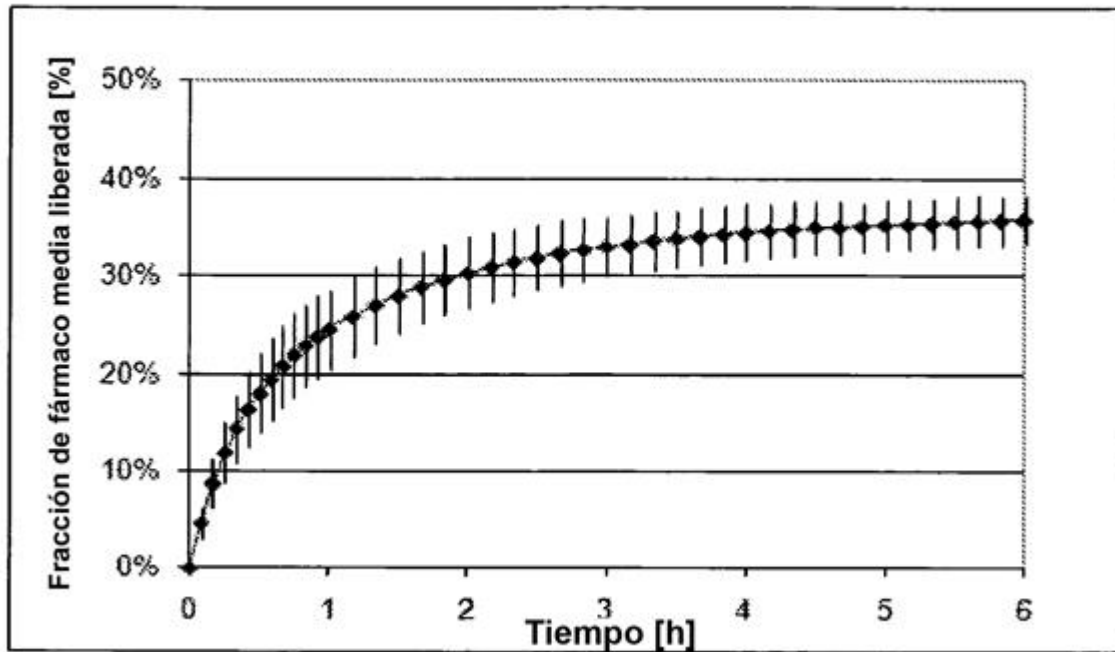


Figura 4

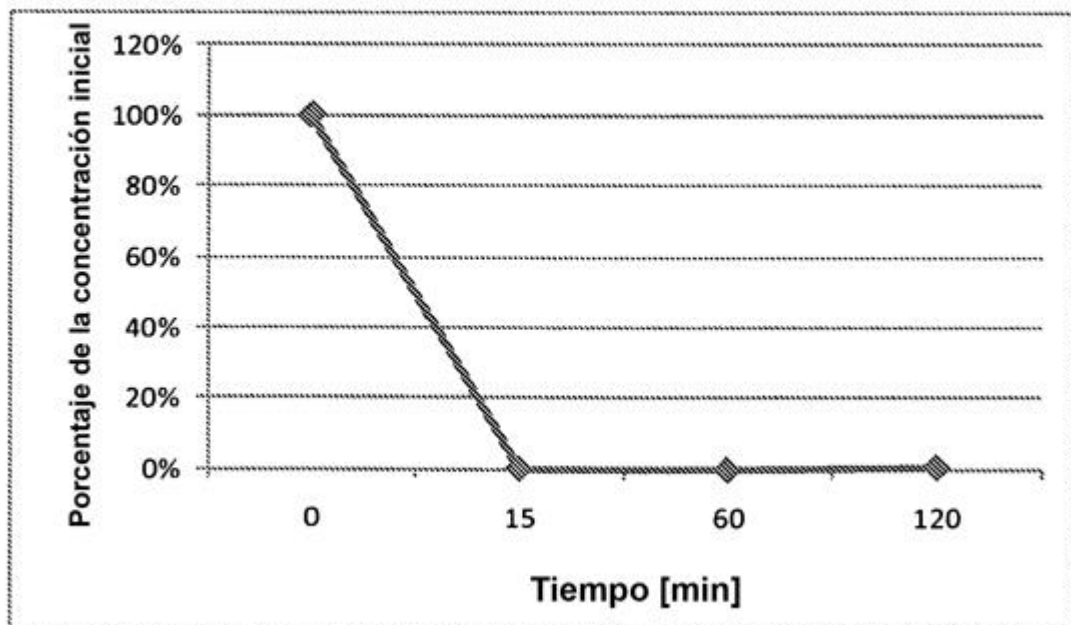


Figura 5

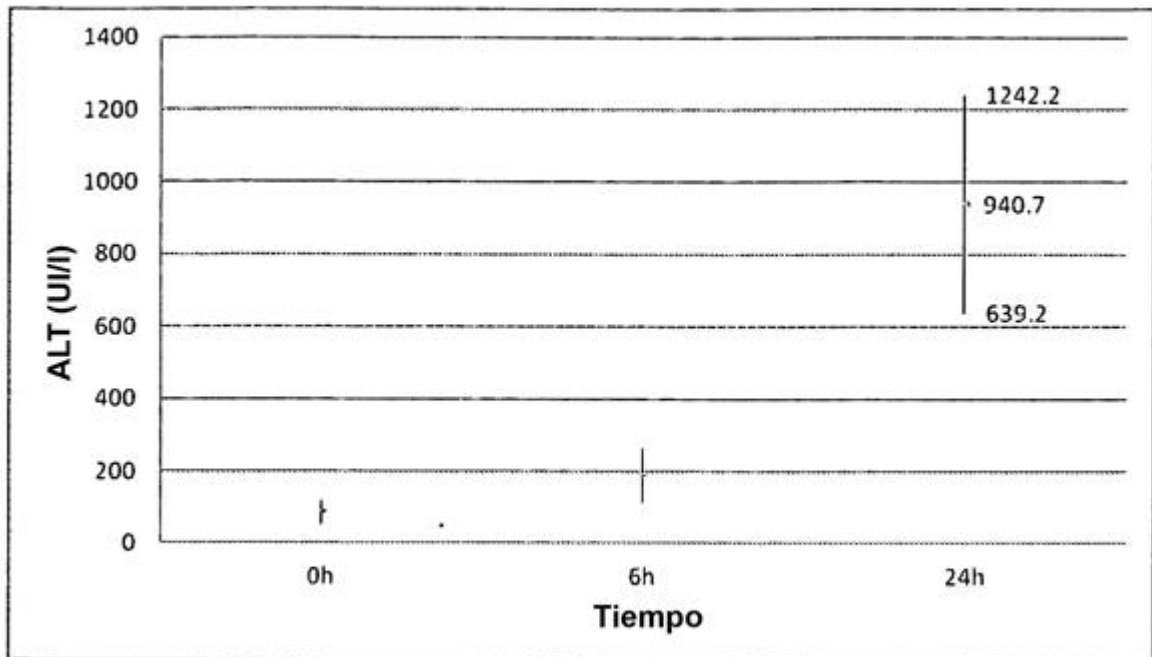


Figura 6

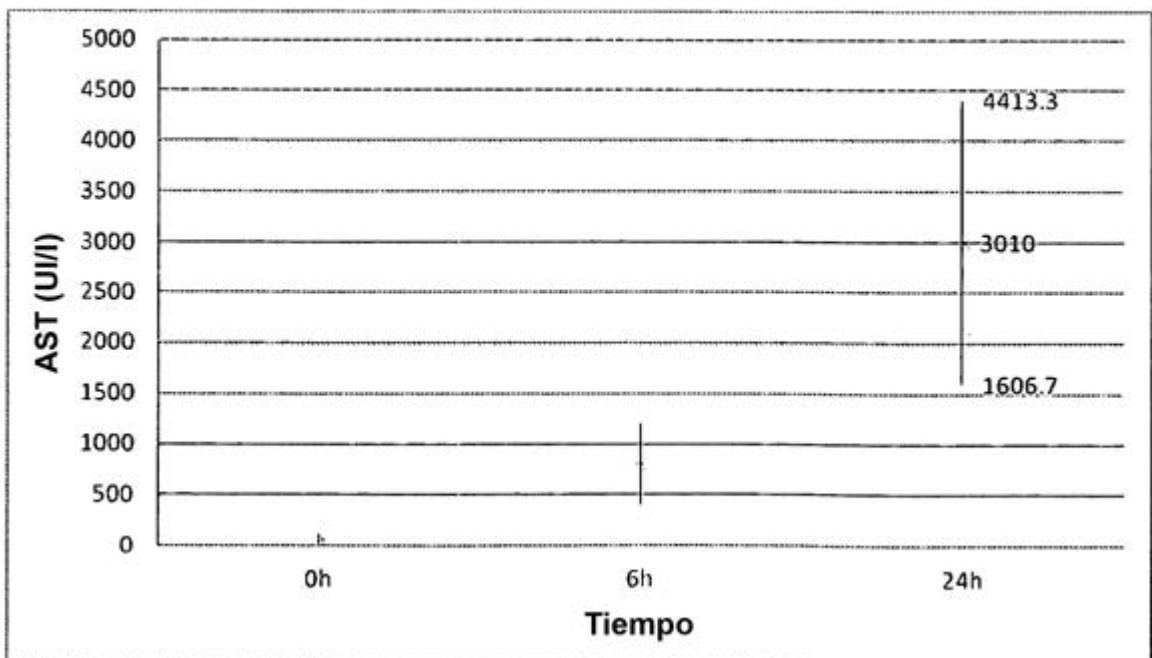


Figura 7

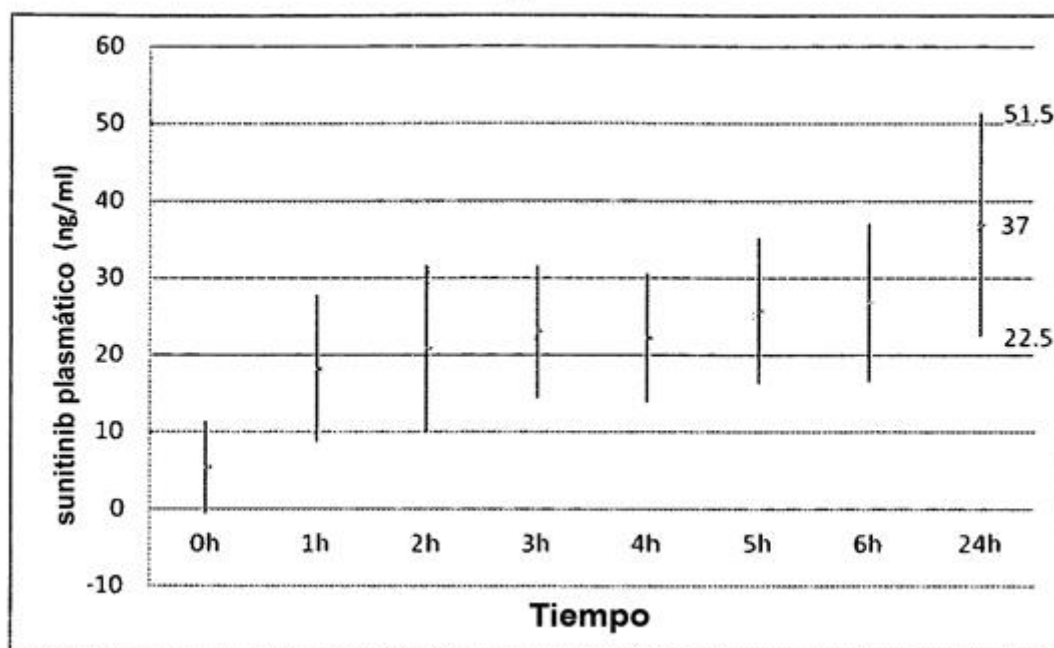


Figura 8

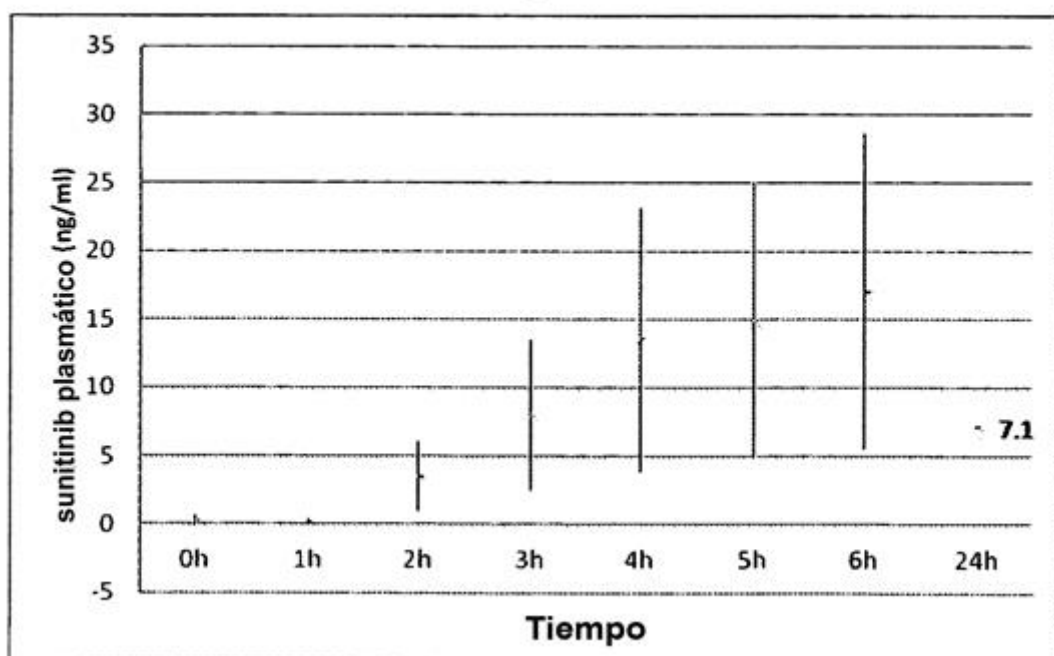


Figura 9

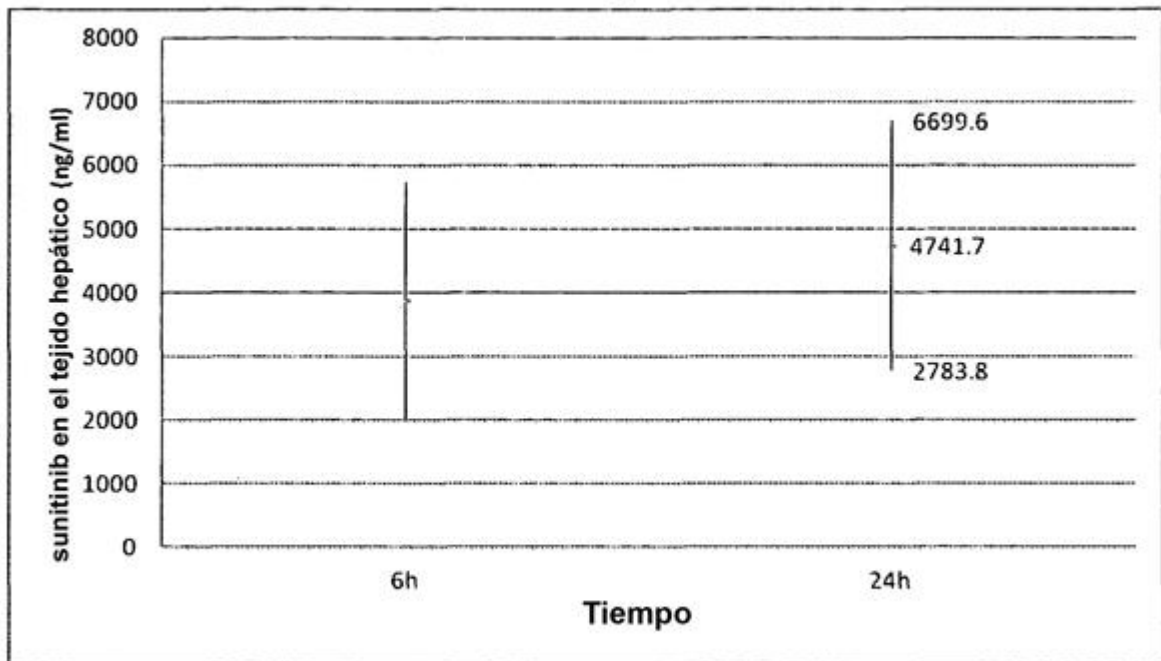


Figura 10

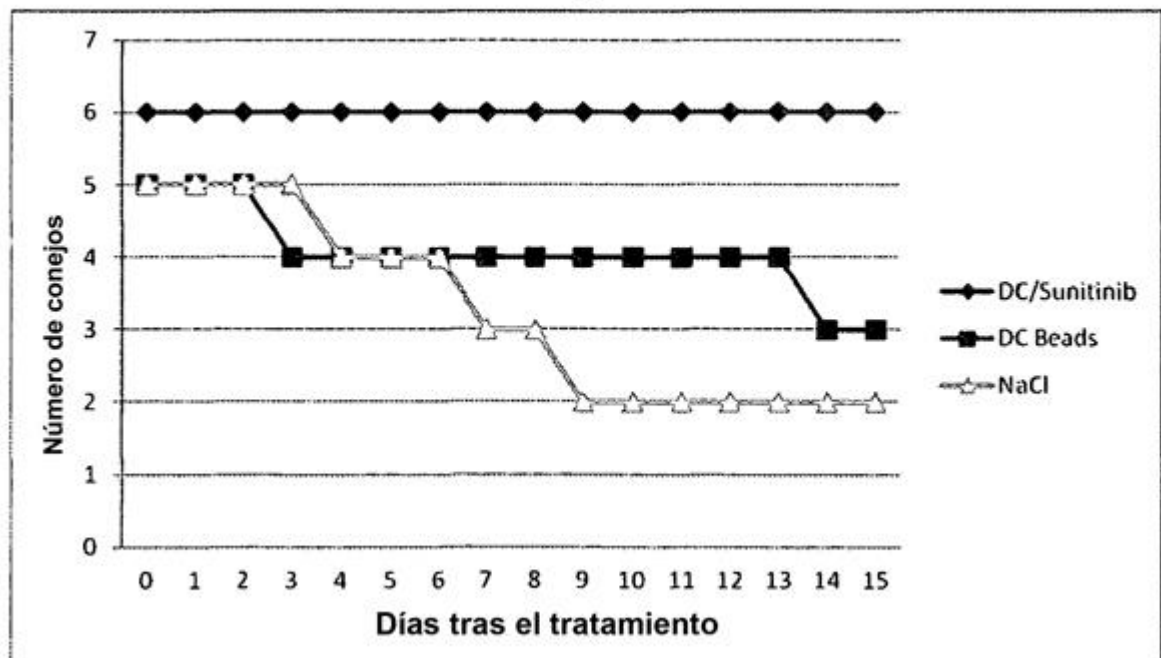


Figura 11

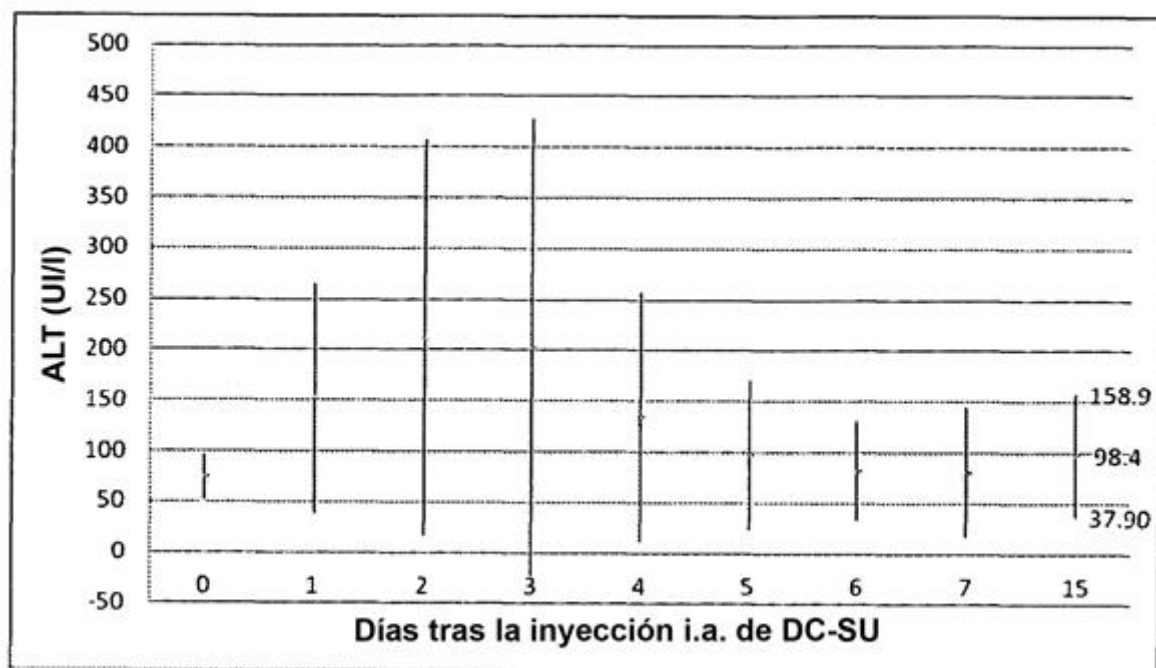


Figura 12

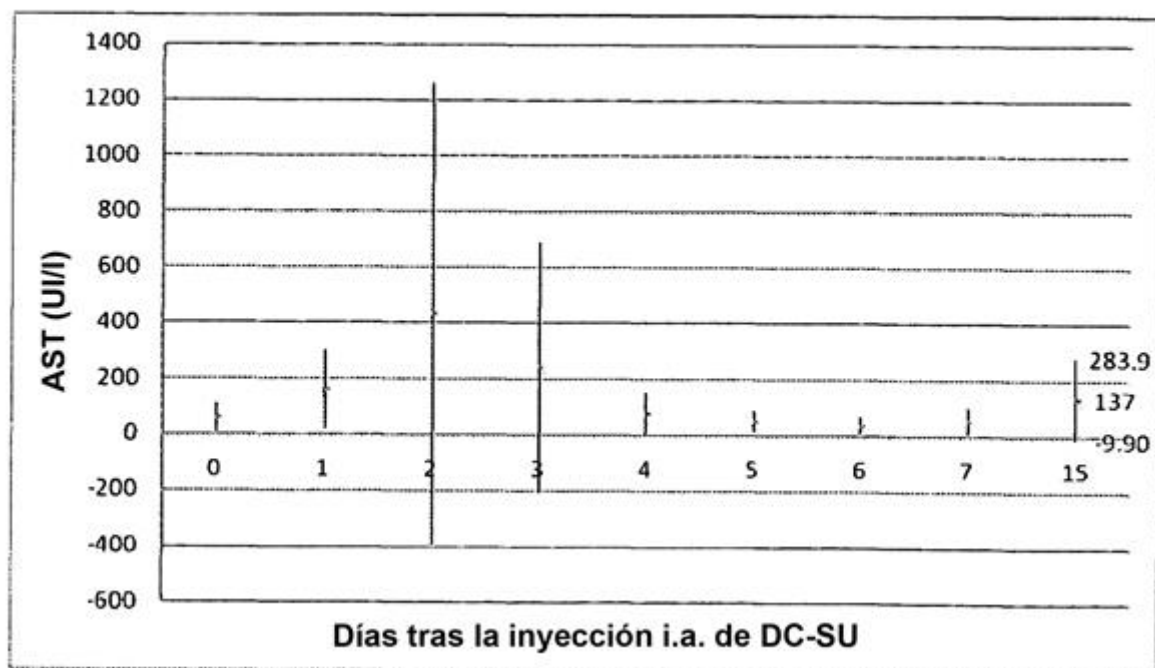


Figura 13

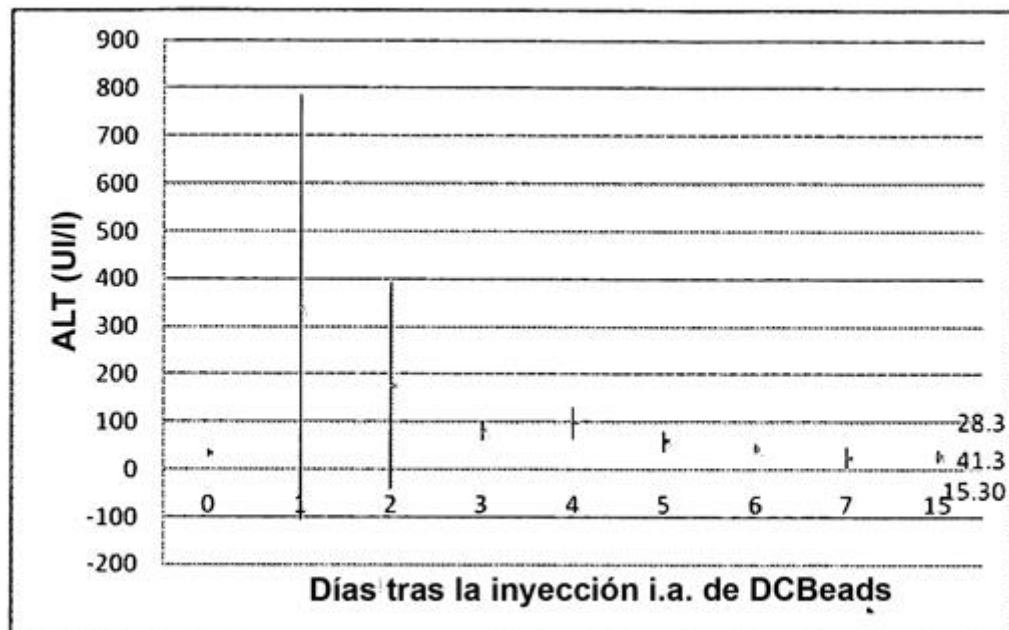


Figura 14

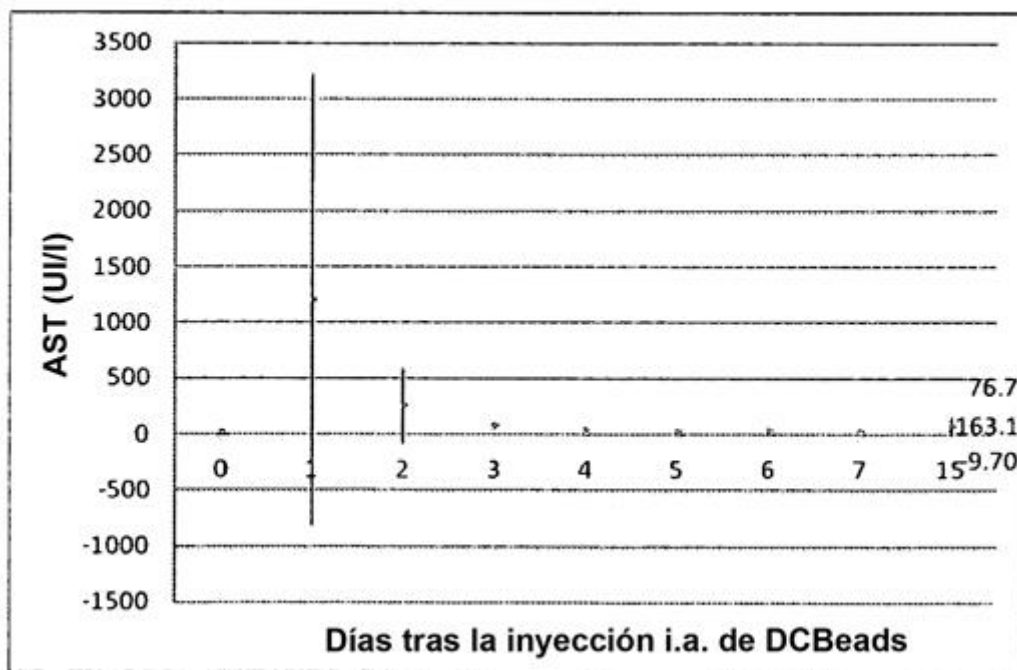


Figura 15

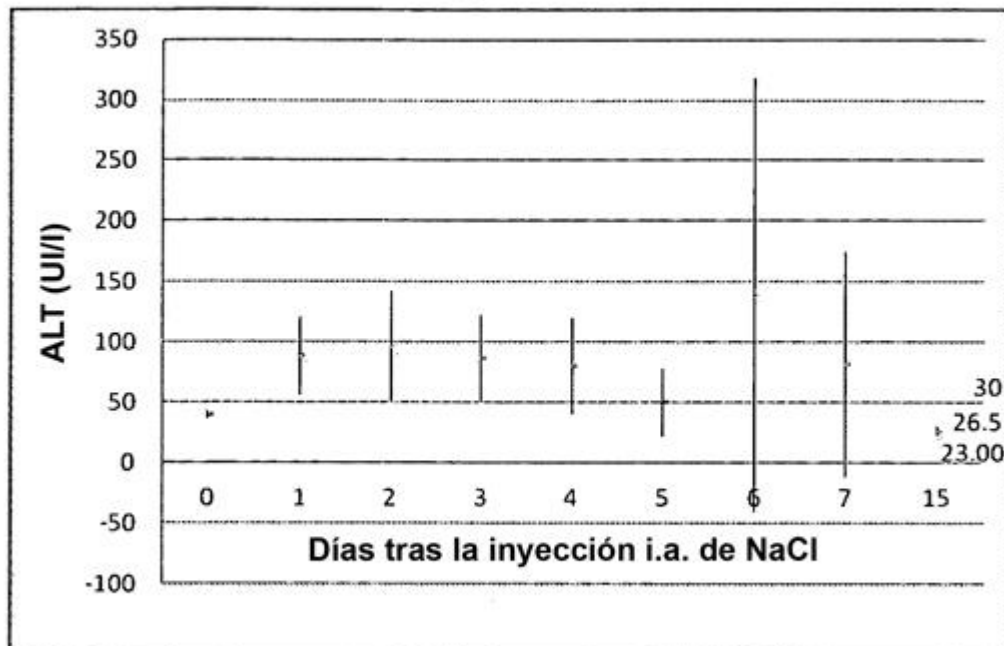


Figura 16

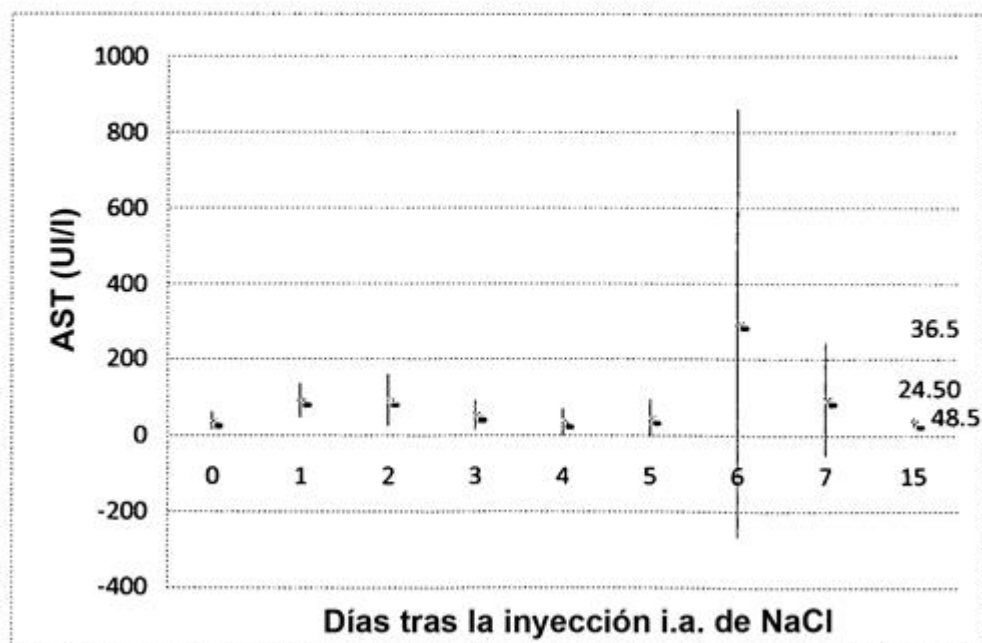


Figura 17

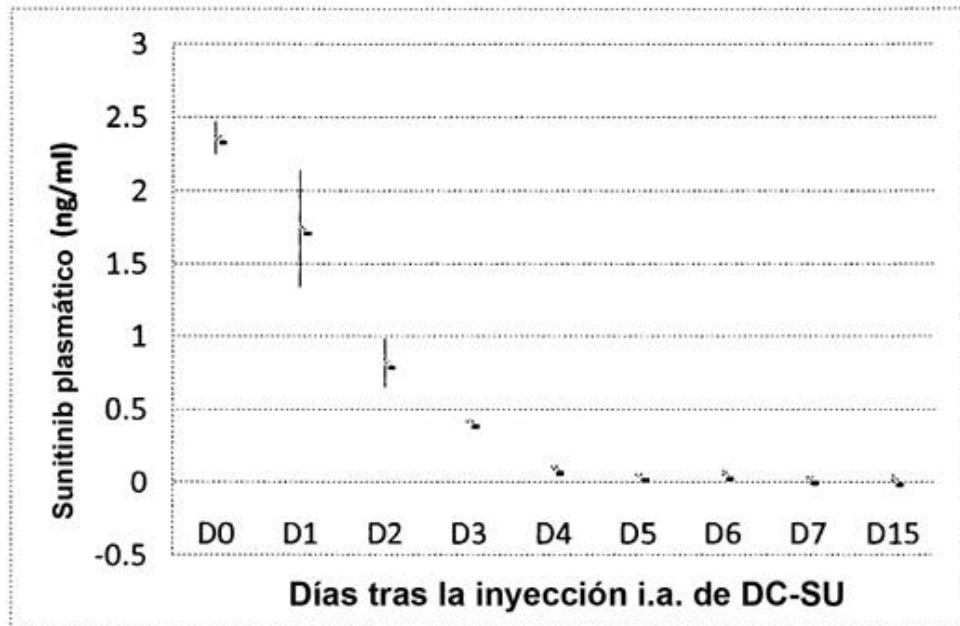


Figura 18

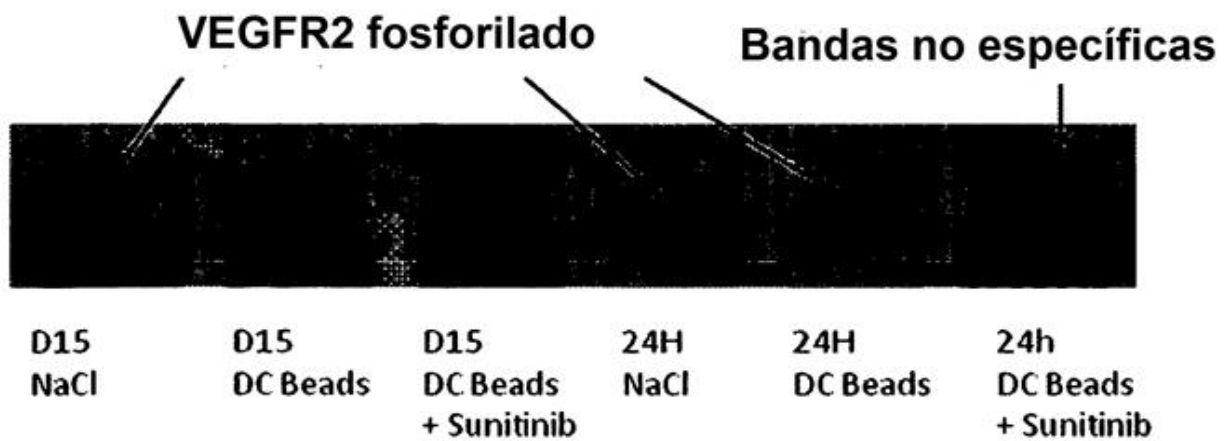


Figura 19

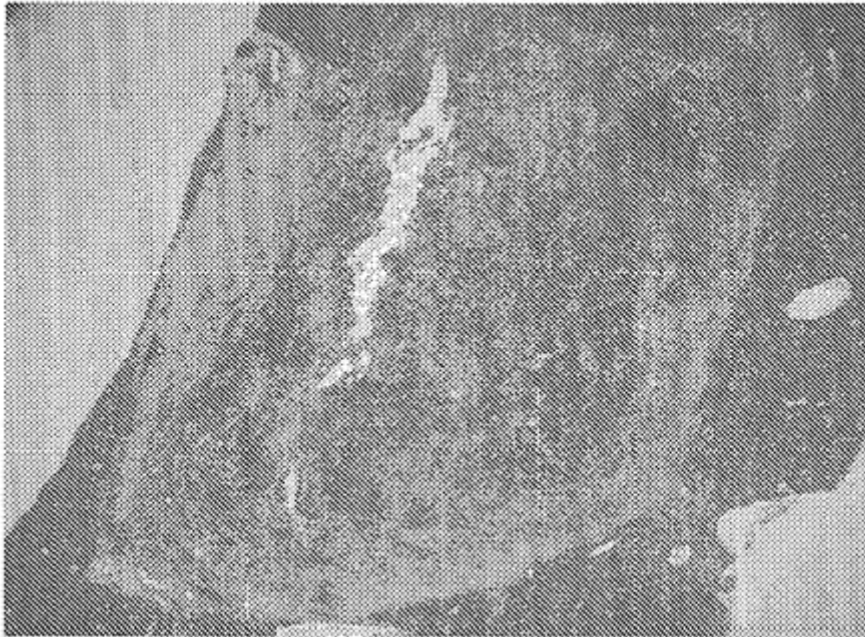


Figura 20

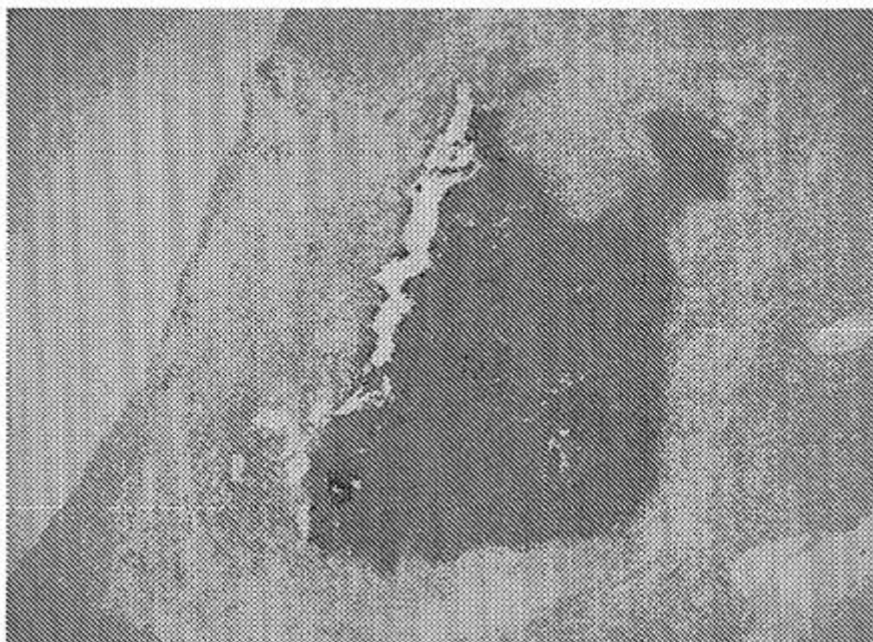


Figura 21

