(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 547 326**

(51) Int. CI.:

C08B 11/12 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C08G 65/332 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
C08B 3/06 (2006.01)
C08B 13/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2012 E 12742731 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2670780**

(54) Título: **Nanopartículas basadas en celulosa para suministro de fármacos**

(30) Prioridad:

02.02.2011 US 201161438842 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.10.2015

(73) Titular/es:

ONTARIO INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH (100.0%)
MaRS Centre, South Tower, Suite 500, 101 College Street
Toronto, Ontario M5G 1L7, CA

(72) Inventor/es:

LI, SHYH-DAR;
ERNSTING, MARK JOHN y
TANG, WEI-LUN

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Nanopartículas basadas en celulosa para suministro de fármacos

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las nanopartículas y, más específicamente, a nanopartículas basadas en celulosa para el suministro de fármacos.

Antecedentes de la invención

En el campo del suministro de fármacos controlado, el uso de polímeros para mejorar la solubilidad, farmacocinética (PK), farmacodinámica (PD), biodisponibilidad, eficacia, y disminución de la toxicidad sistémica se define ampliamente como terapéutica polimérica[1-2]. El modelo generalizado de la terapéutica polimérica se atribuye a Ringsdorf[3], un modelo que propuso en 1975, en el que se modifica la arquitectura de un polímero mediante solubilizantes, fármacos, y ligandos de fijación de diana a una enfermedad para disolver de forma más eficaz fármacos hidrófobos y suministrarlos de una manera dirigida.

Un fundamento de la terapéutica polimérica se sustenta alrededor de la observación de que las macromoléculas solubles con pesos moleculares (Pm) superiores a 30-40 kDa circulan durante más tiempo en la corriente sanguínea, debido a una reducción de la filtración glomerular y el aclaramiento renal[4-6]. En 1986, Matsumura y Maeda introdujeron su observación de que la vasculatura de un tumor es altamente permeable, y que se podrían acumular selectivamente polímeros o partículas de Pm mayores en estos tejidos como resultado[7]. Se descubrió que los vasos sanguíneos incipientes de los tejidos malignos contienen huecos a través de los cuales se pueden extravasar las partículas[8-9] y, además, que el drenaje linfático en los tumores está habitualmente ausente: las partículas pueden entrar fácilmente pero no salir del compartimento tumoral[10-11]. Por lo general, las partículas de tamaño inferior a 150-400 nm migran eficazmente mediante el efecto de permeabilidad mejorada y retención (EPR), aunque las partículas tienen preferentemente un tamaño menor de 200 nm[12]. El descubrimiento del efecto EPR proporcionó un impulso considerable para desarrollar la terapéutica polimérica, y en particular dio lugar a la nanomedicina, donde estructuras multimoleculares que comprenden liposomas[13-15], micelas poliméricas[16-18], polimerosomas[19-21], y dendrímeros[22-24] podrían suministrar fármacos de forma eficaz a través de este efecto pasivo de fijación de diana[25].

Un fundamento importante para el desarrollo de las nanopartículas fue la protección de los fármacos del metabolismo mediante la minimización de la interacción del fármaco con los procesos metabólicos (mejora del perfil PD)[26]. Sin embargo, en términos de PK, las propias partículas se pueden opsonizar y eliminar en el RES (médula ósea, hígado, y bazo), reduciendo la eficacia de estos sistemas de suministro[13,27]. Una solución para el problema de la eliminación en el RES fue la pegilación: las cadenas de PEG conjugadas a un polímero o nanopartícula evitan la interacción de las opsoninas con la química subyacente mediante impedimento estérico y reducción de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, minimizando el reconocimiento y la eliminación de la partícula en el RES[28-30]. La pegilación se convirtió en un elemento habitual en la terapéutica polimérica y la nanomedicina[13,31].

Además de añadir propiedades de ocultación, las partículas se pueden funcionalizar con ligandos de fijación de diana para estimular la internalización celular de las nanopartículas en tejidos específicos que sobreexpresan receptores específicos, tales como folato[32], RGD[33] y HER2[34]. Aunque los investigadores han invertido mucho en estos estudios, se ha conseguido un éxito limitado con la fijación de diana específica en los productos de suministro de fármacos, ya que la acumulación de nanopartículas en los tumores está gobernada principalmente por el efecto EPR[35]. Se ha documentado que los ligandos de fijación de diana pueden aumentar la eliminación sanguínea de las partículas[36-37], y que las partículas internalizadas mediante el reconocimiento de receptor quedan atrapadas en los orgánulos endosoma/lisosoma y el fármaco a menudo se degrada[38]. Ha tenido más éxito desde el punto de vista práctico la incorporación de agentes de contraste de formación de imágenes en las nanopartículas para permitir la visualización en tiempo real de la distribución de las partículas (y los fármacos) en la fisiología, permitiendo una medida de la distribución sensible no destructiva, y dando lugar al campo de la medicina personalizada y la teranóstica[39-40]. Por ejemplo, las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION) se acumularán selectivamente en los tumores mediante el efecto EPR, y proporcionarán contraste MRI[41]. Se pueden cargar liposomas y micelas poliméricas con compuestos de gadolinio que, al igual que las SPION, proporcionan contraste MRI[42]. Los polímeros también se pueden marcar con trazadores tales como ^{111}indio para análisis microSPECT[43], o con colorantes tales como Cy5.5 para formación de imágenes por fluorescencia[44].

Dentro de la clase de las micelas de polímero, se han cargado fármacos hidrófobos tales como paclitaxel (PTX) no covalentemente en el núcleo de polímeros formadores de micelas. A destacar dentro de este campo son las micelas de PEG-PLA (Genexol, en la actualidad en ensayos clínicos en Fase II)[45], y NK105, una formulación de PEG-ácido aspártico[45]. Las formulaciones de micelas Genexol y NK105 PTX mejoran con respecto a la administración de PTX solo, mediante la reducción de la toxicidad de la formulación a través de la eliminación del vehículo de suministro de PTX basado en Cremophor que produce problemas de hipersensibilidad en pacientes humanos. En comparación con Genexol y NK105, Opaxio (también conocido como Xyotax y Polyglumex) es un polímero de ácido poliglutámico conjugado a PTX. Opaxio está en ensayos clínicos en Fase III y, hasta la fecha, representa un candidato prometedor para aprobación. Cuando se examinan los datos de PK para PTX (fármaco libre), NK105 (micela), Genexol (micela),

y Opaxio (conjugado), las semividas fueron 13,3, 10,6, 11,4, y 120 horas respectivamente, para dosis de 210, 150, 300, y 233 mg/m^2 [16]. Los perfiles de PK de las formulaciones de NK105 y Genexol no covalentes fueron casi idénticos que los de PTX libre, mientras que el conjugado de polímero Opaxio fue el único modo mediante el que se pudo mejorar básicamente la PK. Los fármacos hidrófobos tales como PTX y docetaxel (DTX) se repartirán desde las micelas a las proteínas plasmáticas que incluyen albúmina y alfa-1-glicoproteína ácida, reduciendo rápidamente el contenido de fármaco de la nanopartícula[46]. Por lo tanto, es probable que las mejoras dramáticas en la PK y la eficacia se observen solo en los conjugados de polímero.

En la actualidad, los conjugados de polímero más avanzados (aquellos en ensayos clínicos o aprobados) se formulan alrededor de albúmina (Abraxane), HPMA (hidroxipropil metacrilamida), PEG, ácido poliglutámico, con unos pocos ejemplos más seleccionados[1,47]. Esta no es una lista larga de composiciones de polímero a pesar de más de 30 años de investigación, y la selección limitada refleja el coste y las complicaciones implicadas en sintetizar e identificar biomateriales biocompatibles. Se puede producir el fracaso de un polímero candidato mediante una amplia diversidad de formas, incluyendo respuesta a cuerpo extraño[48], toxicidad[49], o inestabilidad en el entorno biológico de enzimas hidrolíticas y procesos inflamatorios[50]. Los enfoques de nanopartículas pueden minimizar estas complicaciones, ya que se pueden diseñar conjugados de polímero que se autoensamblen en estructuras que presentan una química de PEG (u otras entidades de ocultación adecuadas) al entorno biológico, y minimizan el reconocimiento biológico o la interacción con el núcleo del polímero y la carga de fármaco [27].

Ciertas clases de polisacáridos están aprobados como excipientes para administración de fármacos oral, transcutánea, y parenteral[51], pero en lo que se refiere al campo de polímeros sintéticos, se ha realizado un trabajo comparativamente menor con estos polisacáridos biocompatibles en el campo actual de suministro de fármacos con nanopartículas, y la mayor parte del trabajo se centra en materiales basados en quitosano[52-55]. Cera y colaboradores conjugaron doxorrubicina (DOX) y daunomicina a carboximetilcelulosa (CMC) y ácido hialurónico (HA), e informaron que estos compuestos eran tóxicos por las células *in vitro*, pero con menor potencia en comparación con el fármaco libre. Además, el grado de sustitución de grupos ácidos de la CMC con la doxorrubicina fue bajo (9 %), y este grupo no continuó con los informes sobre la eficacia in vivo[56]. Uglea *et al.* conjugaron benzocaína a CMC y CMC oxidada, y sometieron a ensayo los efectos de estos polímeros en tumores de sarcoma *s.c.* en modelos de rata, y llevaron a cabo los ensayos de eficacia *in vitro* e *in vivo*[58]. Se implantaron en los ratones xenoinjertos de carcinoma de ovario en la cavidad peritoneal, y se trataron con una inyección intraperitoneal de 200 mg/kg de PTX-HA, un tratamiento que curó de forma eficaz a los ratones y se toleró bien. No hubo ningún informe con respecto a la actividad de este compuesto frente a otros tumores sólidos. Inoue *et al.* informaron sobre un análogo de camptotecina (DX-8591) conjugada a un carboximetildextrano a través de un espaciador peptídico, que demostró una potente acción frente a tumores en modelos de ratón, y se ha sometido a ensayo en 27 pacientes en un ensayo clínico en Fase I experimentando 1 paciente la remisión completa, 1 paciente una remisión parcial, y 14 pacientes la estabilización de la enfermedad[59-60]. En resumen, aunque la clase de polímeros se conoce bien, los usos con éxito de carboximetilcelulosa para tecnologías de nanopartículas son bastante limitados.

Una fracción considerable de las moléculas pequeñas terapéuticas es hidrofóbica[61], y hacer que estas sean solubles en agua es, como se ha indicado, el fundamento principal detrás del desarrollo de la terapéutica polimérica. En particular, los taxanos han recibido una atención especial, dado que PTX y DTX tienen una cuota considerable del mercado farmacéutico, y se formulan en la actualidad con Cremophor EL-P/etanol/solución salina[62] y Tween80/etanol/solución salina, respectivamente, cada uno de los cuales causar reacciones de hipersensibilidad, requiriendo medicación previa los pacientes que se van a tratar con PTX o DTX[63-64]. Abraxane (albúmina-PTX) y Opaxio (ácido poliglutámico-PTX) representan los conjugados de PTX más avanzados hasta la fecha, habiéndose aprobado Abraxane para uso de Estados Unidos, y estando Opaxio en ensayos clínicos en Fase III para cáncer de pulmón no microcítico[47]. Sin embargo, DTX está reemplazando a PTX en las aplicaciones clínicas debido a su acción mejorada[65], y los informes de los conjugados de DTX indican que DTX se puede suministrar de forma más eficaz y segura como conjugado de polímero[66-68].

Compendio de la invención

En un aspecto, se proporciona un compuesto que comprende carboximetilcelulosa acetilada (CMC-Ac) unida covalentemente a: al menos un poli(etilenglicol) (PEG), y al menos un fármaco hidrófobo.

En otro aspecto, se proporciona una composición de nanopartículas de autoensamblado que comprende el compuesto descrito en la presente memoria. Preferentemente, la composición tiene una concentración micelar crítica (cmc) de aproximadamente 0,1 mg/ml.

En un aspecto adicional se proporciona una composición farmacéutica que comprende la composición de nanopartículas de autoensamblado descrita en la presente memoria y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para proporcionar suministro de liberación sostenida de un fármaco hidrófobo a un paciente con necesidad del mismo que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de la composición de nanopartículas de autoensamblado que se describe.

En un aspecto adicional, se proporciona un método de tratamiento de cáncer a un paciente con necesidad del mismo, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una composición de nanopartículas de autoensamblado que comprende el compuesto descrito la presente memoria. Preferentemente, el cáncer se selecciona entre cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer metastásico, y cáncer pancreático.

En un aspecto adicional, se proporciona un proceso para preparar una composición de nanopartículas de autoensamblado que comprende:

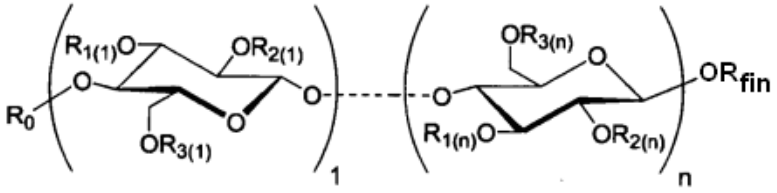
a) unir covalentemente al menos un PEG y al menos un fármaco hidrófobo a un CMC-Ac;

b) aislar el producto de la etapa (a);

c) disolver el producto aislado de la etapa (b) en un disolvente orgánico adecuado, preferentemente DMF o DMSO y más preferentemente THF o acetonitrilo, para formar una solución;

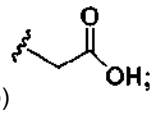
d) añadir la solución de la etapa (c) gota a gota a una solución acuosa en condiciones adecuadas para formar la composición de nanopartículas de autoensamblado.

En un aspecto adicional, se proporciona un compuesto representado por la fórmula:

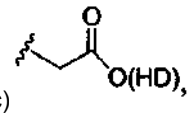


en la que R_0, $R_{1(1)}...R_{1(n)}$, $R_{2(1)}...R_{2(n)}$, $R_{3(1)}...R_{3(n)}$, y R_{fin} se seleccionan cada uno independientemente entre:

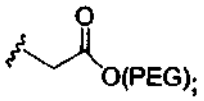
(a) acetilo;



(b)



(c) en la que -O(HD) representa un fármaco hidrófobo que tiene un punto de unión a través de un grupo hidroxilo; o



(d) y

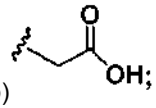
n es un número entero > 94.

Breve descripción de las figuras

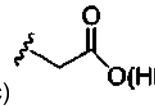
Las realizaciones de la invención se pueden entender mejor por referencia a la siguiente descripción y a las figuras acompañantes. En las figuras:

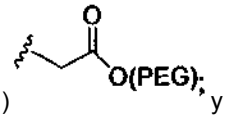
La **Figura 1** muestra un esquema de un conjugado de polímero de acuerdo con un aspecto, en el que R_0, $R_{1(1)}...R_{1(n)}$, $R_{2(1)}...R_{2(n)}$, $R_{3(1)}...R_{3(n)}$, y R_{fin} se seleccionan cada uno independientemente entre:

(a) acetilo;



(b)

(c)  en la que -O(HD) representa un fármaco hidrófobo que tiene un punto de unión a través de un grupo hidroxilo; o

(d)  y

n es un número entero > 94.

La **Figura 2** muestra el RMN ^1H de Cellax y Componentes. A: espectros de DTX, carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na), CMC acetilada, y el producto Cellax. B: DTX con el esquema de numeración de carbonos.

La **Figura 3** muestra (A) el análisis de las señales T1 y T2 para Cellax-SPION *in vitro*. Análisis por MRI de ratones que portan tumores EMT-6 en el costado, y se tratan con Cellax-SPION (10 mg de Fe/kg, 133 mg/kg de DTX). (B) Inyección previa al barrido T2*, (C) inyección previa al barrido T2, (D) inyección 3 horas posterior al barrido T2*, (E) inyección 3 horas posterior al barrido T2. El volumen del tumor se puede diferenciar de los tejidos circundantes en los barridos de fondo, y el desarrollo considerable de contraste MR debido al artefacto de susceptibilidad a SPION. (F): cálculo de las fracciones de volumen hipointenso mediante análisis de imagen MIPAV, en el que se definen los vóxeles hipointensos como los que tienen una intensidad inferior a 5 SD desviaciones estándar de la intensidad media del músculo circundante.

La **Figura 4** muestra la liberación de DTX de partículas de Cellax en solución salina que contiene FBS (50 % en volumen). Las partículas se incubaron a 37 ºC en una atmósfera de un 5 % de CO_2. En los puntos temporales seleccionados, las muestras se extrajeron y se analizaron mediante HPLC. Se detectaron dos picos: DTX y 7-epidocetaxol. En el gráfico, taxanos totales se refiere a la liberación combinada de DTX y el isómero, e indica cuando se ha alcanzado la liberación completa.

La **Figura 5** muestra el análisis de CI_{50} de toxicidad de DTX. A: EMT-6 B: LL/2. Las células se cultivaron en poliestireno de cultivo celular (1000 células/pocillo) durante 1 día, seguido de la adición de medio que contenía DTX, Cellax, o controles de polímero exentos de fármaco. Los controles de polímero en cada concentración seleccionada de DTX se igualan a la muestra de Cellax mediante la concentración en peso (mg/ml). Para el tratamiento metronómico de DTX libre, la dosis se administró en cuatro partes durante dos días. Los cultivos se mantuvieron durante 2-3 días, hasta que las células de control sin tratamiento se aproximaron a la confluencia. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo XTT, restándose la señal de fondo sin células. Se calcularon las curvas de CI_{50} en GraphPad Pro. Cada grupo tuvo n = 9, y las barras de error son ± desviación estándar.

La **Figura 6** muestra el análisis del ensayo de toxicidad (dosis máxima tolerada) de DTX y Cellax en ratones Balb/c. Se inyectaron ratones sanos exentos de tumores con DTX (en un vehículo de Tween80/etanol/solución salina 20:13:67) o Cellax (0,9 % en solución salina). Se midió el peso corporal de forma regular, y la dosis tóxica limitante se estableció en < 5 % de pérdida de peso corporal. Cellax alcanza una concentración máxima de 15 mg/ml de DTX (170 mg/kg), de modo que no se conoce una verdadera MTD.

La **Figura 7** muestra la eficacia de los tratamientos de DTX y Cellax en ratones que portan tumores singenéicos en el costado. DTX se formuló en Tween80/etanol/solución salina, y Cellax se formuló en un 0,9 % de solución salina. Los ratones de control se trataron con solución salina. (A) Estudio de eficacia con ratones Balb/c y modelo de costado EMT-6 con dosificación de 40 mg/kg de DTX (B) Estudio de eficacia con ratones C57/BL6 y modelo de costado LL/2 con dosificación de 40 y 170 mg/kg de DTX. # $p < 0,001$, * $p < 0,05$, n = 6 por grupo. Las barras de error son desviación estándar.

La **Figura 8A** muestra el análisis histológico e inmunohistológico de tumores EMT-6 en ratones Balb/c. Columna izquierda: ratones de control. Columna central: ratones tratados con DTX (40 mg/kg). Columna derecha: ratones tratados con Cellax (40 mg DTX/kg). En las secciones teñidas con H&E (40 y 400x), la evidencia de necrosis se marca con flechas, y es particularmente evidente en tumores tratados con Cellax. Tinción TUNEL (40x): la indicación de apoptosis es evidente en toda las muestras, pero es notablemente mayor en el tumor tratado con Cellax, y la morfología de las regiones teñidas es similar a las regiones necróticas en las secciones teñidas con H&E. Tinción de Ki67 (40x): las regiones de los tumores tratados con DTX y Cellax están desprovistas de sucesos de replicación celular, y estas regiones son congruentes con las imágenes de H&E y TUNEL. Tinción de CD31 (40x): la actividad de angiogénesis en los tumores tratados con DTX y especialmente en los tratados con Cellax está reducida, especialmente en las regiones ya identificadas en los análisis de H&E, TUNEL, y Ki67.

La **Figura 8B** muestra el análisis inmunohistológico del riñón y los pulmones de ratones Balb/c (que portan tumores de costado EMT-6) tratados con solución salina, DTX (40 mg/kg) y Cellax (40 mg DTX/kg). Las

imágenes tienen un aumento de 400x. Se ha de observar la presencia de tinción TUNEL positiva en los ratones tratados con DTX, y la ausencia de tinción en los ratones tratados con control y Cellax.

La **Figura 9** muestra la histología tumoral: cuantificación de tinciones (A) Tinción de hematoxilina de tumores (B) tinción TUNEL de tumores (C) Tinción de Ki67 de tumores (D) Tinción de CD31 de tumores (E) Tinción TUNEL en riñones (F) Tinción TUNEL en pulmones. • $p < 0,05$, •• $p < 0,001$, ••• $p < 0,0001$.

La **Figura 10** muestra la histología tumoral del modelo LL/2 en ratones C57/BL6: (A) tinción de H&E, (B) tinción TUNEL.

La **Figura 11** muestra (A) Pérdida de peso experimentada por ratones Balb/c inoculados con células EMT-6 mediante inyección i.v. Las barras de error representan SE, y el marcador que carece de barras de error es n = 1 (único ratón superviviente). (B) Gráfico de supervivencia (C) Secciones teñidas con H&E de pulmones de ratón tratados con control, DTX (40 mg/kg) y Cellax (40 mg DTX/kg).

La **Figura 12** muestra los patrones de supervivencia en ratones C57/BL6 inoculados con células pancreáticas murinas PAN02 ($2,5 \times 10^6$ células/inyección).

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos que proporcionan una comprensión exhaustiva de la invención. Sin embargo, se ha de entender que la invención se puede poner en práctica sin estos detalles específicos.

Basándose en los estudios de conjugados de polímero desarrollados hasta la fecha, una nanopartícula polimérica funcional comprende preferentemente los siguientes atributos: (1) disuelve o transporta un fármaco hidrófobo en un entorno acuoso, (2) el fármaco está protegido del metabolismo por la partícula, (3) la partícula está protegida de la eliminación en RES por PEG u otro compuesto químico adecuado, (4) el polímero se autoensambla en una nanopartícula escalada adecuadamente debido al equilibrio entre los elementos hidrófobos e hidrófilos, (5) la partícula se acumula en el compartimento de la enfermedad fijada como diana a través de acumulación pasiva, (6) el enlace entre el fármaco y la partícula es reversible, de modo que el fármaco se puede liberar y (7) el polímero es biocompatible, y (8) la partícula contiene un agente para proporcionar contraste de formación de imágenes o detección en el sistema fisiológico. Un objetivo fue modificar por ingeniería una composición basada en celulosa para suministrar un fármaco hidrófobo, preferentemente DTX, el diseño de la cual abordaría preferentemente los elementos de diseño principales descritos anteriormente.

En un aspecto, se proporciona un compuesto que comprende una carboximetilcelulosa acetilada (CMC-Ac) unida covalentemente a: al menos un poli(etilenglicol) (PEG), y al menos un fármaco hidrófobo. En una realización, las uniones covalentes son uniones éster.

Los expertos en la materia entenderán que cada uno del fármaco hidrófobo y el PEG se pueden unir covalentemente a la CMC-Ac mediante un enlace directo entre un resto de ácido carboxílico del CMC-Ac y un grupo funcional del fármaco hidrófobo y el PEG (por ejemplo, un grupo hidroxilo), o mediante una unión directa a través de uno o más conectores difuncionales. Los conectores preferentes son los que son biodegradables y no tóxicos cuando se escinden del conjugado, y son relativamente estables a la hidrólisis en la circulación.

En una realización preferente, el fármaco hidrófobo es un agente anticancerígeno (es decir, un agente antiproliferativo, antineoplásico, o quimioterapéutico que previene o trata tumores), preferentemente uno de docetaxel, camptotecina y paclitaxel.

En algunas realizaciones, el al menos un PEG es poli(etilenglicol) metil éter (mPEG) que tiene un M_n promedio entre aproximadamente 550 y aproximadamente 10.000, preferentemente aproximadamente 2000.

En algunas realizaciones, la CMC consiste en entre aproximadamente 95 y 3600 unidades monoméricas, preferentemente aproximadamente 3500 unidades monoméricas.

En algunas realizaciones, la proporción molar de (grupos acetilo de CMC-Ac):(grupos ácido carboxílico de CMC-Ac/PEG/fármaco hidrófobo) es de aproximadamente 2,5:0,5 - 1,8:1,2, preferentemente aproximadamente 2,18 : 0,82. Preferentemente, el mPEG está presente en una cantidad de aproximadamente 3,5-22,7 % en peso, y el docetaxel está presente en una cantidad de aproximadamente 22,5-43,3 % en peso, más preferentemente, el PEG está presente en una cantidad de 4,7 - 5,3 % en peso, y el docetaxel está presente en una cantidad de aproximadamente 30,1-39,5 % en peso, y más preferentemente, el PEG está presente en una cantidad de 4,7 % en peso, y el docetaxel está presente en una cantidad de 36,9 % en peso.

En algunas realizaciones, la proporción molar de mPEG:docetaxel:(grupos ácido carboxílico de CMC-Ac) es de aproximadamente 0,9 : 13,4 : 85,7 a aproximadamente 5,4 : 26,4 : 68,2, según se estima mediante análisis por RMN ^1H, preferentemente de aproximadamente 1 : 15,1 : 83,6 a aproximadamente 1,1 : 23,7 : 75,3, más preferentemente 1 : 20,5 : 78,5.

En algunas realizaciones, el CMC-Ac está además unido covalentemente a al menos un agente de formación de imágenes, preferentemente Cy5.5.

En otro aspecto, se proporciona una composición de nanopartículas de autoensamblado que comprende el compuesto descrito en la presente memoria. Preferentemente, la composición tiene una concentración micelar crítica (cmc) de aproximadamente 0,1 mg/ml.

En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas de autoensamblado de la reivindicación 14 o 15, en la que las nanopartículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 49-278 nm y/o un intervalo completo de 16 - 396 nm.

En algunas realizaciones, la composición de nanopartículas de autoensamblado descrita en la presente memoria comprende además al menos un agente hidrófobo encapsulado en la misma, seleccionado preferentemente entre un agente de formación de imágenes o un agente terapéutico. Preferentemente, el al menos un agente de formación de imágenes es una nanopartícula de óxido de hierro superparamagnético (SPION), preferentemente entre 7-30 % en peso de SPION, y más preferentemente aproximadamente 30 % en peso de SPION.

En un aspecto adicional, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la composición de nanopartículas de autoensamblado descrita en la presente memoria y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los expertos en la materia deberían conocer los vehículos y diluyentes aceptables. Generalmente, tales vehículos deberían ser no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para proporcionar suministro de liberación sostenida de un fármaco hidrófobo a un paciente con necesidad del mismo que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de la composición de nanopartículas de autoensamblado que se ha descrito.

En un aspecto adicional, se proporciona un método de tratamiento de cáncer en un paciente con necesidad del mismo, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una composición de nanopartículas de autoensamblado que comprende el compuesto descrito en la presente memoria. Preferentemente, el cáncer se selecciona entre cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer metastásico, y cáncer pancreático.

En un aspecto adicional, se proporciona un proceso para preparar una composición de nanopartículas de autoensamblado que comprende:

e) unir covalentemente al menos un PEG y al menos un fármaco hidrófobo a una CMC-Ac;

f) aislar el producto de la etapa (a);

g) disolver el producto aislado de la etapa (b) en un disolvente orgánico adecuado, preferentemente DMF o DMSO y más preferentemente THF o acetonitrilo, para formar una solución;

h) añadir la solución de la etapa (c) gota a gota a una solución acuosa en condiciones adecuadas para formar la composición de nanopartículas de autoensamblado.

Preferentemente, las uniones covalentes son uniones éster.

Los procesos descritos en la presente memoria son generalmente útiles para preparar conjugados de CMC-Ac con cualquier PEG y cualquier fármaco hidrófobo que se funcionalice de forma apropiada para unirse a la CMC-Ac, como se describe en la presente memoria.

Los disolventes adecuados para su uso en los procesos de la presente invención incluyen los disolventes que son inertes en las condiciones de la reacción/procedimiento, describiéndose junto con las mismas.

En algunas realizaciones, dichas condiciones adecuadas de la etapa (d) comprenden mezclar vigorosamente dicha solución acuosa durante la adición gota a gota de la solución de la etapa (c).

En algunas realizaciones, la solución de la etapa (c) tiene una concentración de 10-25 mg/ml. Preferentemente, la solución de la etapa (c) tiene una concentración de 10 mg/ml.

En algunas realizaciones, la etapa (d) comprende una dilución 10 veces de la solución de la etapa (c) una vez se completa la adición a la solución acuosa.

En algunas realizaciones, la solución acuosa de la etapa (d) se selecciona entre 0,9 % de NaCl, 10 % de sacarosa, o agua.

En algunas realizaciones, el disolvente orgánico en la etapa (c) se selecciona entre acetonitrilo (CH_3CN) o tetrahidrofurano (THF), preferentemente CH_3CN.

En algunas realizaciones, la etapa (b) comprende precipitación del producto de la etapa (a) usando éter, y lavado del precipitado con agua.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además aislar la composición de nanopartículas de autoensamblado formada en la etapa (d) mediante diálisis y/o filtración.

En realizaciones preferentes, el al menos un fármaco hidrófobo es uno de docetaxel, camptotecina y paclitaxel. Preferentemente, la CMC-Ac se prepara mediante acetilación de una carboximetilcelulosa con un grado de sustitución (DS) entre aproximadamente 0,75 y aproximadamente 0,85, preferentemente aproximadamente 0,82. Más preferentemente, el al menos un PEG es poli(etilenglicol) metil éter (mPEG) que tiene un M_n promedio entre aproximadamente 550 y aproximadamente 10.000, preferentemente aproximadamente 2000.

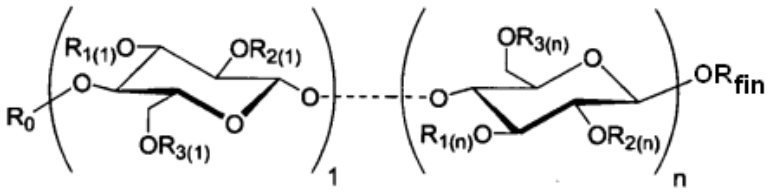
En una realización, la etapa (a) comprende proporcionar el mPEG en una cantidad de aproximadamente 30 % en moles y proporcionar el docetaxel en una cantidad de aproximadamente 40-50 % en moles, con respecto a los grupos de ácido carboxílico de dicha CMC-Ac, preferentemente aproximadamente 40 % en moles o 50 % en moles.

En algunas realizaciones, la solución de la etapa (c) comprende además al menos un agente hidrófobo encapsulado en la misma, seleccionado preferentemente entre un agente de formación de imágenes o un agente terapéutico. Preferentemente, el al menos un agente de formación de imágenes es una nanopartícula de óxido de hierro superparamagnético (SPION).

Preferentemente, el disolvente orgánico en la etapa (c) es THF.

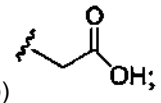
En algunas realizaciones, el al menos un agente de formación de imágenes está presente en la solución de la etapa (c) en una cantidad de aproximadamente 9-50 % en peso, basado en el peso combinado del al menos un agente de formación de imágenes y el producto aislado de la etapa (b).

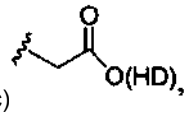
En un aspecto adicional, se proporciona un compuesto representado por la fórmula:



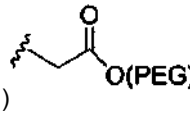
en la que R_0, $R_{1(1)}...R_{1(n)}$, $R_{2(1)}...R_{2(n)}$, $R_{3(1)}...R_{3(n)}$, y R_{fin} se seleccionan cada uno independientemente entre:

(a) acetilo;

(b) 

(c) 

en la que -O(HD) representa un fármaco hidrófobo que tiene un punto de unión a través de un grupo hidroxilo; o

(d) 

y

n es un número entero > 94.

Preferentemente, la proporción de (a):(b+c+d) es aproximadamente 2,18 : 0,82. También preferentemente, n está entre aproximadamente 95 y 3600 unidades monoméricas, preferentemente aproximadamente 3500.

Los expertos en la materia entenderán que las cantidades preferentes reales de agente activo en un caso específico variarán de acuerdo con la formulación particular y la manera de administración. La dosis específica para un individuo particular depende de la edad, peso corporal, la gravedad del trastorno particular al que se aplica la terapia, y otros factores. Las dosificaciones para un sujeto dado se pueden determinar usando consideraciones

convencionales.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de diversos aspectos de la invención, y no limitan los aspectos amplios de la invención según se desvelan en la presente memoria.

Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvo carboximetilcelulosa sódica (CEKOL 30K (DS) = 0,82) de CPKelco (Atlanta, Georgia, USA), y es un material de calidad alimentaria FDA y EU. Se adquirieron ácido acético glacial, anhídrido acético, ácido sulfúrico, acetona, acetonitrilo, poli(etilenglicol) metil éter (mPEG-OH, MN = 2000), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida HCl (EDC HCL), N-hidroxisuccinimida (NHS), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), y dietil éster en Sigma Aldrich (Oakville, ON). Se adquirió docetaxel (DTX) en LC Laboratories (Woburn, MA, USA). Se adquirieron cartuchos de diálisis Slide-a-Lyzer de 10 y 20 kDa de MWCO en Pierce Biotechnology (Rockford, IL). Se adquirieron filtros de ultracentrifugación Vivaspin de 10 kDa de MWCO en Fisher (Ottawa, ON, Canadá).

Análisis por RMN

Se disolvieron muestras en cloroformo deuterado ($CDCl_3$), óxido de deuterio (D_2O) o N,N-dimetilsulfóxido (DMSO), y se analizaron en un instrumento Bruker 500. Los espectros se procesaron usando software TOPSpin.

Análisis por HPLC, UPLC/MS, y GPC

El análisis de DTX se llevó a cabo en un sistema de HPLC que consistía en un Módulo de Separación Waters e2696, detectores 2414 RI y 2998 PDA, y estaba operado por software Empower Pro 2. Las muestras se inyectaron en una columna Agilent XDB-C18 (1,8 µm, 4,6 x 50 mm) con un programa isocrático de acetonitrilo/agua 95/5 a 0,35 ml/min. El método para el análisis y la detección de los taxanos derivó de varios artículos publicados[69-71], adaptado para la instrumentación en el laboratorio. Para el análisis de rutina, se identificaron las identidades de taxanos conocidos (docetaxel, paclitaxel, y 7-epidocetaxel) mediante un detector PDA con una longitud de onda seleccionada de 274 nm. Durante el desarrollo del método, las muestras se analizaron con un sistema de UPLC/MS Waters Acquity equipado con un detector PDA y SQ MS. En estos análisis, las muestras se inyectaron en una columna Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm), con un caudal de 0,4 ml/min, con un programa de gradiente de 95-10 % de agua/acetonitrilo durante 5 minutos. La detección de DTX (y otros productos) fue en modo ES+. Los polímeros se analizaron mediante un sistema de GPC que consistió en un Módulo de Separación Waters e2696, detectores 2414 RI y 2998 PDA, y estaba operado por software Empower Pro 2. Las muestras solubles en THF se inyectaron en columnas Waters Styragel HR5E y HR 3 (en serie) con un caudal de THF de 0,35 ml/min. Las muestras solubles en agua se analizaron usando una columna Waters Ultrahydrogel 1000 con un caudal de agua de 1 ml/min. La detección de DTX libre y PEG fue mediante PDA (274 nm) y RI, respectivamente.

Cálculo de la estequiometría para los polímeros de CMC

El polímero de CMC-Na está modificado con grupos carboximetilo, y se suministró por el fabricante con un valor de DS analizado de 0,82: cada unidad monomérica de galactosa contiene 0,82 moles de ácido carboxílico y 2,18 moles de hidroxilo. Por lo tanto, el peso molecular que cada monómero es aproximadamente: 162 g/mol (galactosa) + (59,01 g/mol (grupo ácido) x 0,82) = 210 g/mol. Estos valores de composición química se usaron para calcular la estequiometría de las reacciones llevadas a cabo en los polímeros de CMC.

Acetilación de la CMC

El método para la acetilación de la CMC se adaptó de un método informado por Namikoshi[72]. Se pesó carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na CEKOL 30K, 10 g) en un matraz de fondo redondo, y se suspendió en ácido sulfúrico al 20 % (200 ml) con agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 2 horas. La suspensión de polvo de CMC-COOH se lavó con agua hasta que el agua dio un ensayo neutro, y a continuación se lavó con 3 x 30 ml de ácido acético glacial con un volumen para asegurar la deshidratación completa de la CMC-COOH. La CMC-COOH se transfirió a un matraz de fondo redondo colocado en un baño de hielo, y se suspendió en ácido glacial (50 ml). Se añadieron anhídrido acético (30 ml) y ácido sulfúrico (1,2 ml) a la suspensión enfriada, a continuación se aumentó la temperatura a 50 ºC, y la solución se agitó vigorosamente durante tres horas, hasta que se clarificó. La solución de reacción se concentró mediante evaporación rotatoria (58 ºC, 58 mbar) y se precipitó en agua desionizada. El agua se intercambió mediante filtraciones repetidas hasta que el agua dio un ensayo de pH neutro. El polvo de CMC acetilada (CMC-Ac) se secó en alto vacío durante una noche, se disolvió en una cantidad mínima de acetona, y se precipitó en agua. El polímero se extrajo por centrifugación de la solución, se secó mediante liofilización, y se analizó mediante RMN ^1H en disolvente DMSO.

Síntesis de Cellax

La preparación del Cellax descrita en el manuscrito se describe aquí (alimentación de 50 % de moles de DTX, alimentación de 30 % de moles de PEG, o 50/30), seguido de las reacciones relacionadas que detallan las

composiciones que no formaron partículas aceptables. Síntesis 50/30: se pesó carboximetilcelulosa acetilada (CMC-Ac, 300 mg, 1,5 mmol de ácido) en un vial de vidrio de 25 ml, y se disolvió en MeCN (2 ml). Se disolvió EDC HCl (441 mg, 2,3 mmol) en MeCN (12 ml) y agua (0,5 ml). Se disolvieron NHS (265 mg, 2,3 mmol) y DMAP (28 mg, 0,23 mmol) en MeCN (1 ml). Se disolvió mPEG-OH (690 mg, 0,35 mmol) en MeCN (2 ml) con calentamiento suave. Se disolvió DTX (465 mg, 0,58 mmol) en MeCN (12 ml) y DMF (1 ml). Se añadieron los reactivos EDC HCl, NHS, y DMAP a la solución de CMC-Ac, seguido de la adición del mPEG-OH y el DTX. La solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente con protección de la luz. En disolvente se retiró mediante evaporación rotatoria (55 ºC, 5 mbar), y el producto (Cellax) se disolvió en MeCN (3 ml), y se precipitó en 40 ml de dietil éter. El Cellax se secó, se redisolvió en MeCN, y la precipitación se repitió 2x. El disolvente se retiró en alto vacío, y el polvo fino se lavó con agua (25 ml) y se recuperó mediante centrifugación. El producto de Cellax se analizó mediante cromatografía de permeación en gel para PEG y DTX sin reaccionar, y se repitió el lavado si se detectó reactivo residual. Se llevó a cabo un análisis por RMN ^{1}H ($CDCl_3$) para confirmar la presencia de DTX y PEG, y para estimar la composición molecular. Se varió la proporción de alimentación de DTX mientras se mantenía PEG constante para crear un intervalo de modelos de Cellax de contenido de DTX. Se activó la CMC-Ac (50 mg, 0,19 mmol de ácido) con EDC HCl (75 mg, 0,39 mmol) y NHS (45 mg, 0,39 mmol) en presencia de DMAP (5 mg, 0,04 mmol), seguido de la adición de DTX (16, 31, 47, 63, 142 mg, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,18, mmol) y mPEG-OH (117 mg, 0,06 mmol) variados. Se varió la proporción de PEG mientras se mantenía DTX constante para crear un intervalo de modelos de Cellax de contenido de PEG. Se activó la CMC-Ac (100 mg, 0,39 mmol de ácido) con EDC HCl (224 mg, 1,17 mmol) y NHS (135 mg, 1,17 mmol) en presencia de DMAP (48 mg, 0,39 mmol), seguido de la adición de PEG (78, 156, 390, 546, 780, 1169 mg, 0,04, 0,08, 0,19, 0,27, 0,39, 0,58 mmol) y DTX (157 mg, 0,19 mmol) variados. Todos los análogos se purificaron de la misma forma que la composición preferente que se ha descrito anteriormente. Los compuestos se disolvieron en $CDCl_3$ para análisis por RMN ^{1}H, y se estimó la composición mediante integración de los picos seleccionados.

Síntesis de CMC-Ac-PEG (polímero de control)

Se sintetizó una molécula de control de CMC-Ac-PEG usando las mismas condiciones que se han descrito para Cellax. Se hizo reaccionar CMC-Ac (100 mg, 0,38 mmol de ácido) con $mPEG_{2000}$ (230 mg, 0,12 mmol) en presencia de EDC HCl (147 mg, 0,77 mmol), NHS (88 mg, 0,77 mmol), y DMAP (9 mg, 0,08 mmol) en disolvente acetonitrilo (6 ml). Después de reacción durante una noche, en disolvente se retiró mediante evaporación rotatoria (55 ºC, 5 mbar), se disolvió en agua (5 ml) y se dializó frente a múltiples intercambios de agua usando cartuchos de diálisis Slide-a-lyzer de 20 kDa de MWCO. El producto purificado se recuperó mediante liofilización, y se analizó mediante GPC acuosa para verificar que el PEG sin reaccionar se había extraído completamente. El análisis de la composición química se llevó a cabo mediante RMN ^{1}H en D_2O.

Conjugación de DTX, Cy5.5, y PEG a CMC

Se disolvió PEG bisamina (169 mg, 0,084 mmol) en acetonitrilo (2 ml), a lo que se añadió DMAP (1 mg, 0,008 mmol) y éster de NHS de Cy5.5 (050 mg, 0,084 mmol, 0,5 ml acetonitrilo). La solución se agitó durante cuatro horas a temperatura ambiente y se protegió de la luz. Se pesó carboximetilcelulosa acetilada (CMC-Ac, 100 mg, 0,39 mmol de ácido) en un vial de vidrio de 25 ml, y se disolvió en MeCN (2 ml). Se disolvió EDC HCl (149 mg, 0,78 mmol) en MeCN (4 ml) y agua (0,15 ml). Se disolvieron NHS (90 mg, 0,78 mmol) y DMAP (10 mg, 0,08 mmol) en MeCN (0,5 ml). Se disolvió $mPEG_{2000}$-OH (156 mg, 0,08 mmol) en MeCN (1 ml) con calentamiento suave. Se disolvió DTX (157 mg, 0,19 mmol) en MeCN (4 ml) y DMF (0,25 ml). Se añadieron los reactivos de EDC HCl, NHS, y DMAP a la solución de CMC-Ac, seguido de la adición de la solución de reacción de Cy5.5-PEG y el mPEG-OH y el DTX (Esquema 1B). La solución se agitó durante una noche a temperatura ambiente con protección de la luz. El producto (Cellax Cy5.5) se purificó mediante el mismo procedimiento usado para purificar Cellax. Se llevó a cabo el análisis por RMN ^{1}H ($CDCl_3$) para confirmar la presencia de DTX y PEG, y para estimar la composición molecular.

Preparación de SPION

Se prepararon nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION) de acuerdo con el método publicado por Sun[73]. Se mezcló acetilacetonato de hierro(III) (353 mg, 1 mmol) con 1,2-hexadecanodiol (1292 mg, 5 mmol), ácido oleico (1224 mg, 4,3 mmol), amina oleica (1214 mg, 4,5 mmol) y difenil éter (10 ml) en un baño de agua a 37 ºC, y se agitó en atmósfera de nitrógeno. El vial se calentó a 200 ºC en un bloque de calentamiento, con mezcla ocasional. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se lavó abundantemente en atmósfera de nitrógeno, y la solución se calentó a 265 ºC, y se calentó a reflujo durante 30 minutos con protección de nitrógeno. La solución se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió isopropanol (20 ml) al sistema de reacción, y las partículas se recuperaron por centrifugación (2500 rpm, 5 min). Se añadió hexano (1 ml) para disolver el compuesto, y la solución se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se recogió (precipitados descartados) y el disolvente se retiró por evaporación. El proceso (desde la adición de IPA hasta la resuspensión en hexano) se repitió tres veces. Las SPION se secaron, se pesaron, y se añadió hexano para llevar la concentración hasta 10 mg/ml.

Ensayos del contenido de DTX en Cellax

El contenido de DTX en el polímero de Cellax se estimó mediante análisis por HPLC de muestras de polímero hidrolizadas: se disolvió Cellax (2 mg) en acetonitrilo (1 ml) y se trató con ácido ortofosfórico al 8,5 % (0,3 ml)

durante 30 segundos en un agitador vorticial. Las muestras se extrajeron inmediatamente con acetato de etilo (3 ml). Se añadió agua a cada muestra (3 ml) en un tubo cónico de 15 ml, y el tubo se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm para separar las fases orgánica y acuosa. La fracción de acetato de etilo se aisló, se secó mediante evaporación rotatoria, y se añadió acetonitrilo (0,5 ml) para disolver la muestra para análisis por HPLC.

Preparación de partículas de Cellax

Se disolvió Cellax (250 mg) en acetonitrilo (25 ml) sin calentamiento. Las partículas se prepararon en lotes: se añadieron gota a gota 0,2 ml de una solución de Cellax a una solución agitada vorticialmente de 1,9 ml de NaCl al 0,9 % en un tubo cónico de 15 ml. La agitación vorticial se mantuvo durante 1 minuto después de la adición de la solución. La solución de partículas resultantes se combinó y se transfirió a un cartucho Slide-a-lyzer de 10.000 de MWCO, y se dializó frente a NaCl al 0,9 % durante tres horas, con dos intercambios de dializado. Las partículas se filtraron a través de un filtro PVDF de Millipore de 25 mm y 0,22 um, y se transfirieron a una unidad de filtración centrífuga Vivaspin (25 ml, 10.000 MWCO), y se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 hora para concentrar las partículas hasta un volumen de 1 ml. El tamaño de las partículas se determinó mediante dispersión dinámica de luz con un analizador de partículas (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). El contenido de DTX de los conjugados se determinó por dilución de la muestra 20x en solución salina/DMSO 90/10, medida de la absorbancia UV a 274 nm (Nanodrop, ThermoScientific) y cálculo de la concentración de DTX usando una curva de calibración de DTX.

Las partículas de Cy5.5-Cellax y Cellax (composición mixta) se prepararon para estudios *in vivo*, y la preparación de partículas se optimizó sometiendo a ensayo un intervalo de proporciones. Se combinó Cellax (100 ul, 10 mg/ml en acetonitrilo) con Cy5.5 Cellax (2, 5, 10, 15 y 30 ul, 10 mg/ml en acetonitrilo) para formar soluciones al 1,5, 10, y 15 y 30 % en peso de Cy5.5. Cada solución se precipitó en solución salina al 0,9 % (0,9 ml), se filtró a través de un filtro PVDF de Millipore de 25 mm y 0,22 um, y se midió el tamaño de partícula mediante un Zetasizer.

Las partículas de Cellax que contenían SPION usando polímero de Cellax y la solución de SPION se han descrito anteriormente. En resumen, se transfirieron alícuotas de la solución de SPION (5, 10, 20, 40 y 100 ul) a viales, y el hexano se retiró por secado. Se disolvió Cellax (10 mg) en THF (1 ml), y se añadieron alícuotas de 100 ul a cada vial de SPION, y las soluciones se mezclaron bien. Las soluciones de SPION/Cellax se añadieron a continuación gota a gota con agitación vigorosa a solución salina al 0,9 % (0,9 ml), y estas soluciones se filtraron a través de filtros PVDF de 0,22 uM para retirar agregados. Las soluciones se midieron para el tamaño de partícula (Zetasizer) y se tomó la absorbancia a 500 nm para estimar el momento en el que se estabilizó la incorporación de SPION. Se analizaron muestras seleccionadas de Cellax-SPION mediante ICP-OES para el contenido de hierro: las muestras se combinaron 1:1 con ácido nítrico al 70 % para digestión durante una noche, y a continuación se diluyeron 10x con agua desionizada antes del análisis.

Determinación de la concentración micelar crítica

El método para la determinación de la concentración micelar crítica se adaptó de Zhang, y consiste en un análisis basado en fluorescencia[67,74]. Se disolvió 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH, 1,175 mg) en acetonitrilo (10 ml) para formar una solución de reserva. Se disolvió Cellax (10 mg) en 1 ml de la solución de reserva de DPH para formar una solución de 10 mg/ml, y se diluyó en serie con la solución de DPH para formar una serie de 10 concentraciones de Cellax en una concentración constante de DPH. Se precipitaron gota a gota volúmenes de 100 µl de cada muestra en 900 µl de NaCl al 0,9 % en un agitador vorticial durante 1 minuto. Se transfirieron 50 µl de cada solución de partículas a una microplaca de 96 pocillos de color negro, y se midió la fluorescencia (Ex 360, Em 460) en un lector de placas Chameleon. Convergen dos curvas lineales distintas en un gráfico de concentración frente a log de concentración, y se calculó la concentración micelar crítica mediante el uso de una solución algebraica lineal para la intersección de las curvas.

Liberación de DTX *in vitro* de las nanopartículas de Cellax

Las partículas de Cellax se sometieron a ensayo para el contenido de DTX, la solución se ajustó a 500 ug DTX / ml, y se filtró de forma estéril a través de filtros PVDF de Millipore de 0,22 µm. Se añadió un patrón interno de paclitaxel (5 ug PTX / ml) a la solución de partículas. Se combinaron volúmenes iguales de solución de partículas y suero bovino fetal (FBS) en condiciones estériles, y se incubaron a 37 ºC. Se tomaron volúmenes de 1 ml en los puntos de tiempo seleccionados (1, 2, 3, 4, 7 y 14 días) y se combinaron con 3 ml de acetato de etilo, las muestras se mezclaron bien durante 30 minutos, y a continuación se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos para separar las capas. Se retiraron 2,5 ml de la capa de acetato de etilo, el disolvente se retiró por evaporación rotatoria, y se resuspendió en 0,5 ml acetonitrilo, y se analizó mediante HPLC. Aparecieron picos de DTX y PTX a 7,8 min y 8,1 min respectivamente, se preparó una curva de calibración para DTX mediante la toma de picos de una solución de solución salina/FBS con DTX y el patrón interno PTX, seguido del protocolo de extracción de muestra, y esta calibración se usó para calcular el contenido de DTX en las muestras incubadas. Apareció un nuevo pico en el análisis de las muestras incubadas a 8,4 min, y se determinó mediante análisis por LC/MS que era un isómero de DTX (ES+ 878 de masa). El isómero se cuantificó de una forma similar al DTX.

Análisis *in vitro* de toxicidad de DTX (análisis de CI_{50})

Se cultivaron células de carcinoma de mama murino EMT-6 y células de carcinoma de células de pulmón Lewis murino LL/2 en medio DMEM (Invitrogen) con alto contenido de glucosa, complementado con FBS al 10 % (Invitrogen), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) (Invitrogen). La línea celular de carcinoma de mama de ratón EMT-6 fue un generoso regalo del Dr. David Stojdl del Instituto de Investigación CHEO y el Dr. Douglas Mahoney de la Universidad de Ottawa. Para el cultivo en placa, las células se liberaron del frasco de cultivo con tripsina (Invitrogen), se resuspendieron a una concentración de 1 x 10^5 células/ml, y se añadieron 100 ul de la suspensión de células a los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos. Las células se mantuvieron durante 24 horas en cultivo (37 ºC, 5 % de CO_2, humidificado) antes de la adición de las partículas. Las soluciones de DTX se compusieron en DMSO y se diluyeron con medio para formar una solución de reserva 100 nM con un contenido de DMSO de 0,1 %. Estas muestras de DTX se diluyeron 2x en serie con medio de DMSO al 0,1 %. Las partículas de Cellax se sometieron a ensayo para el contenido de DTX, y se diluyeron 10x en serie con medio. Los cultivos se mantuvieron durante tres días, momento en el que se sometió a ensayo la viabilidad celular mediante el ensayo de XTT. En resumen, se preparó una solución de 1 mg/ml de reactivo de XTT (Sigma) en agua, y se añadió fenazina (Sigma) justo antes del análisis (x mg/ml). Las placas de cultivo se incubaron durante dos horas a 37 ºC, y a continuación se leyó la absorbancia de cada pocillo a 480 nm. Los pocillos tratados con medio (o medio de DMSO al 0,1 %) representan cultivos viables al 100 %, y los pocillos que no contienen ninguna célula representan la señal de fondo. En un experimento en paralelo, se añadieron el DTX o el medio que contiene Cellax a los cultivos de EMT-6 y LL/2 en cuatro etapas, con adición de ¼ de la dosis cada 12 horas durante dos días. Los datos se analizaron en GraphPad Prism, y se calculó el valor de CI_{50} para cada sistema.

Estudios animales

Se adquirieron ratones BALB/c y C57/BL6 hembra (6 semanas de edad, 18-20 g) en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Todos los protocolos experimentales de este estudio se aprobaron por el Comité de Cuidado de Animales de la Red de Salud Universitaria (Toronto, Ontario, Canadá) de acuerdo con las políticas establecidas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales preparada por el Consejo Canadiense de Cuidado de Animales. Para cada estudio, se formuló el DTX en una solución de Tween80/etanol/solución salina (20:13:67) (4 mg DTX/ml), y se filtró en condiciones estériles. Las partículas de Cellax se ajustaron a 4, 7,5 o 15 mg DTX/ml en solución salina y se filtraron en condiciones estériles.

Histología e inmunohistoquímica

Se aclararon tejidos de ratones (órganos, huesos, y tumores) con solución salina y se fijaron en formalina al 10 % durante 2 días, seguido de almacenamiento en etanol al 70 %. La preparación de tejidos en portaobjetos se llevó a cabo en el laboratorio del Programa de Investigación de Patología del Hospital General de Toronto (Toronto, ON). Se usó anticuerpo Ki67 (SP6) (ThermoFisher) a una dilución 1/1000 en citrato durante 1 hora. Se usó anticuerpo CD31 (PECAM) (Santa Cruz) a una dilución 1/2000 en tampón Tris-EDTA, a pH 9 durante 1 hora. Se llevó a cabo tinción de TUNEL de acuerdo con el método de Wijsman[75]. Se analizaron los portaobjetos preparados en un Escáner Aperio en la Instalación de Microscopía Óptica Avanzada (AOMF) del Hospital Princess Margaret (Toronto, ON). El análisis de imagen se llevó a cabo con el software ImageScope que acompaña al escáner Aperio. Para las muestras de H&E, se identificaron los píxeles positivos a hematoxilina y eosina con el algoritmo ImageScope Color Deconvolution V9. Para las muestras teñidas con TUNEL, Ki67, y CD31, se contaron los píxeles de color pardo con el algoritmo ImageScope Positive Pixel Count. Para cada tumor u órgano analizado, se dividieron tres secciones de tejido cada una en tres regiones iguales, generando n = 9 puntos de datos. El resultado de los análisis de imagen fueron cuentas de píxeles positivos divididas por el área analizada.

Estudio de dosis máxima tolerada (MTD)

Se trataron ratones BALB/c sanos con DTX libre con dosis de 20 y 40 mg/kg, mediante inyección *i.v.* de 200 ul en la vena de la cola. Del mismo modo, se trataron ratones BALB/c sanos con Cellax con dosis equivalentes de DTX de 20, 40, 85, y 170 mg/kg. Los ratones de control recibieron inyecciones de Tween80/etanol/solución salina o solución salina. Se monitorizó el peso corporal durante 7 días y, después del sacrificio, se recogieron los órganos para análisis histológico e inmunohistoquímico. Se extrajo sangre, y se analizaron el suero y la sangre total para parámetros serológicos y hematológicos, y se referenciaron frente a muestras de sangre de control.

Estudio de tumor de costado subcutáneo (s.c) en ratones

Se cultivaron células EMT-6 como se ha descrito anteriormente. Antes de la inoculación, las células se extrajeron de las placas de cultivo con TrypLE Express, y se resuspendieron en medio DMEM exento de complemento (sin FBS, sin antibióticos). Las células EMT-6 (2 x 10^5 células/50 µl de medio) se inocularon *s.c.* en el costado lateral derecho afeitado de los ratones BALB/c. Después de 7 días, cuando los tumores se hicieron palpables, los ratones recibieron dosis de 40 mg/kg de DTX y Cellax, como se describe en el estudio de MTD. Los animales de control recibieron inyecciones de solución salina. Cada grupo (DTX, Cellax, y control) estaba compuesto por seis ratones. Se midió el tamaño del tumor mediante un calibre, y se monitorizó el peso corporal. Después de 14 días los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, y se recogieron el corazón, pulmón, hígado, riñones, y tumor para seccionamiento del tejido y tinción con H&E, TUNEL, Ki67, y CD31. Se llevó a cabo un segundo estudio (similar al estudio de EMT-6) con células LL/2 inoculadas s.c. en ratones C57/BL6: las células LL/2 se suspendieron en medio

DMEM exento de complemento.

Estudio de tumor metastásico

Los ratones BALB/c sanos recibieron una dosis i.v. de células EMT-6 (en medio DMEM exento de complemento) mediante inyección en la vena de la cola (50 ul, 2,5 x 10^5 células/ml), y un día después recibieron una dosis de Cellax (40 mg DTX/kg), 40 mg/kg DTX, o solución salina (n =10 /grupo). Se administró una segunda dosis (20 mg/kg DTX) en el día 7 posterior a la inyección. Los ratones se sacrificaron cuando se registró una pérdida de peso corporal > 20 %, o con los primeros signos de disfunción de comportamiento o movilidad. Se recogieron los pulmones, corazón, hígado, riñones, bazo, fémures, y cerebro para análisis histológico. Se generó una curva de Kaplan Meier de probabilidad de supervivencia para los datos de supervivencia.

Estudio de modelo de tumor intraperitoneal (i.p.)

Se cultivaron células PAN02 (cáncer pancreático murino) en RPMI 1640 complementado con FBS al 10 % (Invitrogen), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) (Invitrogen), y piruvato (1 mM). Antes de la inoculación, las células se extrajeron de las placas de cultivo con TrypLE Express (Invitrogen), y se resuspendieron en medio RPMI exento de complemento (sin FBS, sin antibióticos). Las células PAN02 (5 x 10^6 células/ml, 0,5 ml) se inyectaron en el espacio intraperitoneal de los ratones C57/BL6. Un día después de la administración de las células, los ratones (n = 3 por grupo) se trataron con DTX (40 mg/kg), Cellax (40 mg DTX equiv/kg), o solución salina. Los ratones se sacrificaron cuando se registró una pérdida de peso corporal > 20 %, o con los primeros signos de disfunción de comportamiento o movilidad.

Análisis por MRI

La monitorización por MRI de la distribución de Cellax-SPION dentro de los tumores se llevó a cabo usando un micro-MRI 7T (BioSpec 70/30 USR, Bruker Biospin, Ettlingen, Alemania) ubicado en la instalación STTARR (Programa de Medicina de Radiación, Universidad de Toronto, Ontario, Canadá). La recogida de datos se asoció a la respiración, y se recogieron 8-12 secciones por sesión de formación de imágenes de tumor. Las imágenes correspondientes a TE = 10 ms se procesaron en software MIPAV. En resumen, los volúmenes de tumor se delinearon con polígonos en las 8-12 secciones a través del volumen de tumor para definir un volumen de interés (VOI). Las secciones de tejido muscular adyacente se delinearon asimismo con un VOI. Se definieron los vóxeles de tumor hipointensos como la intensidad de voxel de tumor menos 5x la desviación estándar de la intensidad media de voxel de tumor. Al llevar a cabo una operación de fijación de umbral de cada VOI del tumor excluyendo los vóxeles por encima del límite de 5x SD, se calculó el volumen hipointenso. La fracción de volumen de cada tumor que contenía vóxeles hipointensos se calculó como volumen no umbral / volumen umbral.

Análogo de camptotecina

Se pesó carboximetilcelulosa acetilada (CMC-Ac, 75 mg, 0,29 mmol de ácido) en un matraz de vidrio de 25 ml, y se disolvió en DMF anhidra (1 ml) con protección de nitrógeno. Se pesó camptotecina (CMT, 50,0 mg, 0,15 mmol) en un vial de vidrio de 25 ml, y se disolvió en DMF anhidra (15 ml) con calentamiento suave. La solución de CMT se añadió al reactor, y la solución se enfrió a 0 ºC. Se pesaron PyBOP (137 mg, 0,26 mmol), DMAP (64 mg, 0,53 mmol), y mPEG-OH (175 mg, 0,09 mmol) en viales de vidrio, y se disolvieron en DMF anhidra (1 ml cada uno), y se añadieron al reactor. Se añadió DIPEA (38 µl, 0,22 mmol) al reactor mediante una jeringa. La reacción se elevó a temperatura ambiente después de 1 h, y se mantuvo en agitación durante una noche con protección de nitrógeno. La solución de reacción se concentró mediante evaporación rotatoria, se enfrió con un baño de hielo, y se añadió NaCl al 10 % (25 ml). A continuación la solución se acidificó a pH 2,5 mediante la adición de HCl 0,1 N. La suspensión se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, los sólidos se recuperaron mediante centrifugación, se lavaron cuatro veces con agua, y se secaron durante una noche. El material sólido se disolvió en DMF (2 ml), y se dializó frente a metanol durante tres horas para extraer el CMT sin reaccionar. La suspensión de partículas se evaporó hasta sequedad, y se suspendió en forma de una solución de 1 mg/ml en DMF. RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ: 7,29-8,51 (5H, CMT), 7,28 (1H, CMT), 5,76 (2H, CMT), 5,32 (2H, CMT), 3,0-5,5 (m, polímero de CMC), 3,658 (PEG), 1,027 (3H, CMT). Las partículas se prepararon por precipitación en un volumen 10x de solución salina al 0,9 %.

Análogo de paclitaxel (PTX)

Se pesó carboximetilcelulosa acetilada (CMC-Ac, 50 mg, 0,19 mmol de ácido) en un matraz de vidrio de 25 ml, y se disolvió en MeCN (0,5 ml). Se disolvió EDC HCl (112 mg, 0,58 mmol) en MeCN (3 ml) y agua (0,1 ml). Se disolvieron NHS (67 mg, 0,58 mmol) y DMAP (24 mg, 0,19 mmol) en MeCN (1 ml). Se disolvió mPEG-OH (117 mg, 0,06 mmol) en MeCN (1 ml) con calentamiento suave. Se disolvió PTX (67 mg, 0,08 mmol) en MeCN (2 ml) y DMF (0,2 ml). Los reactivos de EDC HCl, NHS, y DMAP se añadieron a la solución de CMC-Ac, seguido de la adición del mPEG-OH y el PTX. La purificación de la reacción fue idéntica a la del conjugado de DTX. La composición se confirmó mediante RMN ^{1}H (41 % en peso de PTX, 5,7 % en peso de PEG). Las partículas se aislaron con un tamaño de 115 nm y un PDI de 0,1.

Análogo de doxorrubicina (DOX)

Se pesó carboximetilcelulosa acetilada (CMC-Ac, 100 mg, 0,38 mmol de ácido) en un matraz de vidrio de 25 ml, y se disolvió en DMF (4 ml). Se disolvieron DCC (158 mg, 0,76 mmol) y DMAP (9 mg, 0,08 mmol) en DMF (0,5 ml). Se disolvió mPEG-OH (574 mg, 0,11 mmol) en DMF (1 ml). Se disolvió DOX (83 mg, 0,15 mmol) en DMF (0,25 ml). Los reactivos de DCC y DMAP se añadieron a la solución de CMC-Ac, seguido de la adición del mPEG-OH y el DOX. Después de reacción durante una noche, la solución de reacción se combinó con 4 ml de agua, y se dializó frente a agua para extraer la DOX sin acoplar. La solución se secó, se resuspendió en DMF, y se precipitó en éter. El polímero de la solución de éter se recuperó mediante evaporación rotatoria. En RMN, la mayoría de las señales de DOX se solaparon con el polímero, pero el producto es de color rojo oscuro. RMN ^{1}H (DMSO) δ: 7,1-7,8 (m, Ar H, DOX), 5,1 (dd, 1H, DOX), 3,63 (s, 4H, PEG), 3,32 (s, 3H, PEG), 3,0-5,5 (m, polímero de CMC), 1,96 (m, 3H, acetilo), 1,25 (d, DOX). El producto de CMC-PEG-DOX se disolvió en DMSO y se precipitó en solución salina: no se formó ninguna población de partículas discretas, lo que sugiere que se impidió el autoensamblado con un fármaco relativamente hidrófilo tal como DOX.

Análogo de PEG5000 de Cellax

Se pesó carboximetilcelulosa acetilada (CMC-Ac, 100 mg, 0,38 mmol de ácido) en un matraz de vidrio de 25 ml, y se disolvió en MeCN (1 ml). Se disolvió EDC HCl (147 mg, 0,76 mmol) en MeCN (4 ml) y agua (0,2 ml). Se disolvió NHS (88 mg, 0,76 mmol) en MeCN (1 ml). Se disolvió mPEG-OH 5000 (574 mg, 0,11 mmol) en MeCN (2 ml) con calentamiento suave. Se disolvió DTX (216 mg, 0,27 mmol) en MeCN (4 ml). Los reactivos de EDC y NHS se añadieron a la solución de CMC-Ac, seguido de la adición del mPEG-OH y el DTX. La purificación del producto fue idéntica a la del Cellax sintetizado con mPEG-OH 2000. RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ: 8,03 (d, 2H, C25 y C29), 7,62 (t, 1H, C27), 7,49 (t, 2H, C26 y C28), 7,41 (m, 4H, C31, C32, C34, C35), 7,38 (m, 1H, C33), 6,23 (m, 1H, C13), 5,70 (m, 1H, C2), 5,25 (m, 1H, C4'), 5,08 (a, 1H, C10), 4,79 (d, 1H, C5), 4,37 (m, 1H, C20-A), 3,62 (s, 4H, PEG), 3,0-5,5 (m, polímero de CMC), 1,99 (m, 3H, acetilo), 1,29 (s, 3H, C16). Las partículas se prepararon mediante precipitación de una solución de MeCN, como se ha descrito anteriormente: 119 nm, PDI = 0,3.

Análogo de CMC de Pm inferior

Se acetiló carboximetilcelulosa sódica (CEKOL 4K, 10 g) siguiendo el mismo método aplicado al material de Cekol 30K. Se pesó carboximetilcelulosa acetilada (CMC-Ac, 100 mg, 0,39 mmol de ácido) en un matraz de vidrio de 25 ml, y se disolvió en MeCN (1 ml). Se disolvió EDC HCl (149 mg, 0,78 mmol) en MeCN (4 ml) y agua (0,2 ml). Se disolvieron NHS (90 mg, 0,78 mmol) y DMAP (10 mg, 0,08 mmol) en MeCN (0,25 ml). Se disolvió mPEG-OH (234 mg, 0,12 mmol) en MeCN (1 ml) con calentamiento suave. Se disolvió DTX (157 mg, 0,19 mmol) en MeCN (4 ml) y DMF (0,3 ml). Los reactivos de EDC HCl, NHS, y DMAP se añadieron a la solución de CMC-Ac, seguido de la adición del mPEG-OH y el DTX. La purificación del producto es idéntica a la que se ha descrito para el proceso descrito para el análogo de CMC-Ac de CEKOL 30K. Las partículas se aislaron de esta preparación con un tamaño de 140 nm.

Análisis por TEM de la partícula de Cellax

Las partículas de Cellax se diluyeron 100x en agua desionizada, y se pipeteó una alícuota de 2 µl de solución en la superficie de redes de TEM de cobre revestido con formvar (TedPella, Redding, CA) y se dejó secar al aire. El análisis se llevó a cabo en un equipo STEM Hitachi HD-2000 en el Centro para la Formación de Imágenes de Nanoestructuras (Departamento de Química, Universidad de Toronto), usando un deflector de campo oscuro de anular gran angular, con una tensión de activación de 200 kV y una corriente de 10 mA. El análisis por TEM de las partículas apoya la medición de Zetasizer (104 +/- 15 nm) y, como se observa en la Figura del Ejemplo 6, las partículas son esféricas.

Incorporación de CMT a una partícula de Cellax

Se disolvió Cellax (3 mg) en THF (0,27 ml), y se añadieron 30 ul de una solución de 1,0 mg/ml de camptotecina (CMT) en DMSO. A continuación se añadió la solución de CMT/Cellax gota a gota a la solución salina al 0,9 % agitada vigorosamente (2,7 ml), y esta solución se filtró a través de un filtro PVDF de 0,22 uM para retirar cualquier agregado. El tamaño de partícula se midió con un Zetasizer: 120 nm, PDI = 0,3. Las partículas se diluyeron en DMSO (10x), y se midió la fluorescencia (Ex 325 nm, Em 460 nm), y se calculó una eficacia de encapsulación de 100 %.

Ejemplo 1: síntesis de Cellax

Acetilación de carboximetilcelulosa

La acetilación del polímero de CMC procedió sin contratiempos, siempre que el polímero de CMC se lavara escrupulosamente en cada etapa del protocolo. Por ejemplo, el ácido sulfúrico residual causó decoloración del material y el agua residual impidió la reacción de anhídrido. Los materiales que no se acetilaron con éxito no se disolvieron finalmente en el disolvente de ácido acético. Sin embargo, cuando los procedimientos de lavado fueron intensivos y exhaustivos, las reacciones fueron cuantitativas, como se evalúa mediante análisis por RMN ^{1}H. RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ: 3,0-5,5 (m, CMC H), 2,02 (m, acetilo CH_3).

Conjugación de PEG y DTX:

La CMC-Ac fue soluble en DMF, pero las reacciones de acoplamiento de DTX y PEG llevadas a cabo en DMF no exhibieron buenos rendimientos, y las partículas formadas a partir de estos materiales fueron inestables y no uniformes. En un análisis sistemático de disolventes, MeCN proporcionó mayores conversiones y, posteriormente, todas las regiones de conjugación se llevaron a cabo en este disolvente. Además, para minimizar la dilución de los reactivos, se requirió un 1,5 % en volumen de agua para disolver EDC, y se requirió un 3,0 % en volumen de DMF para disolver DTX en el disolvente de MeCN. Se intentó inicialmente la purificación del polímero por diálisis, pero dado que PEG, DTX, y los reactivos de CMC poseen diferentes perfiles de solubilidad, se produjeron problemas de precipitación y baja eficacia de purificación. El lavado del producto de Cellax en polvo con agua probó ser eficaz en la extracción de PEG sin reaccionar, y la precipitación en éter eficaz en la extracción de DTX sin reaccionar. La extracción eficaz de PEG y DTX sin reaccionar se confirmó mediante análisis por GPC del producto. Sin embargo, el polímero de CMC se absorbió en las columnas de poliestireno, de modo que el análisis por GPC se restringió a la identificación de impurezas. RMN ^{1}H ($CDCl_3$) δ: 8,12 (d, 2H, C25 y C29), 7,61 (t, 1H, C27), 7,51 (t, 2H, C26 y C28), 7,41 (m, 4H, C31, C32, C34, C35), 7,34 (m, 1H, C33), 6,23 (m, 1H, C13), 5,71 (m, 1H, C2), 5,25 (m, 1H, C4'), 5,10 (a, 1H, C10), 4,98 (d, 1H, C5), 4,32 (m, 1H, C20-A), 4,25 (m, 1H, C7), 4,19 (a, 1H, C20-B), 3,64 (s, 4H, PEG), 3,38 (s, 3H, PEG), 3,0-5,5 (m, polímero de CMC), 2,57 (m, 1H, C6-A), 2,38 (3H, C22), 2,02 (m, 3H, acetilo), 1,86 (m, 4H, C6 y C18), 1,75 (a, 3H, C19), 1,34 (s, 9H, C7', C8', C9'), 1,29 (s, 3H, C16), 1,14 (s, 3H, C17). Véase la Figura 2A y la Figura 2B para el esquema de numeración de los carbonos de DTX. El % en moles relativo de cada unidad (CMC, PEG, y DTX) en el conjugado se estimó por integración del espectro, y mediante el recálculo usando el peso molecular de cada componente, se calcularon los porcentajes en peso (Tabla 1). El contenido de DTX en el Cellax se estimó además mediante análisis por HPLC del hidrolizado de DTX del conjugado usando tratamiento con ácido ortofosfórico, y este análisis confirmó la composición de DTX al 30 % en peso.

Las composiciones entre paréntesis de la formulación de Cellax funcional se prepararon mediante la variación tanto de PEG como de DTX. Mediante análisis por RMN ^{1}H, las asignaciones de picos informadas anteriormente para el Cellax fueron idénticas (no se muestran los datos), pero las integraciones de los picos del DTX varió. Como se muestra en la Tabla 2, el DS para DTX de las composiciones funcionales varió de 13,4 - 26,4 % en moles (22,5 - 43,3 % en peso), y el DS para PEG varió de 0,9-5,4 % en moles (3,5-22,7 % en peso). La composición preferente contenía 15,1-23,7 % en moles de DTX y 1-1,1 % en moles de PEG, y la composición más preferente contenía 20,5 % en moles de DTX y 1 % en moles de PEG. Dentro de un intervalo definido de la composición se establecieron las propiedades de formación de partículas, y se estableció una clara delimitación de los límites donde las nanopartículas definidas ya no se pueden medir.

Tabla 1: análisis de la composición de Cellax mediante análisis por RMN ^{1}H y HPLC

Componente	**Pm (g/mol)**	DS[a]	% en peso[a]	% en peso[b]
DTX	807,8	20,5 +/- 2,0	36,9 +/- 2,6	30
PEG	2000	1,0+/-0,3	4,7+/-1,5	-
[a] Estimado mediante RMN ^{1}H de 8 lotes [b] Estimado mediante hidrólisis y análisis por HPLC.				

Tabla 2: comparación de la composición entre lotes de conjugados de Cellax preparados con diferentes composiciones molares. N.a. indica que no se detectaron las partículas definidas.

20	100	13,4	5,4	49,4
20	75	13,8	4,8	71,8
50	100	24,5	2,7	100,2
50	150	23,7	3,6	102,1
30	30	15,1	1,1	105,4
50	70	23,6	2,1	107,2

20	30	12,9	2,0	108,4
20	50	13,1	3,6	116
50	50	23,7	1,6	117,8
40	30	20,5	1,0	118,2
50	30	16,3	2,6	118,4
50	20	26,4	0,9	141,9
10	30	8,8	1,8	278,1
50	10	27,3	0,4	n.a.
90	30	36,6	2,1	n.a.
20	20	12,3	1,6	n.a.
20	150	11,3	7,4	n.a.
50	200	27,4	4,9	n.a.

La síntesis del polímero de Cy5.5-Cellax fue idéntica al polímero de Cellax, excepto en que se incorporó Cy5.5-PEG al esquema de reacción. Mediante RMN ^{1}H, se detectó el espectro que se ha descrito anteriormente, pero los picos de Cy5.5 no se pudieron detectar fácilmente debido al solapamiento espectral y la baja señal en comparación con el equilibrio de los componentes del polímero. Sin embargo, el producto de Cy5.5-Cellax fue de color azul oscuro y su fluorescencia en el IR cercano fue la confirmación de la incorporación de Cy5.5. Las partículas de Cy5.5-Cellax, cuando se dializaron con cartuchos de 10K de MWCO, o cuando se concentraron con un filtro Vivaspin de 10K, no perdieron el colorante azul, confirmando que el contenido de Cy5.5 se había incorporado de forma estable.

Ejemplo 2: formulación de partículas de Cellax, liberación de DTX *in vitro*, y estudios en animales

Se llevó a cabo una serie de ensayos usando diferentes métodos de preparación de partículas, incluyendo intercambio disolvente mediante diálisis frente a solución acuosa, hidratación de película fina, y precipitación. Se consiguieron buenos resultados usando precipitación acuosa, pero las demás técnicas de formación de partículas habituales no produjeron partículas definidas. Como se describe en la Tabla 2, el sistema acuoso usado para reparar las partículas tuvo impacto en la dimensión y estabilidad de las partículas. Por ejemplo, las partículas preparadas en solución salina tamponada con fosfato (PBS 25 mM) tuvieron inicialmente un tamaño de 134 nm pero en el curso de unas pocas horas, estas partículas se agregaron visiblemente. Por el contrario, las partículas preparadas en sacarosa al 10 % o solución salina al 0,9 % variaron de 120-30 nm, y permanecieron estables en almacenamiento a 4 ºC durante al menos un mes (límite de ensayo hasta la fecha). Además, las partículas de Cellax preparadas en solución salina incubadas con FBS no cambiaron de dimensión. La concentración micelar crítica, determinada mediante ensayo de DPH, fue de 0,1 mg/ml.

Tabla 2: características de las partículas de Cellax en diferentes sistemas acuosos

Solución	Tamaño (nm)	PDI
PBS	134,0+/-3,4	0,1+/-0,08
Solución salina (0,9 %)	125,1+/-2,5	0,05 +/- 0,01
Sacarosa (10 %)	128,5 +/- 3,2	0,10+/-0,04

Las partículas de Cy5.5-Cellax se prepararon con un protocolo similar al que se ha aplicado a las partículas de Cellax, excepto en que 1,5, 10, 15 y 30 % en peso de estas partículas fueron Cy5.5-Cellax, con el equilibrio compuesto por Cellax. Las medidas del tamaño de partícula fueron estables en 102-100 nm hasta 15 % en peso de Cy5.5-Cellax, después de lo cual las medidas se volvieron erráticas, posiblemente debido a los efectos de fluorescencia en el instrumento Zetasizer.

Las partículas de Cellax-SPION se prepararon mediante precipitación de una solución en THF de SPION y Cellax en solución salina, seguido de diálisis y filtración a través de filtros de 0,22 µm. Se sometió a ensayo una serie de proporciones de SPION:Cellax (9-50 % de SPION en peso): la integración de SPION se estabilizó con 30 % en peso, con una eficacia de integración de 77 % y un contenido de SPION final después de filtración de 25,4 +/- 2,5 % en peso. El tamaño de las partículas de Cellax-SPION fue de 115,4 nm con un PDI de 0,104, y se esterilizaron con facilidad a través de filtros de 0,22 µm. Las partículas de Cellax-SPION se concentraron mediante filtración en Vivaspin para producir una solución de partículas de 11,4 mg/ml de SPION, 12 mg/ml de DTX, 40 mg/ml de Cellax. El análisis por MR confirmó que las partículas de Cellax-SPION pudieron proporcionar contraste negativo en los modos T1 y T2: como se representa en la Figura 3 A, a medida que la solución de partículas se diluyó desde 168 ug SPION/ml de forma descendente, el contraste T1 disminuyó del mismo modo en una relación lineal. De forma más importante, el contraste T2 de las partículas de SPION fue elevado, y cuando las partículas de Cellax-SPION se inyectaron en un ratón (20 mg/kg de SPION, 133 mg/kg de DTX), se detectó un contraste excelente en el tumor mediante formación de imágenes de T2 y T2*. La masa de tumor de EMT-6 se pudo observar en la serie de formaciones de imagen de fondo (Figuras 3B y 3C), y 3 horas después de la inyección (Figuras 3D y 3E), las imágenes T2 y T2* muestran una clara acumulación de SPION. Después de 24 y 72 horas, estas partículas permanecen residentes, moviéndose dentro del tumor. El análisis de imagen se llevó a cabo definiendo en primer lugar el volumen de tumor (VOI). Después de este análisis, se estableció una intensidad umbral que define los vóxeles hipointensos: se midió la intensidad media y la desviación estándar (SD) de las VOI de los músculos circundantes, y se restaron múltiplos de SD de la intensidad media hasta que no se contaron vóxeles (5 SD). Para todas las imágenes de tumores, el valor de 5 SD del VOI del músculo de referencia se restó del volumen de tumor no umbral para generar el volumen hipointenso. Como se observa en la Figura 3F, la fracción del volumen hipointenso aumentó rápidamente en 3 horas (25 %), y mostró un pico en 24 horas en la imagen tanto T2 como T2* de 30 %. En 72 horas, la fracción de volumen hipointenso disminuyó a 15 %.

Las partículas de Cellax se suspendieron en una mezcla 50:50 de FBS, y se monitorizó la liberación de DTX de las partículas en el curso de tres semanas. En el estudio preliminar, el FBS se desactivó térmicamente, y se pudo detectar muy poca liberación de DTX (no se muestran los datos). En el estudio posterior con FBS no desnaturalizado, se detectó un pico adicional en el análisis por HPLC, y cuando los análisis se duplicaron en un sistema UPLC/MS, tanto el pico de DTX como el nuevo pico se detectaron como 808 Da en modo MS+, indicando que el DTX se isomerizó a 7-epidocetaxel. Posteriormente, se cuantificaron tanto DTX como 7-epidocetaxol, y la cantidad combinada de DTX y el isómero se sumaron para expresar el total de taxanos. Como se muestra en la Figura 4, se controló la liberación de taxanos en el curso de tres semanas, alcanzando la liberación total en 21 días. Aproximadamente la mitad del DTX conjugado se liberó en forma de DTX activo.

El análisis de los valores de CI_{50} *in vitro* del Cellax confirmó un efecto citotóxico frente a las líneas celulares tanto carcinoma de mama EMT-6 como de carcinoma de pulmón LL/2 (Tabla 3 y Figuras 5 A-B). La concentración en masa del polímero de CMC-PEG de control se igualó a las concentraciones en masa de Cellax, y no hubo ningún nivel en el que hubiera ninguna indicación de efectos citotóxicos en estas células. Las células EMT-6 son más sensibles a los efectos de una dosis en bolo de DTX, exhibiendo un valor de CI_{50} de 80 nM, comparado con 767 nM para las células LL/2. Sin embargo, las poblaciones de células tanto EMT-6 como LL/2 estuvieron más influenciadas por el tratamiento con partículas de Cellax, con valores de CI_{50} de 9 y 19 nM, respectivamente. Los cultivos de EMT-6 y LL/2 también se trataron con dosis repetidas de DTX (20 y 200 mM respectivamente,4 aplicaciones durante dos días), para determinar si las dosis individuales o las dosis metronómicas de DTX conducirían a resultados diferentes. De hecho, la viabilidad de los cultivos de EMT-6 y LL/2 fue de 20 y 12 % respectivamente en comparación con los controles (comparado con 50 % con una dosis individual), indicando que la exposición sostenida al DTX tiene un mayor efecto antiviabilidad en estas células.

Tabla 3: análisis de citotoxicidad *in vitro* (análisis CI_{50})

Línea celular	CI_{50} DTX (nM)	CI_{50} DTX (nM) Metronómica	CI_{50} Cellax (nM)
EMT-6 (mama)	80 +/- 3	6 +/- 2,6	9+/-3
LL/2 (pulmón)	767+/-10	12+/- 4	19+/-3

En el estudio de MTD, los ratones BALB/c demostraron una pérdida de peso corporal despreciable con la administración de las soluciones de Tween80/etanol/solución salina (Figura 6A). Los ratones tratados con 20 mg/kg de DTX no ganaron ni perdieron peso, pero los ratones con la dosificación de 40 mg/kg exhibieron peso corporal

ligeramente disminuido y piloerección suave. Por el contrario, los ratones tratados con partículas de Cellax con una dosificación de 20, 40, 85 y 170 mg/kg de DTX no exhibieron signos de estrés físico, y solo el grupo de dosificación de 170 mg/kg de Cellax exhibió pérdida de peso (Figura 6B). Los ratones del grupo de tratamiento de 170 mg/kg volvieron a recuperar su peso corporal original en una semana de administración de dosis (Figura 6B). El análisis de hematología y química de sangre no reveló ninguna anomalía (Tabla 4). El análisis de histología e inmunohistoquímica de los órganos de los ratones de 170 mg/kg tampoco reveló ninguna anomalía.

Tabla 4: análisis serológico y hematológico de la sangre de ratones Balb/c tratados con Cellax (170 mg DTX / kg).

Parámetros serológico	**Unidades**	**Control**	**Cellax**
Proteína total	g/l	50 +/- 9	54 +/- 3
Albúmina	g/l	36 +/- 4	39 +/- 2
Globulina	g/l	14 +/- 5	16 +/- 1
Proporción A/G		3 +/- 1	3 +/- 0
Bilirrubina	umol/l	1,5 +/- 0,5	2 +/- 0,4
ALP	IU/l	134 +/- 33	158 +/- 9
ALT	IU/l	73 +/- 53	56 +/- 4
AST	IU/l	267 +/- 218	252 +/- 74
Urea	mmol/l	9 +/- 2	9 +/- 1
Creatinina	umol/l	13 +/- 1	19 +/- 3
Parámetros de hematología	**Descripción**	**Control**	**Cellax**
RBC (x 10^{12}/l)	Glóbulos rojos	9 +/- 3	11,8 +/- 0,03
Hgb (g/l)	Hemoglobina	140 +/- 28,3	161 +/- 0
HCT (l/l)	Hematocrito	0,5 +/- 0,1	0,63 +/- 0,01
MCV (fl)	Volumen corpuscular medio	57,9 +/- 6,9	52,9 +/- 0,49
MCH (pg/célula)	Hemoglobina corpuscular media	15,9 +/- 2,4	13,6 +/- 0
MCHC (g/l)	Concentración de hemoglobina corpuscular media	275,5 +/- 9,2	257 +/- 2,8
PLT (x 10^{9}/l)	Plaquetas	776 +/- 343,7	629,5 +/- 55,6
WBC (x 10^{9}/l)	Glóbulos blancos	5,5 +/- 4,8	8,2 +/- 0,8
MPV (fl)	Volumen de plaquetas medio	5,7 +/- 1,5	4,6 +/- 0,1

Parámetros serológico	Unidades	Control	Cellax
RDW %	Distribución de glóbulos rojos	18 +/- 0	19,3 +/- 0,1
NE (x 10^9/l)	Neutrófilos	1 +/- 0,5	1,2 +/- 0,2
LY (x 10^9/l)	Linfocitos	4,2 +/- 4,2	6,6 +/- 0,4
MO (x 10^9/l)	Monocitos	0,3 +/- 0,1	0,3 +/- 0,1
BA (x 10^9/l)	Basófilos	0 +/- 0	0,01 +/- 0,01
EO (x 10^9/l)	Eosinófilos	0,1 +/- 0	0,03 +/- 0,02

En estudios de eficacia piloto, se inocularon ratones con las células EMT-6 y LL/2 para generar modelos de tumor singenéico, y estos ratones se trataron con una dosis igualada individual de 40 mg/kg de DTX o 40 mg equiv/kg de Cellax. En el modelo de costado de EMT-6, el DTX libre tuvo un efecto minoritario (no significativo) en el crecimiento tumoral en comparación con los ratones tratados con solución salina de control. Una dosis individual de 40 mg/kg de Cellax tuvo un impacto significativo en el crecimiento tumoral (Figura 7A). El estudio terminó cuando los ratones de control y tratados con DTX comenzaron a exhibir lesiones tumorales. En el modelo de costado de LL/2, el DTX libre no alteró las características de crecimiento tumoral, pero 40 mg/kg de Cellax tuvo un impacto significativo en el crecimiento tumoral, aunque menor en comparación con EMT-6 (Figura 7B). Cuando se aplicó el tratamiento de 170 mg/mg de Cellax a los tumores de LL/2, se midió un aumento del beneficio (Figura 7B). Los modelos de tumores tanto de EMT-6 como de LL/2 fueron agresivos, pero LL/2 planteó un desafío debido al rápido crecimiento tumoral y esto se refleja en la variación, que es más sustancial en el grupo de LL/2.

En los dos modelos de EMT-6 y LL/2, se recogieron los tumores y los órganos de los ratones sacrificados, se fijaron, se seccionaron y se tiñeron con H&E, y anticuerpos TUNEL cromogénico, Ki67, y CD31. Modelo EMT-6: en las secciones teñidas con H&E, fue evidente que las partes de los tumores tratadas con Cellax y DTX fueron necróticas (Figura 8A), y esta observación se reflejó en la tinción de Ki67 (viabilidad celular), CD31 (angiogénesis) y TUNEL (apoptosis). Mediante examen visual, fue evidente que DTX causó necrosis / apoptosis, y este efecto fue más pronunciado en los tumores tratados Cellax. Estas observaciones de histología se siguieron de análisis de imagen para verificar la observación con medidas cuantitativas. Como se observa en la Figura 9 B-D, el tratamiento con Cellax causó significativamente más apoptosis, e inhibió la replicación celular y la angiogénesis hasta un grado significativo, tanto en comparación con los tumores tratados con DTX, como con los controles. El análisis de los demás órganos en el sistema (también mediante H&E, TUNEL, Ki67 y CD31) reveló que se produjo cierto daño en los riñones y los pulmones de los ratones tratados con DTX, pero esto sólo se pudo detectar mediante la tinción de TUNEL (Figura 8B, Figuras 9 E, F). Mediante el análisis de las imágenes de H&E, por ejemplo, todas las morfologías de tejidos de órganos parecieron normales (no se muestran los datos). No se detectó ningún daño en el hígado, corazón, o bazo. El análisis de los riñones y los pulmones de los ratones tratados con Tween80/etanol/solución salina (solución vehículo para DTX) no se tradujo en tinción de TUNEL positiva, lo que indica que la toxicidad en los ratones tratados con DTX fue atribuible al fármaco, no a la solución del vehículo. Modelo LL/2: la presencia de tejido necrótico sólo se detectó en los tumores tratados con Cellax (Figura 10 A), y la tinción de TUNEL positiva fue mínima en el control y los tumores tratados con DTX (Figura 10B), mientras que el aumento en la tinción positiva en los tumores tratados con Cellax correspondió con la necrosis observada en la Figura 10A. El análisis de los demás órganos mediante H&E y TUNEL no descubrió ninguna anomalía fisiológica o apoptosis, lo que sugiere que Cellax con una dosificación de 40 y 170 mg/kg fue no tóxico y seguro para tejidos normales en los ratones C57/BL6.

En el modelo de cáncer metastásico de los ratones Balb/c, el inicio de los síntomas de la enfermedad se leyó a través de cambios de peso y observaciones de comportamiento, determinándose el sacrificio mediante un conjunto de parámetros establecidos por el cuerpo de veterinarios del AUP. El inicio de la pérdida de peso en los ratones de control (inyecciones de solución salina) se observó en el día 5, y fue rápido (véase la Figura 11 A). Se observó un inicio rápido similar de pérdida de peso en el día 6 en los ratones tratados con DTX (40 mg/kg), pero en el grupo de Cellax, la pérdida de peso no comenzó hasta después del día 8, y la tasa de pérdida de peso en el grupo de Cellax fue más lenta. Algunos signos de estrés de la enfermedad incluyeron piloerección (todos los ratones en los grupos de control y DTX) y parálisis, especialmente en los movimientos de las patas (5/10 para el grupo de control, 4/10 para el grupo de DTX). Los ratones tratados con Cellax no exhibieron piloerección o parálisis en ningún punto, incluso cuando la pérdida de peso hizo necesario el sacrificio, lo que sugiere que ciertos aspectos del cáncer (tal como compresión medular) estaban ausentes en los ratones tratados con Cellax. La mediana de los tiempos de supervivencia de los grupos de control, DTX, y Cellax fue de 8, 9, y 15 días respectivamente (Figura 11B): Cellax

aumentó el tiempo de supervivencia 170 % en comparación con DTX, y 187 % en comparación con los ratones sin tratar. El análisis de histología de las secciones de tejido indicó que la carga de la enfermedad principal estaba en los pulmones (Fig. 11C), sin ninguna masa de tumor detectable en el corazón, hígado, bazo, riñones, cerebro o médula ósea. Mediante inspección visual, la carga de la enfermedad en los ratones tratados con Cellax fue menor en comparación con los ratones de control y DTX.

En el modelo de cáncer pancreático PAN02 en ratones EMT-6, el inicio de los síntomas se hizo evidente cinco días después de la inoculación, exhibiendo los ratones debilidad, falta de actividad, y pérdida de peso. En el sacrificio y la necropsia, se produjeron presentaciones variadas de cáncer: intestinos dilatados, nódulos tumorales localizados en la pared intraperitoneal y en los intestinos, páncreas dilatados, nódulos biliares dilatados y oscuros en el hígado, estómago hinchado, y fluido ascítico. Los ratones de control exhibieron síntomas seguidos en primer lugar por los ratones tratados con GEM 120 mg/kg, y como se muestra en la Figura 12, el declive fue rápido una vez se detectó el inicio de los síntomas. A diferencia de los ratones dosificados con solución salina y gemcitabina, los ratones de DTX y Cellax no exhibieron signos de pérdida de peso o síntomas de la enfermedad.

Un objetivo de este estudio fue desarrollar una nanopartícula terapéutica basada en carbohidrato de autoensamblado, y aumentar la eficacia y reducir la toxicidad del docetaxel. Como se describe en la Tabla 5, se complementaron los parámetros[2-3] de diseño de Ringsdorf con los requeridos para la formación de nanopartículas y mejora de la PK[7,12,28-30]. Para propiedades de formación de nanopartículas eficaces, se equilibraron los elementos hidrófobos e hidrófilos de la macromolécula, de modo que cuando estas estructuras anfifílicas entraran en contacto en solución acuosa, se ensamblaran espontáneamente en micelas termodinámicamente estables[52]. La CMC se considera generalmente segura (GRAS), y encuentra un amplio uso en biomateriales[76], formulaciones farmacéuticas[51], y alimentos[77]. A pesar de la presencia ubicua de la CMC en la formulación, solo un pequeño número de grupos ha examinado la formulación de nanopartículas usando CMC, y la mayoría de nonopartículas de polisacárido se formulan con derivados de quitosano, dextrano, heparina[52-60,78].

Tabla 5: parámetros de diseño para una nanopartícula de Cellax preferente

Parámetro de diseño	Composición	Fundamento
Polímero	Carboximetilcelulosa	Excipiente aprobado, disponible en el mercado, disponibles grupos funcionales para modificaciones.
Solubilidad	PEG, Pm = 2000	Papel doble como química de ocultación y agente de solubilización. PEG de mayor Pm más difícil de conjugar y purificación impedida.
Ocultación	PEG, Pm = 2000	Composición establecida y eficaz.
Fármaco	Docetaxel	Agente quimioterapéutico bien caracterizado. Hidrofóbico (conduce al autoensamblado de partículas).
Conector escindible	Éster	Hidrolizable, modelo de liberación lenta.
Fijación de diana	Pasiva (EPR)	Método conocido y eficaz de fijación de diana a tumor.
Equilibrio hidrófobo	Acetilación de CMC y DTX	Formación de partícula favorecida con DTX, la acetilación reduce la solubilidad en agua del polímero de CMC.

La CMC sódica es un polímero soluble en agua compuesto por unidades de repetición de anhidroglucosa, y es solo apenas soluble en disolventes orgánicos tales como DMF o DMSO[79]. En los esfuerzos sintéticos iniciales, el contraion sodio del ácido carboxílico se intercambió con trietilamina (TEA) o tetrabutilamonio (TBA)[80] con el fin de generar CMC soluble en disolventes. Sin embargo, la conversión de los grupos ácido carboxílico en ésteres de DTX y PEG usando química EDC/NHS fue baja (<10 %), y las partículas formadas usando estos materiales fueron heterogéneas en tamaño y propensas a la autoagregación. En la técnica publicada, el interés en la solubilidad en disolventes de la CMC ha sido principalmente del dominio de compañías de revestimiento químico y de polímeros, donde la compatibilidad de la CMC con otras resinas y las propiedades formadoras de dispersión de este material se optimizaron mediante ajuste de la solubilidad en disolventes a través de modificaciones químicas. Por ejemplo, Namikoshi[72] optimizó un proceso químico para la preparación de carboxialquil acetil celulosas, en el que la sal

sódica se convierte en un ácido libre, y los grupos hidroxilo se acetilan cuantitativamente en presencia de anhídrido acético y catalizador de ácido sulfúrico en un disolvente de ácido acético a 40-60 ºC. En esta reacción fue crítica la deshidratación completa del ácido libre antes de las reacciones de acetilación. Después de esta modificación, la CMC(Ac) de ácido libre soluble en disolventes se pudo hacer soluble en agua por conversión del ácido libre de nuevo en la sal sódica. Allen[81] describió un proceso similar para la acetilación de los grupos hidroxilo, pero añadió ácido sulfúrico después de la acetilación y calentó el polímero para hidrolizar parcialmente los ésteres de acetilo y conseguir solubilidad parcial en agua, con el fin de modular las propiedades de humectación y gelificación en formulaciones de revestimiento, y proporcionar sitios de reticulación para isocianatos o melamina. De particular interés en el presente documento de patente, los inventores indicaron que la esterificación posterior del grupo ácido carboxílico de cada unidad de anhidroglucosa era fuertemente dependiente del ácido carboxílico que estaba en forma de ácido libre. Estos informes se confirman en el presente trabajo, tanto en términos de perfiles de solubilidad como de la reactividad de los grupos ácido carboxílico.

El grado de sustitución (DS) por unidad de anhidroglucosa, como se especifica por parte del fabricante, fue 0,8 moles de ácido por mol de anhidroglucosa, con 2,2 moles de hidroxilo (convertidos posteriormente en grupos acetilo). Para una molécula de CMC(Ac), los presentes inventores pudieron calcular los moles teóricos de grupo acetilo y grupo ácido, y diseñar sistemas de conjugación en consecuencia. Los análisis mediante RMN ^{1}H confirmaron los cálculos de DS: mediante integración de los espectros de RMN de protón, se descubrió que la proporción de los protones de anhidroglucosa con respecto a los protones de acetilo estaba de acuerdo con la predicción. A un polímero de CMC(Ac) activado con EDC/NHS en DMF se alimentaron % en moles variables de mPEG-OH y % en moles variables de DTX (con respecto a los grupos ácido carboxílico), y mediante análisis por RMN ^{1}H estas reacciones produjeron un polímero con 0,9-5,4 % de DS con PEG y 13,4-26,4 % de DS con DTX. Mediante estimación por RMN ^{1}H y análisis del contenido de fármaco total (UV), la molécula de Cellax acabada contenía 22,5-43,3 % en peso de DTX y 3,5-22,7 % en peso de PEG. La varianza en el resultado de la síntesis se anticipó dada la polidispersidad del polímero de Cellax, y dado que se prepararon más lotes, se identificó la pureza de los disolventes de DMF y acetonitrilo como un factor importante para un resultado de reacción positivo.

Para las macromoléculas anfifílicas sintéticas tales como PEG-policaprolactona, es eficaz una pluralidad de enfoques de preparación de partícula[19-21,82]. Sin embargo, la producción de nanopartículas de Cellax bien definidas y estables probó ser más dependiente del método. Por ejemplo, el Cellax se disolvió en acetonitrilo o DMF, y esta solución se dializó frente a múltiples intercambios de agua para retirar el disolvente: el polímero se agregó invariablemente en masas. Del mismo modo, las metodologías de película delgada fueron ineficaces en la producción de nanopartículas bien definidas. La precipitación de una solución de MeCN o THF en medio acuoso (dilución 10x) probó ser la mejor aproximación para formar nanopartículas bien definidas, siempre que la concentración de Cellax en la solución de MeCN variara entre 10-25 mg/ml. Se observó que las partículas formadas a partir de soluciones de 25 mg/ml tenían un tamaño de aproximadamente 150 nm, y las partículas formadas a partir de soluciones de 10 mg/ml eran más pequeñas (100 nm). Para todo el trabajo posterior, se establecieron los parámetros de 10 mg/ml y de dilución 10x de modo que proporcionaran la población de nanopartículas bien definida más pequeña. Del mismo modo, la selección del tampón o el medio acuoso fue importante. Las partículas preparadas en PBS fueron inicialmente de una dimensión razonable, pero se agregaron en horas. Las partículas preparadas en cloruro sódico al 0,9 %, sacarosa al 10 %, o agua fueron estables, y mantuvieron sus dimensiones cuando se transfirieron a una solución al 50 % en volumen de FBS.

Antes del análisis *in vitro* o *in vivo*, se analizó la liberación de DTX de las nanopartículas de Cellax, para afirmar que se produciría la hidrólisis de los enlaces éster en presencia de suero. Las muestras de partículas incubadas en FBS se extrajeron con acetato de etilo, y mediante análisis por LC/MS, se detectaron dos picos con un valor de MS ES^{+} de 808,8 m/z, correspondiendo a DTX y a un isómero DTX, 7-epidocetaxel: estos picos se analizaron para generar un valor total de liberación de taxano[70,83-84]. Como se muestra en la Figura 4, la liberación de DTX en el curso de 21 días fue sostenida, culminando en la liberación completa, siendo la mitad de la cantidad de taxano total DTX activo. Estos datos se contextualizaron con respecto a los informes publicados sobre conjugados de taxanos. Por ejemplo, la liberación de PTX a partir de conjugados de albúmina solubles en agua es rápida, con 40 % de liberación en 1 día[68]. La liberación de DTX de conjugados de PEG es rápida, con liberación completa en 6 días[67]. La liberación de PTX de conjugados de ácido poliglutámico es comparativamente lenta, con liberación de 15-30 % registrada en 4-5 días[85-86]. En ausencia de estudios detallados de topografía molecular para los ejemplos de conjugados solubles en agua, se supone que el fácil acceso de las enzimas hidrolíticas a los enlaces éster que unen el taxano a la macromolécula produce una elevada velocidad de hidrólisis. El Cellax (como Polyglumex) está compuesto por una cadena de polímero con taxanos hidrófobos conjugados a lo largo de la longitud de la molécula: el modelado molecular de Polyglumex indica que las interacciones entre las moléculas de taxanos conducen al colapso de la cadena de polímero para formar una partícula con un interior hidrófobo y un exterior hidrófilo[87]. Para el Cellax, el estado condensado del polímero y la adición de ocultación de PEG parece controlar la hidrólisis de forma eficaz, pero con una velocidad mayor que la informada para Polyglumex.

Se midió la actividad de liberación de DTX *in vitro* siguiendo la viabilidad de líneas celulares cancerígenas en presencia de partículas de Cellax. Tanto el carcinoma de mama EMT-6 como el carcinoma de pulmón LL/2 mostraron sensibilidad al DTX libre de conformidad con los informes publicados[88-89] y, significativamente, las células expuestas a Cellax exhibieron una mayor supresión de la viabilidad en comparación con el DTX libre, cuando se suministró el DTX en una dosis en bolo. El DTX es un fármaco antineoplásico antimitótico que se une a la tubulina e

impide la replicación celular, induciendo finalmente apoptosis y muerte celular[90]. Las células que sobreviven a la exposición inicial al DTX pueden continuar replicándose en ausencia de una administración posterior de DTX. En el estudio de dosis metronómica con las líneas celulares de EMT-6 y LL/2, en los que se aplicó la dosis CI_{50} de DTX en cuatro dosis separadas a lo largo de dos días, la viabilidad de las líneas celulares fue inferior, con valores de CI_{50} comparables a los del Cellax (Tabla 3). En comparación con el DTX libre, el polímero de Cellax libera DTX de forma continua, y este modelo de liberación sostenida puede representar una modalidad preferente para esta clase de fármaco. Diversos informes recientes han enfatizado el beneficio de la exposición continua a DTX, a diferencia de la liberación súbita. Por ejemplo, De Souza informó que la liberación de DTX i.p. a partir de un gel de quitosano/laurinaldehído/fosfatidilcolina de huevo/DTX (DTX-$PoLi_{gel}$) exhibió una actividad considerable frente a tumores de ovario xenoinjertados SKOV3-luc en comparación con el tratamiento intermitente con DTX[91]. En estudios preclínicos y clínicos, se ha demostrado que la administración de dosis inferiores y más frecuentes de agente quimioterapéutico (terapia metronómica) mejora la eficacia, atribuyéndose los efectos al aumento de muerte celular y efectos antiangiogénicos[92-93]. Otros investigadores de conjugados de DTX y PTX han indicado el aumento de los valores de CI_{50} de sus formulaciones. Por ejemplo, Esmaeili *et al.* informaron que albúmina-DTX es más eficaz que DTX, y atribuyeron este efecto a la mejora del transporte transendotelial[68]. En el presente estudio, los presentes inventores verificaron en las líneas de carcinoma de mama EMT-6 y de pulmón LL/2 un beneficio de la terapia metronómica in vitro y, de forma interesante, los valores de CI_{50} de Cellax y DTX metronómico fueron equivalentes. Las opiniones actuales mantienen que la acumulación de conjugados de polímero en el compartimento del tumor no solo liberará más fármaco localmente, sino que se puede internalizar de forma estacionaria por parte de las células (mediante pinocitosis o interacciones mediadas por un receptor específico), lo que conduce al aumento de la liberación del fármaco en el citoplasma[1,47]. Ciertos conjugados (incluyendo Xyotax y entidades HPMA) parecen circunvalar la resistencia a múltiples fármacos (MDR) y las rutas p-gp, una ventaja sobre las terapias de molécula pequeña que a menudo se enfrentan a limitaciones de MDR[47,94]. En este punto del estudio, no se ha dilucidado el mecanismo mediante el cual el Cellax mejora el efecto, y representa un objetivo para estudios posteriores.

Como se ha establecido en el ensayo *in vitro*, el componente de PEG-celulosa del vehículo de la nanopartícula es soluble en agua y no es tóxico para las líneas celulares murinas de carcinoma de mama EMT-6 y de pulmón LL/2. Además, en un estudio de MTD de ratones Balb/c, no se midió ninguna pérdida de peso o toxicidad observable durante un período de 1 semana después de 20 y 40 mg/kg de DTX equivalentes de Cellax, en comparación con la toxicidad suave medida en ratones tratados con 20 y 40 mg/kg de DTX libre (Fig 5B). Para dosis superiores a 85 y 170 mg/kg de Cellax, se observó toxicidad mínima, y no se pudo establecer una MTD verdadera para Cellax en un ensayo de dosis única ya que la concentración de partículas alcanza un máximo de 15 mg DTX/ml, o una concentración de 50 mg de polímero de Cellax / ml. No se pudo detectar ninguna indicación de toxicidad en los órganos en los ratones Balb/c y C57/BL6 con la dosificación de 40 mg/kg para Cellax (Figura 8B), pero la toxicidad renal y pulmonar fue un problema para la terapia de DTX. Con dosis elevadas de 170 mg/kg de Cellax, no se detectó ninguna anomalía en los órganos mediante análisis de histología e inmunohistoquímica (no se muestran los datos).

Se llevó a cabo el análisis por MRI de partículas de Cellax cargadas con SPION para medir la acumulación tumoral, y establecer residencias estimadas para estas partículas. Las SPION generan gradientes de susceptibilidad magnética local que se difasan rápidamente cerca de magnetización transversal y producen un buen contraste negativo en las imágenes por MRI[41,95]. Se conoce a partir del experimento preliminar que examina la SPION en una microplaca que el tiempo de relajación de la señal T2 es apreciable (>100 ms) para concentraciones razonables (Figura 3A). Como se observa en las Figuras 3 B y C, la intensidad de T2 y T2* del tejido tumoral antes de la inyección es mayor que los tejidos circundantes. Después de la inyección (Figuras 3D y 3E) las partículas de Cellax-SPION se acumularon en áreas discretas, muchas cerca de la superficie del tumor, creando un perímetro visible sobre las dos secciones nodulares del tumor. En el curso de tres días, las partículas permanecieron fácilmente visibles, y dado que el volumen del tumor continuó expandiéndose, la distribución de las partículas se repartió más en volumen, pero permaneció concentrada dentro de las ubicaciones originales. Como se muestra en la Figura 3F, la fracción de volumen de vóxeles hipointensos (contraste) que corresponde a Cellax-SPION presenta un pico en 24 horas, y comienza a disminuir a las 72 horas. Dado que el volumen del tumor continuó creciendo durante el período de estudio de 72 horas, no se sabe en este punto si la reducción de la fracción de volumen hipointenso se debió a la eliminación de las SPION o se debió solo al aumento del volumen del tumor.

El tratamiento de dosis única de tumores EMT-6 con Cellax produjo una notable reducción en el crecimiento tumoral (Figura 7A) en comparación con los controles ($p < 0,001$) y DTX solo ($p < 0,05$). En comparación con las micelas cargadas no covalentemente con taxanos, el conjugado de Cellax rindió bien. Por ejemplo, Garrec *et al.* cargaron micelas de copolímero de polivinilpirrolidona-ácido poliláctico con PTX y dosificaron con 60 mg/kg en el día 0, 1, 2, 7, 8 y 9, y consiguieron reducciones marginales no significativas en el volumen del tumor en el día 14. Los autores indicaron de la rápida eliminación de PTX de las micelas y tuvieron en cuenta la rápida repartición de PTX desde las micelas[96]. La conjugación del taxano a un polímero parece mejorar considerablemente la PK y la eficacia. Por ejemplo, Li informó sobre polyglumex (Xyotax) e informó la mejora de la PK[85] y una excelente respuesta frente a tumores de ovario (OCA-1) en ratones con cura a 160 mg/kg. A 80 mg/kg, la eficacia de PTX-polyglumex mejoró en comparación con PTX, pero no curó los tumores. Xyotax fue eficaz (aunque menos en comparación con el estudio de OCA-1) en la reducción del crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de SCOV3ip1 y MDA-MB-231, y en modelos de sarcoma hepatocelular singenéico[98]. El estudio piloto de eficacia de Cellax se llevó a cabo para concentraciones que igualan la dosis de DTX y Cellax (40 mg/kg), y Cellax demostró una ventaja significativa sobre

DTX solo. El análisis de histología de los tumores EMT-6 indicó que DTX y Cellax induce apoptosis (Figura 8A, tinción de TUNEL), induciendo Cellax considerablemente más apoptosis en comparación con DTX ($p < 0,001$) o los controles ($p < 0,0001$), en cierto modo contrario a los análisis de apoptosis en el estudio de polyglumex de Li[97], donde el índice de apoptosis fue de hecho menor para polyglumex. Se observa el mismo patrón de necrosis tisular tanto en el estudio de Li como en los tumores tratados con Cellax y, además, los índices de CD31 (angiogénesis) y Ki67 (replicación celular) para los tumores tratados con Cellax son considerablemente inferiores en comparación con los controles ($p < 0,0001$) y los tumores tratados con DTX ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente). Del mismo modo, el tratamiento de dosis única de tumores de LL/2 con Cellax redujo considerablemente el crecimiento tumoral en comparación con los controles y los tumores tratados con DTX (Figura 7B), aunque no en el mismo grado que se observa con el modelo EMT-6. De forma interesante, los tumores de LL/2 tratados con DTX no mostraron ningún signo de apoptosis (Figura 9B) y no se limitó el crecimiento tumoral en comparación con los controles (Figura 7B). Los presentes inventores extendimos nuestro análisis de la línea celular de mama EMT-6 a un estudio metastásico, para determinar si esta forma particularmente agresiva de tumor se podía tratar de forma eficaz con Cellax. Mediante análisis de histología, las células EMT-6 inyectadas i.v. se acumularon principalmente en los pulmones (Figura 11C), con una reducción visible del volumen tumoral para los ratones tratados con Cellax (40 mg/kg). Como se observa en las Figuras 11A y 11B, la pérdida de peso se redujo y la supervivencia de los ratones se prolongó considerablemente con el tratamiento de Cellax y, de forma importante, no se detectaron signos visibles de dolor o distrés incluyendo piloerección, parálisis de las patas posteriores, temblores, y apatía en los ratones tratados con Cellax, pero estos síntomas fueron evidentes para los ratones de control y tratados con DTX, siendo necesario su sacrificio. Dado que los ratones de control exhibieron estos síntomas del mismo modo, es improbable que los problemas físicos estuvieran relacionados con neuropatía inducida por DTX (un grave efecto secundario limitante de dosis para docetaxel), que en su lugar se debieron a los efectos de la extensión del cáncer metastásico[100]. Docetaxel está en ensayos clínicos para terapia frente a cáncer pancreático que se ha metastatizado al espacio i.p., y en consecuencia, este estudio también examinó el efecto de Cellax frente a esta forma de cáncer. Los ratones inoculados con células PAN02 (y no tratados) exhibieron signos de enfermedad cinco días después de la inoculación (Figura 12), y experimentaron un rápido declive. El tratamiento con 120 mg/kg de gemcitabina no confirió un aumento de beneficios significativo a los ratones. Por el contrario, los ratones tratados con DTX y Cellax (40 mg/kg) no presentaron síntomas durante períodos más prolongados, y la supervivencia también se prolongó significativamente.

En resumen, los presentes inventores informaron en este ejemplo la síntesis de una macromolécula basada en carboximetilcelulosa que contenía un fármaco hidrófobo, docetaxel, y una unidad de PEG, una estructura diseñada para ensamblarse en nanopartículas bien definidas en soluciones acuosas. La celulosa es un material bien conocido y biocompatible con un perfil de seguridad extenso. Los métodos para preparar las partículas de Cellax se optimizaron para producir partículas a escala de 100 nm con una cmc de 0,1 mg/ml, un contenido de 37 % en peso de DTX, y 5 % en peso de PEG. Las partículas de Cellax aumentan la MTD para docetaxel en modelos de ratón hasta > 170 mg/kg en comparación con 40 mg/kg para DTX libre, y son más eficaces que DTX frente a líneas de cáncer de mama y de pulmón murino *in vivo*. Un tratamiento de dosis única de 40 mg/kg de Cellax minimizó de forma eficaz el crecimiento de los tumores de costado de EMT-6 y LL/2 murinos: el análisis inmunohistoquímico e histológico indicó un aumento de la apoptosis en los tumores tratados con Cellax, y una reducción de la formación de microvasos y de la replicación celular. Además, Cellax fue particularmente eficaz frente a un modelo de cáncer de mama metastásico en ratones Balb/c, y los estudios adicionales investigarán el mecanismo mediante el cual Cellax duplica el tiempo de supervivencia y reduce los síntomas clínicos de metástasis ósea y compresión medular.

Ejemplo 3: partículas de camptotecina, doxorrubicina (DOX) y paclitaxel

La síntesis de Camptotecina-PEG-CMC ilustra que los fármacos muy hidrófobos se pueden conjugar con éxito a CMC-Ac, permitiendo el suministro de fármacos de otro modo insolubles. Se usó un esquema sintético y de purificación diferente al de DTX, adaptado a la química y la solubilidad específicas de este compuesto.

La conjugación de DOX a la CMC-Ac fue sintéticamente satisfactoria, pero los materiales no poseen las propiedades de autoensamblado requeridas para la formación de nanopartículas, destacando el requisito de un fármaco hidrófobo en el diseño de este sistema de suministro de fármacos.

Paclitaxel y docetaxel son ambos fármacos anticancerígenos usados habitualmente, y la preparación de análogos de PTX y DTX siguió procesos sintéticos y de purificación equivalentes.

Ejemplo 4: análogos de PEG5000 de Cellax

Es preferente el uso PEG con un Pm = 2000, ya que la extracción del exceso de PEG mediante valoración es sencilla. Sin embargo, los conjugados de PEG de Pm mayor pueden mejorar la PK de ciertas nanopartículas, y por lo tanto se sintetizó un análogo de PEG5000: el material demuestra las propiedades pesadas de autoensamblado.

Ejemplo 5: análogos de CMC de Pm inferior

La CMC está disponible en una diversidad de Pm, pero se caracteriza principalmente por la viscosidad y el grado de sustitución debido a las dificultades en analizar el Pm, como entenderá un experto en la materia. Una variante

producida con CMC (Pm de 20.000) produjo una partícula de 140 nm.

Ejemplo 6: análisis por TEM de la partícula de Cellax

Se llevó a cabo el análisis del Cellax por TEM. Los datos del tamaño de partícula a partir de las medidas de Zetasizer y TEM son similares (100-120 nm).

Ejemplo 7: incorporación de CMT en una partícula de Cellax

Se ha demostrado la incorporación de entidades hidrofóbicas tales como CMT (y SPION): el tamaño de partícula es estable y similar para las partículas de Cellax, y se observa una alta eficacia de incorporación. La incorporación no covalente de fármaco o agentes de formación de imágenes proporcionan partículas multifuncional es que contienen más de un fármaco o funcionalidad de formación de imágenes.

Aunque en la presente memoria se han descrito realizaciones preferentes de la invención, los expertos en la materia entenderán que se pueden realizar variaciones en las mismas sin apartarse del ánimo de la invención o del alcance de las reivindicaciones anexas. Todas las referencias que se mencionan en la presente memoria, incluyendo la siguiente lista de referencias, se incorporan por referencia en su totalidad.

Lista de referencias

1. Li C, Wallace S. Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology. Adv Drug Deliv Rev. 2008 Mayo de 22;60(8):886-98.

2. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. Nat Rev Drug Discov. Mayo de 2003; 2(5):347-60.

3. Ringsdorf H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. Journal of Polymer Science, Polymer Symposia. 1975;51:135-53.

4. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. J Pharm Sci. Abril de 1994;83(4):601-6.

5. Seymour LW, Duncan R, Strohalm J, Kopecek J. Effect of molecular weight (Mw) of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats. J Biomed Mater Res. Noviembre de 1987;21(11):1341-58.

6. Duncan R. Development of HPMA copolymer-anticancer conjugates: clinical experience and lessons learnt. Adv Drug Deliv Rev. 12 de noviembre de 2009;61(13):1131-48.

7. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanisms of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Research. 1986;46:6387-92.

8. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, *et al.* Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. Am J Pathol. Abril de 2000;156(4):1363-80.

9. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, *et al.* Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. Proc Natl Acad Sci USA. 14 de abril de 1998;95(8):4607-12.

10. Greish K. Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. Methods Mol Biol. 2010;624:25-37.

11. Greish K. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. J Drug Target. Agosto-Septiembre de 2007;15(7-8):457-64.

12. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, *et al.* Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. Cancer Res. 1 de septiembre de 1995;55(17):3752-6.

13. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. Clin Pharmacokinet. 2003;42(5):419-36.

14. Drummond DC, Noble CO, Hayes ME, Park JW, Kirpotin DB. Pharmacokinetics and *in vivo* drug release rates in liposomal nanocarrier development. J Pharm Sci. Noviembre de 2008;97(11):4696-740.

15. Lindner LH, Hossann M. Factors affecting drug release from liposomes. Curr Opin Drug Discov Devel. Enero de 2010;13(1):111-23.

16. Hamaguchi T, Kato K, Yasui H, Morizane C, Ikeda M, Ueno H, *et al.* A phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation. Br J Cancer. 16 de julio de 2007;97(2): 170-6.

17. Hamaguchi T, Matsumura Y, Suzuki M, Shimizu K, Goda R, Nakamura I, *et al.* NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend *in vivo* antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. Br J Cancer. 11 de abril de 2005;92(7):1240-6.

18. Lavasanifar A, Samuel J, Kwon GS. Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 21 de febrero de 2002;54(2):169-90.

19. Ahmed F, Pakunlu RI, Brannan A, Bates F, Minko T, Discher DE. Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. J Control Release. 28 de noviembre de 2006;116(2):150-8.

20. Discher DE, Ahmed F. Polymersomes. Annu Rev Biomed Eng. 2006;8:323-41.

21. Katz JS, Levine DH, Davis KP, Bates FS, Hammer DA, Burdick JA. Membrane stabilization of biodegradable polymersomes. Langmuir. 21 de abril de 2009;25(8):4429-34.

22. Svenson S, Tomalia DA. Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field. Adv Drug Deliv Rev. 14 de diciembre de 2005;57(15):2106-29.

23. Tekade RK, Kumar PV, Jain NK. Dendrimers in oncology: an expanding horizon. Chem Rev. Enero de 2009;109(1):49-87.

24. Tomalia DA, Reyna LA, Svenson S. Dendrimers as multi-purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging. Biochem Soc Trans. Febrero de 2007;35(Pt 1):61-7.

25. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. Drug Discov Today. Octubre de 2010;15(19-20):842-50.

26. Gaucher G, Marchessault RH, Leroux JC. Polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral delivery of taxanes. J Control Release. 2 de abril de 2010;143(1):2-12.

27. Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. Mol Pharm. Julio-Agosto de 2008;5(4):496-504.

28. Harris JM, Zalipsky S, American Chemical Society. Division of Polymer Chemistry., American Chemical Society. Meeting. Poly(ethylene glycol): chemistry and biological applications. Washington, DC: American Chemical Society; 1997.

29. Immordino ML, Dosio F, Cartel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. Int J Nanomedicine. 2006;1(3):297-315.

30. Owens DE, 3rd, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. Int J Pharm. 3 de enero de 2006;307(1):93-102.

31. Harris JM, Martin NE, Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. Clin Pharmacokinet. 2001;40(7):539-51.

32. Wang X, Li J, Wang Y, Cho KJ, Kim G, Gjyrezi A, *et al.* HFT-T, a targeting nanoparticle, enhances specific delivery of paclitaxel to folate receptor-positive tumors. ACS Nano. 27 de octubre de 2009;3(10):3165-74.

33. Dubey PK, Mishra V, Jain S, Mahor S, Vyas SP. Liposomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting. J Drug Target. Junio de 2004;12(5):257-64.

34. Shishido T, Mieda H, Hwang SY, Nishimura Y, Tanaka T, Ogino C, *et al.* Affibody-displaying bionanocapsules for specific drug delivery to HER2-expressing cancer cells. Bioorg Med Chem Lett. 1 de octubre de 2010;20(19):5726-31.

35. Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, *et al.* Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. Cancer Res. 1 de julio de 2006;66(13):6732-40.

36. Harding FA, Stickler MM, Razo J, Dubridge RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. MAbs. Mayo de 2010;2(3):256-65.

37. Koning GA, Kamps JA, Scherphof GL. Interference of macrophages with immunotargeting of liposomes. J Liposome Res. Febrero-Mayo de 2002;12(1-2):107-19.

38. Andresen TL, Jensen SS, Jorgensen K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release. Prog Lipid Res. Enero de 2005;44(1):68-97.

39. Landais P, Meresse V, Ghislain JC. Evaluation and validation of diagnostic tests for guiding therapeutic decisions. Therapie. Mayo-Junio de 2009;64(3): 187-201.

40. 40. de Smet M, Heijman E, Langereis S, Hijnen N, Grull H. Magnetic resonance imaging of high intensity focused ultrasound mediated drug delivery from temperature sensitive liposomes; An *in vivo* proof-of-concept study. J Control Release. 5 de noviembre de 2010.

41. Branca RT, Cleveland ZI, Fubara B, Kumar CS, Maronpot RR, Leuschner C, *et al.* Molecular MRI for sensitive and specific detection of lung metastases. Proc Natl Acad Sci USA. 23 de febrero de 2010;107(8):3693-7.

42. Kaida S, Cabral H, Kumagai M, Kishimura A, Terada Y, Sekino M, *et al.* Visible drug delivery by supramolecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model. Cancer Res. 15 de septiembre de 2010;70(18):7031-41.

43. Hoang B, Lee H, Reilly R, Allen C. Non-Invasive Monitoring of the Fate of IIIIn-Labeled Block Copolymer Micelles by High Resolution and High Sensitivity MicroSPECT/CT Imaging. Mol Pharm. 2 de febrero de 2009.

44. Saravanakumar G, Min KH, Min DS, Kim AY, Lee CM, Cho YW, *et al.* Hydrotropic oligomer-conjugated glycol chitosan as a carrier of paclitaxel: synthesis, characterization, and *in vivo* biodistribution. J Control Release. 16 de diciembre de 2009;140(3):210-7.

45. Lim WT, Tan EH, Toh CK, Hee SW, Leong SS, Ang PC, *et al.* Phase I pharmacokinetic study of a weekly liposomal paclitaxel formulation (Genexol-PM) in patients with solid tumors. Ann Oncol. Febrero de 2010;21(2):382-8.

46. Letchford K, Liggins R, Wasan KM, Burt H. *In vitro* human plasma distribution of nanoparticulate paclitaxel is dependent on the physicochemical properties of poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) nanoparticles. Eur J Pharm Biopharm. Febrero de 2009;71(2): 196-206.

47. Duncan R. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. Nat Rev Cancer. Septiembre de 2006;6(9):688-701.

48. Morais JM, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. AAPS J. Junio de 2010; 12(2): 188-96.

49. Ertel SI, Ratner BD, Kaul A, Schway MB, Horbett TA. *In vitro* study of the intrinsic toxicity of synthetic surfaces to cells. J Biomed Mater Res. Junio de 1994;28(6):667-75.

50. Santerre JP, Woodhouse K, Laroche G, Labow RS. Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials. Biomaterials. Diciembre de 2005;26(35):7457-70.

51. FDA. Inactive Ingredients Database. Rockville; 2010.

52. Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. Adv Drug Deliv Rev. 14 de diciembre de 2008;60(15):1650-62.

53. Janes KA, Calvo P, Alonso MJ. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. Adv Drug Deliv Rev. 23 de marzo de 2001;47(1):83-97.

54. Prabaharan M. Artículo de revisión: chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. J Biomater Appl. Julio de 2008;23(1):5-36.

55. Prabaharan M, Mano JF. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. Drug Deliv. Enero-Febrero de 2005;12(1):41-57.

56. Cera C, Palumbo M, Stefanelli S, Rassu M, Palu G. Water-soluble polysaccharide-anthracycline conjugates: biological activity. Anticancer Drug Des. Abril de 1992;7(2): 143-51.

57. Uglea CV, Parv A, Corjan M, Dumitriu AD, Ottenbrite RM. Biodistribution and antitumor activity induced by carboxymethylcellulose conjugates. Journal of Bioactive and Compatible Polymers. 2005;20:571-83.

58. Auzenne E, Ghosh SC, Khodadadian M, Rivera B, Farquhar D, Price RE, *et al.* Hyaluronic acid-paclitaxel: antitumor efficacy against CD44(+) human ovarian carcinoma xenografts. Neoplasia. Junio de 2007;9(6):479-86.

59. Inoue K, Kumazawa E, Kuga H, Susaki H, Masubuchi N, Kajimura T. CM-dextran-polyalcohol-camptothecin conjugate: DE-310 with a novel carrier system and its preclinical data. Adv Exp Med Biol. 2003;519:145-53.

60. Soepenberg O, de Jonge MJ, Sparreboom A, de Bruin P, Eskens FA, de Heus G, *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of DE-310 in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res. 15 de enero de 2005;11(2 Pt 1):703-11.

61. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. J Pharmacol Toxicol Methods. Julio-Agosto de 2000;44(1):235-49.

62. Singla AK, Garg A, Aggarwal D. Paclitaxel and its formulations. Int J Pharm. 20 de marzo de 2002;235(1-2): 179-92.

63. Shelley WB, Talanin N, Shelley ED. Polysorbate 80 hypersensitivity. Lancet. 20 de mayo de 1995;345(8960):1312-3.

64. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. Eur J Cancer. Septiembre de 2001;37(13):1590-8.

65. Jones S. Head-to-head: Docetaxel challenges paclitaxel. EJC Supplements. 2006;4:4-8.

66. Etrych T, Sirova M, Starovoytova L, Rihova B, Ulbrich K. HPMA copolymer conjugates of paclitaxel and docetaxel with pH-controlled drug release. Mol Pharm. 2 de agosto de 2010;7(4):1015-26.

67. Liu J, Zahedi P, Zeng F, Allen C. Nano-sized assemblies of a PEG-docetaxel conjugate as a formulation strategy for docetaxel. J Pharm Sci. Agosto de 2008;97(8):3274-90.

68. Esmaeili F, Dinarvand R, Ghahremani MH, Amini M, Rouhani H, Sepehri N, *et al.* Docetaxel-albumin conjugates: preparation, *in vitro* evaluation and biodistribution studies. J Pharm Sci. Agosto de 2009;98(8):2718-30.

69. Hou W, Watters JW, McLeod HL. Simple and rapid docetaxel assay in plasma by protein precipitation and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 25 de mayo de 2004;804(2):263-7.

70. Kumar D, Tomar RS, Deolia SK, Mitra M, Mukherjee R, Burman AC. Isolation and characterization of degradation impurities in docetaxel drug substance and its formulation. J Pharm Biomed Anal. 12 de marzo de 2007;43(4):1228-35.

71. Kerns EH, Volk KJ, Hill SE, Lee MS. Profiling taxanes in Taxus extracts using lc/ms and lc/ms/ms techniques. J Nat Prod. Octubre de 1994;57(10): 1391-403.

72. Namikoshi H, inventor Daicel Chemical Industries Ltd, assignee. Carboxyalkyl acetyl celluloses, their salts and a process for the preparation of them. USA. 1985.

73. Sun S, Zeng H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. J Am Chem Soc. 17 de julio de 2002;124(28):8204-5.

74. Zhang X, Jackson JK, Burt HM. Determination of surfactant critical micelle concentration by a novel fluorescence depolarization technique. J Biochem Biophys Methods. 5 de febrero de 1996;31(3-4):145-50.

75. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. J Histochem Cytochem. Enero de 1993;41(1):7-12.

76. FDA. Home> Medical Devices> Products and Medical Procedures> Device Approvals and Clearances: OP-1 Putty - H020008. 2010.

77. FDA. Database of Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Reviews. 2010.

78. Sugahara S, Kajiki M, Kuriyama H, Kobayashi TR. Complete regression of xenografted human carcinomas by a paclitaxel-carboxymethyl dextran conjugate (AZ10992). J Control Release. 22 de enero de 2007;117(1):40-50.

79. Charpentier D, Mocanu G, Carpov A, Chapelle S, Merle L, Muller G. New hydrophobically modified carboxymethylcellulose derivitives. Carbohydrate Polymers. 1997;33:177-86.

80. Facchini A, Segatti F, inventors; LIMA Lto SpA, assignee. N-methyl-amine derivitives of Carboxymethylcellulose, alginic acid N-methyl-amide or carboxymethyl starch. 2005.

81. Allen JM, Wilson AK, Luca PL, Curtis LG, inventors; Process for preparing carboxyalkyl cellulose esters. USA patent 5792856. 1998.

82. Fairley N, Hoang B, Allen C. Morphological control of poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone) copolymer aggregates in aqueous solution. Biomacromolecules. Septiembre de 2008;9(9):2283-91.

83. Fanzioni S, Hovda K, Livi V, KcKennon M, Siviero L, Spoonemore H, inventors; Cell Therapeutics, assignee. Method for determining the amount of conjugated taxane in polyglut acid - taxne conjugates. USA. 2010.

84. Kerns EH, Volk KJ, Hill SE. Profiling new taxanes using LC/MS and LC/MS/MS substructural analysis techniques. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 1995;9:1539-45.

85. Li C, Newman RA, Wu QP, Ke S, Chen W, Hutto T, *et al.* Biodistribution of paclitaxel and poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate in mice with ovarian OCa-1 tumor. Cancer Chemother Pharmacol. 2000;46(5):416-22.

86. Wang X, Zhao G, Van S, Jiang N, Yu L, Vera D, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of PGG-paclitaxel, a novel macromolecular formulation of paclitaxel, in nu/nu mice bearing NCI-460 lung cancer xenografts. Cancer Chemother Pharmacol. Febrero de 2010;65(3):515-26.

87. Feng Z, Zhao G, Yu L, Gough D, Howell SB. Preclinical efficacy studies of a novel nanoparticle-based formulation of paclitaxel that out-performs Abraxane. Cancer Chemother Pharmacol. Abril de 2010;65(5):923-30.

88. Liu B, Yang M, Li R, Ding Y, Qian X, Yu L, *et al.* The antitumor effect of novel docetaxel-loaded thermosensitive micelles. Eur J Pharm Biopharm. Junio de 2008;69(2):527-34.

89. EU. Assessment Report: Docefrez. In: Agency EM, editor. Londres; 2010.

90. Yvon AM, Wadsworth P, Jordan MA. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. Mol Biol Cell. Abril de 1999;10(4):947-59.

91. De Souza R, Zahedi P, Mariyama E, H., Allen C, Wilson BC, Paquette-Miller M. Continuous docetaxel chemotherapy improves therapeutic efficacy in murine models of ovarian cancer. Molecular Cancer Therapeutics. 2010;9(6):1820-30.

92. Lord R, Nair S, Schache A, Spicer J, Somaihah N, Khoo V, *et al.* Low dose metronomic oral cyclophosphamide for hormone resistant prostate cancer: a phase II study. J Urol. Junio de 2007;177(6):2136-40; discusión 40.

93. Kamat AA, Kim TJ, Landen CN, Jr., Lu C, Han LY, Lin YG, *et al.* Metronomic chemotherapy enhances the efficacy of antivascular therapy in ovarian cancer. Cancer Res. 1 de enero de 2007;67(1):281-8.

94. Singer JW, Shaffer S, Baker B, Bernareggi A, Stromatt S, Nienstedt D, *et al.* Paclitaxel poliglumex (XYOTAX; CT-2103): an intracellularly targeted taxane. Anticancer Drugs. Marzo de 2005;16(3):243-54.

95. Dias MHM, Lauterbur PC. Ferromagnetic particles as contrast agents for magnetic resonance imaging of liver and spleen. Megnetic Resonance in Medicine. 1986;3:328-30.

96. Le Garrec D, Gori S, Luo L, Lessard D, Smith DC, Yessine MA, *et al.* Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: *in vitro* and *in vivo* evaluation. J Control Release. 14 de septiembre de 2004;99(l):83-101.

97. Li C, Yu DF, Newman RA, Cabral F, Stephens LC, Hunter N, *et al.* Complete regression of well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate. Cancer Res. 1 de junio de 1998;58(11):2404-9.

98. Li C, Price JE, Milas L, Hunter NR, Ke S, Yu DF, *et al.* Antitumor activity of poly(L-glutamic acid)-paclitaxel on syngeneic and xenografted tumors. Clin Cancer Res. Abril de 1999;5(4):891-7.

99. Hilkens PH, Verweij J, Vecht CJ, Stoter G, van den Bent MJ. Clinical characteristics of severe peripheral neuropathy induced by docetaxel (Taxotere). Ann Oncol. Febrero de 1997;8(2):187-90.

100. Sasaki A, Boyce BF, Story B, Wright KR, Chapman M, Boyce R, *et al.* Bisphosphonate risedronate reduces metastatic human breast cancer burden in bone in nude mice. Cancer Res. 15 de agosto de 1995;55(16):3551-7.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende una carboximetilcelulosa acetilada (CMC-Ac) unida covalentemente a: al menos un poli(etilenglicol) (PEG), y al menos un fármaco hidrófobo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que las uniones covalentes son uniones éster.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que el al menos un fármaco hidrófobo es un agente anticancerígeno.

4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que el agente anticancerígeno es docetaxel, camptotecina o paclitaxel.

5. El compuesto de la reivindicación 3 o 4, en el que el al menos un PEG es poli(etilenglicol) metil éter (mPEG) que tiene un M_n promedio entre aproximadamente 550 y aproximadamente 10.000, preferentemente aproximadamente 2000, opcionalmente en el que la CMC consiste entre aproximadamente 95 y 3600 unidades de monómero, preferentemente aproximadamente 3500 unidades de monómero, opcionalmente además en el que la proporción molar de (grupos acetilo de CMC-Ac):(grupos ácido carboxílico de CMC-Ac/PEG/fármaco hidrófobo) está entre aproximadamente 2,5:0,5 - 1,8:1,2, preferentemente aproximadamente 2,18:0,82, opcionalmente además en el que el mPEG está presente en una cantidad de aproximadamente 3,5-22,7 % en peso, y el docetaxel está presente en una cantidad de aproximadamente 22,5-43,3 % en peso, preferentemente en el que el mPEG está presente en una cantidad de aproximadamente 4,7-5,3 % en peso, y el docetaxel está presente en una cantidad de aproximadamente 30,1-39,5 % en peso, más preferentemente en el que el mPEG está presente en una cantidad de 4,7 % en peso, y el docetaxel está presente en una cantidad de 36,9 % en peso.

6. El compuesto de la reivindicación 5, en el que la proporción molar de mPEG:docetaxel:(grupos ácido carboxílico de CMC-Ac) es de aproximadamente 0,9:13,4:85,7 a aproximadamente 5,4:26,4:68,2, según se estima mediante análisis por RMN ^1H, preferentemente, en el que la proporción molar de mPEG:docetaxel:(grupos ácido carboxílico de CMC-Ac) es aproximadamente de 1:15,1:83,6 a 1,1:23,7:75,3, y más preferentemente 1:20,1:78,5.

7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la CMC-Ac está unida covalentemente además al menos a un agente de formación de imágenes, preferentemente Cy5.5.

8. Composición de nanopartículas de autoensamblado que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

9. La composición de nanopartículas de autoensamblado de la reivindicación 8, en la que la composición tiene una concentración micelar crítica (cmc) de aproximadamente 0,1 mg/ml.

10. La composición de nanopartículas de autoensamblado de la reivindicación 8 o 9, en la que las nanopartículas tienen un diámetro medio de aproximadamente 49-278 nm y/o con un intervalo de 16 - 396 nm.

11. La composición de nanopartículas de autoensamblado de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, que comprende además al menos un agente hidrófobo encapsulado en la misma, seleccionado preferentemente entre un agente de formación de imágenes o un agente terapéutico, preferentemente en la que el al menos un agente de formación de imágenes es una nanopartícula de óxido de hierro superparamagnético (SPION), preferentemente entre 7-30 % en peso de SPION, y más preferentemente aproximadamente 30 % en peso de SPION.

12. Composición farmacéutica que comprende la composición de nanopartículas de autoensamblado de una cualquiera de las reivindicaciones 8-11 y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

13. Proceso para preparar una composición de nanopartículas de autoensamblado que comprende:

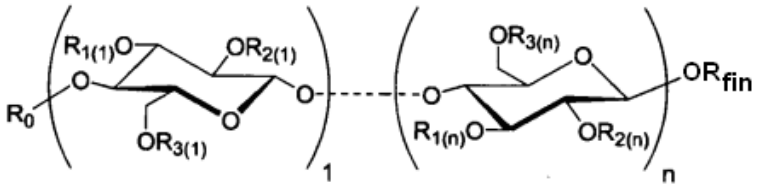
a) unir covalentemente al menos un PEG y al menos un fármaco hidrófobo a una CMC-Ac;

b) aislar el producto de la etapa (a);

c) disolver el producto aislado de la etapa (b) en un disolvente orgánico adecuado, preferentemente DMF o DMSO y más preferentemente THF o acetonitrilo, para formar una solución;

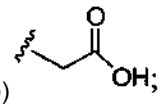
d) añadir la solución de la etapa (c) gota a gota a una solución acuosa en condiciones adecuadas para formar la composición de nanopartículas de autoensamblado.

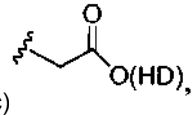
14. Un compuesto de la reivindicación 1, representado por la fórmula:



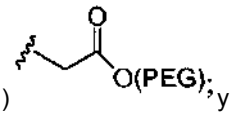
en la que R_0, $R_{1(1)}...R_{1(n)}$, $R_{2(1)}...R_{2(n)}$, $R_{3(1)}...R_{3(n)}$, y R_{fin} se seleccionan cada uno independientemente entre:

(a) acetilo;

(b) 

(c) 

en la que -O(HD) representa un fármaco hidrófobo que tiene un punto de unión a través de un grupo hidroxilo; o

(d) 

y

n es un número entero > 94;

preferentemente en el que el fármaco hidrófobo es uno de docetaxel, camptotecina y paclitaxel; y

preferentemente en la que el PEG es m(PEG).

15. El compuesto de la reivindicación 14, en el que la proporción de (a):(b+c+d) es aproximadamente 2,18 : 0,82.

16. El compuesto de la reivindicación 15, en el que n es entre aproximadamente 95 y 3600 unidades de monómero, preferentemente aproximadamente 3500.

Figura 1

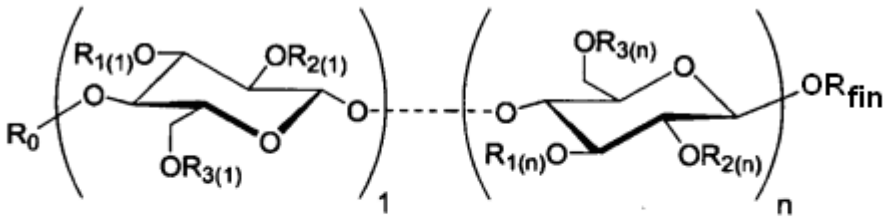


Figura 2

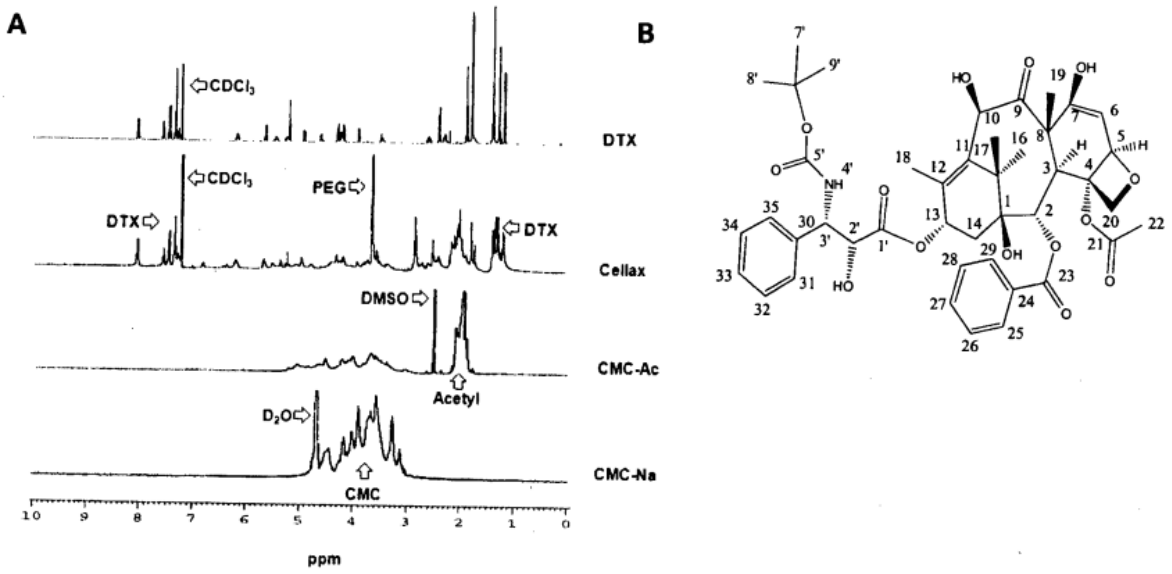

A
B
CDCl3
DTX
CDCl3
PEG
DTX
DTX
Cellax
DMSO
CMC-Ac
Acetyl
D2O
CMC-Na
CMC
10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0
ppm

Figura 3

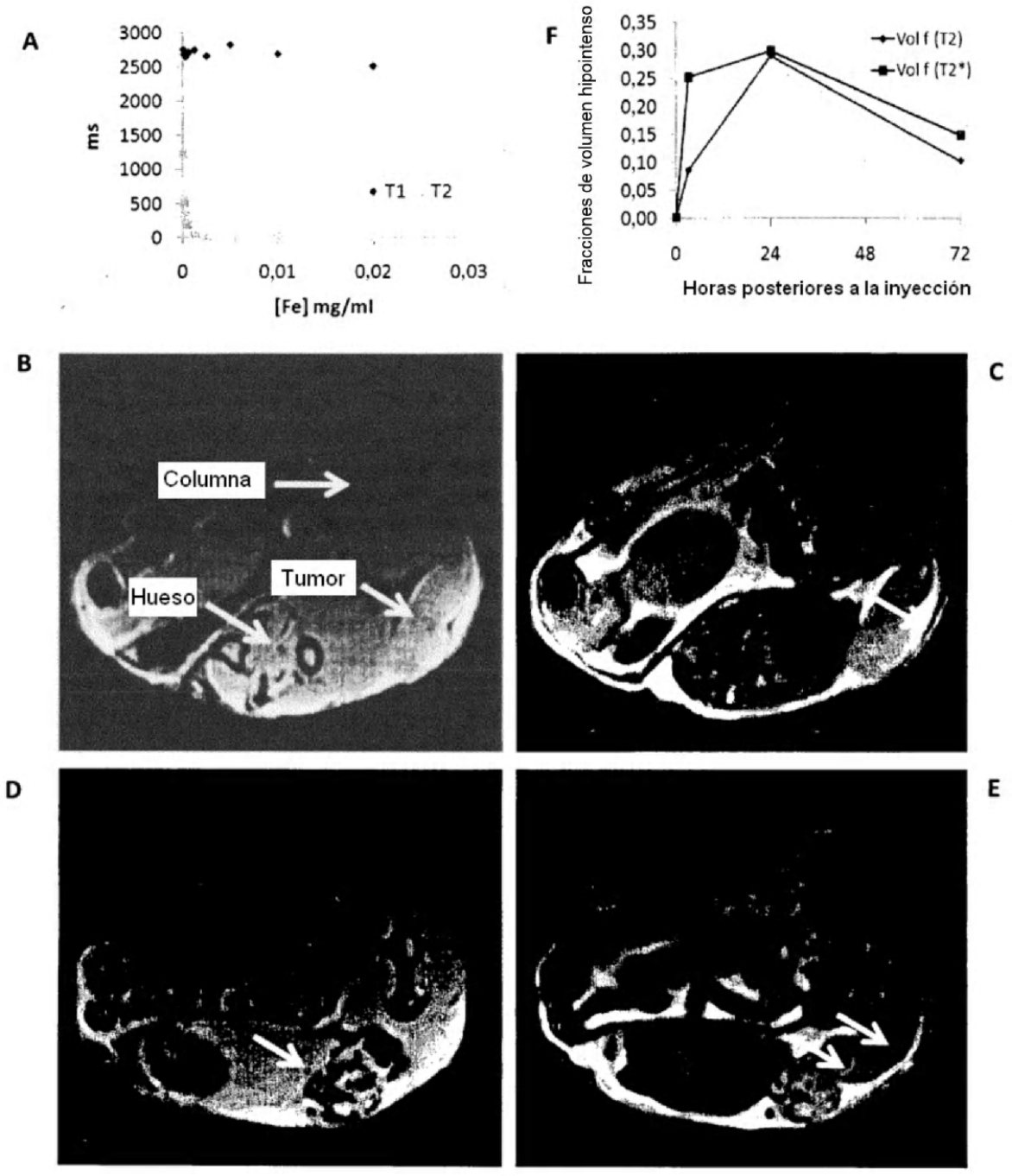

A
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
ms
T1
T2
0
0,01
0,02
0,03
[Fe] mg/ml
F
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Fracciones de volumen hipointenso
Vol f (T2)
Vol f (T2*)
0
24
48
72
Horas posteriores a la inyección
B
Columna
Tumor
Hueso
C
D
E

Figura 4

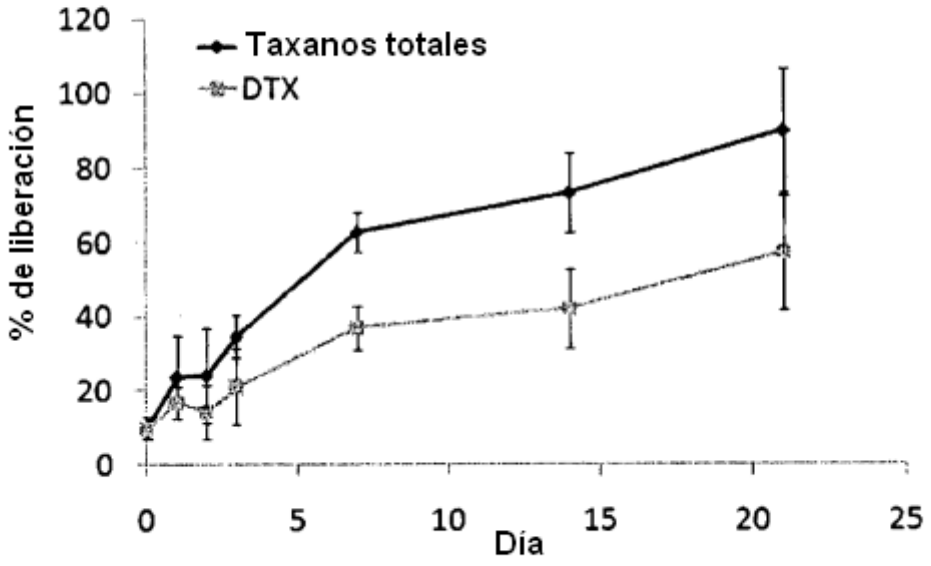

120
100
80
60
40
20
0
% de liberación
Taxanos totales
DTX
0
5
10
15
20
25
Día

Figura 5

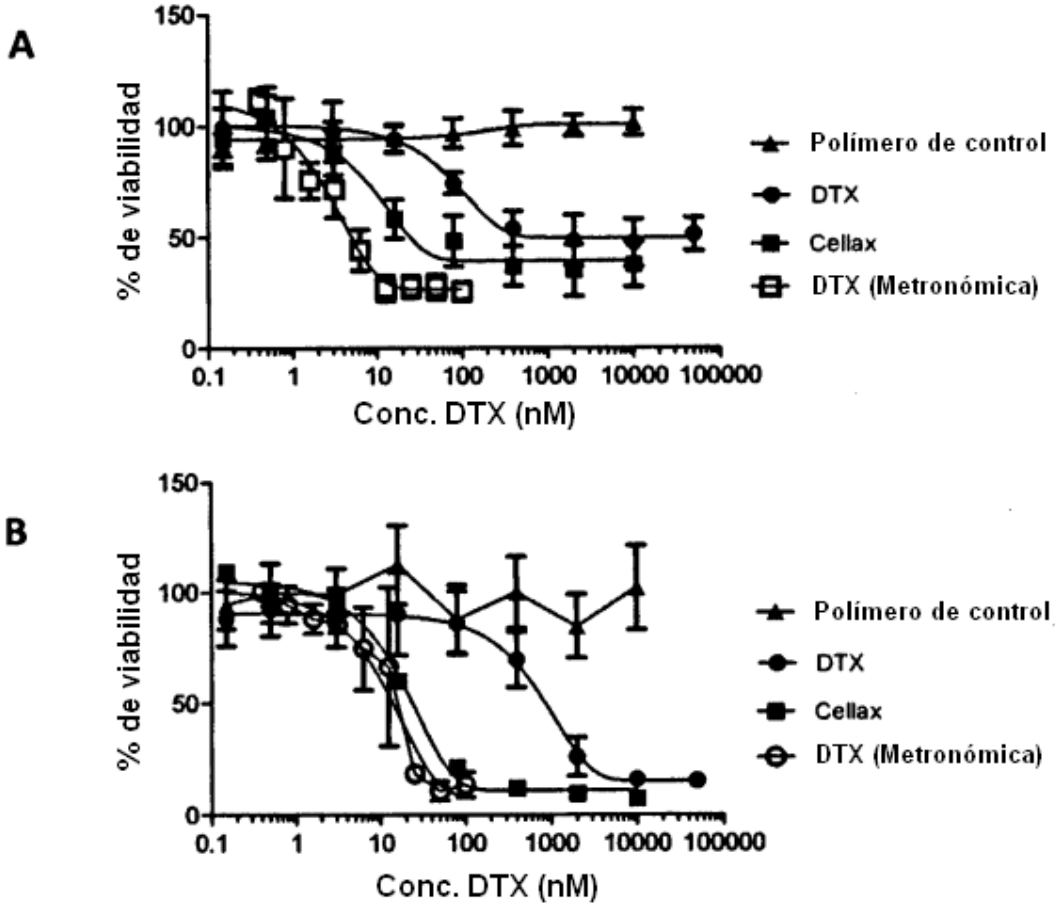

A
150
100
50
0
% de viabilidad
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
Conc. DTX (nM)
Polímero de control
DTX
Cellax
DTX (Metronómica)
B
150
100
50
0
% de viabilidad
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
Conc. DTX (nM)
Polímero de control
DTX
Cellax
DTX (Metronómica)

Figura 6

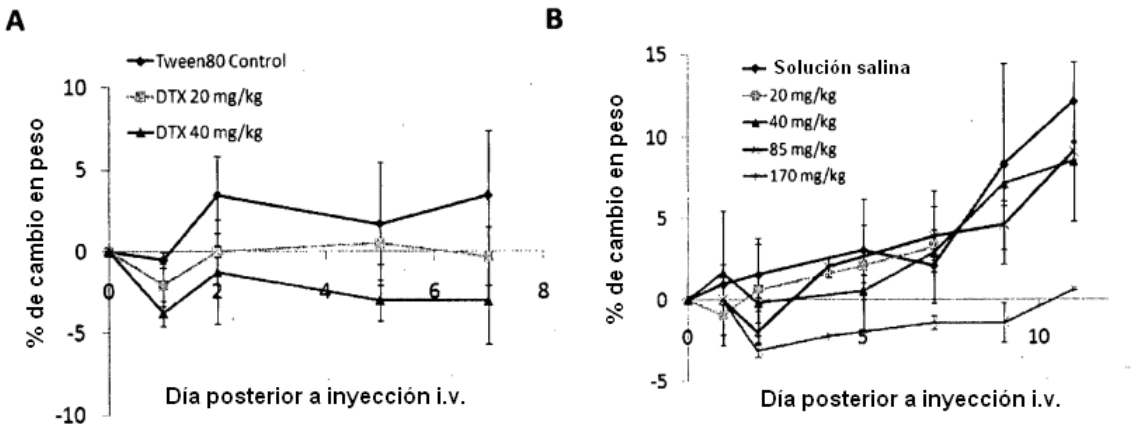

A
Tween80 Control
DTX 20 mg/kg
DTX 40 mg/kg
% de cambio en peso
Día posterior a inyección i.v.
B
Solución salina
20 mg/kg
40 mg/kg
85 mg/kg
170 mg/kg
% de cambio en peso
Día posterior a inyección i.v.

Figura 7

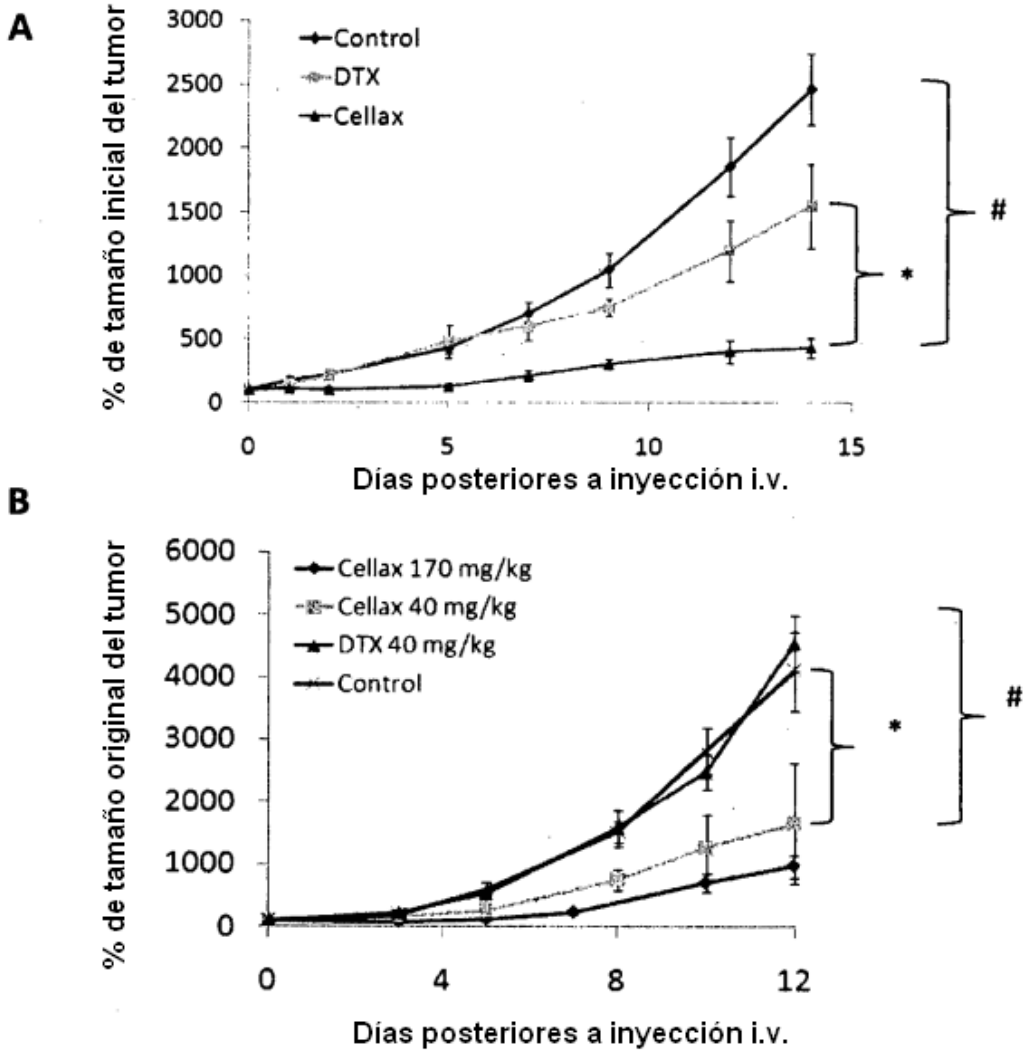

A
% de tamaño inicial del tumor
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Control
DTX
Cellax
*
#
0
5
10
15
Días posteriores a inyección i.v.
B
% de tamaño original del tumor
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Cellax 170 mg/kg
Cellax 40 mg/kg
DTX 40 mg/kg
Control
*
#
0
4
8
12
Días posteriores a inyección i.v.

Figura 8A

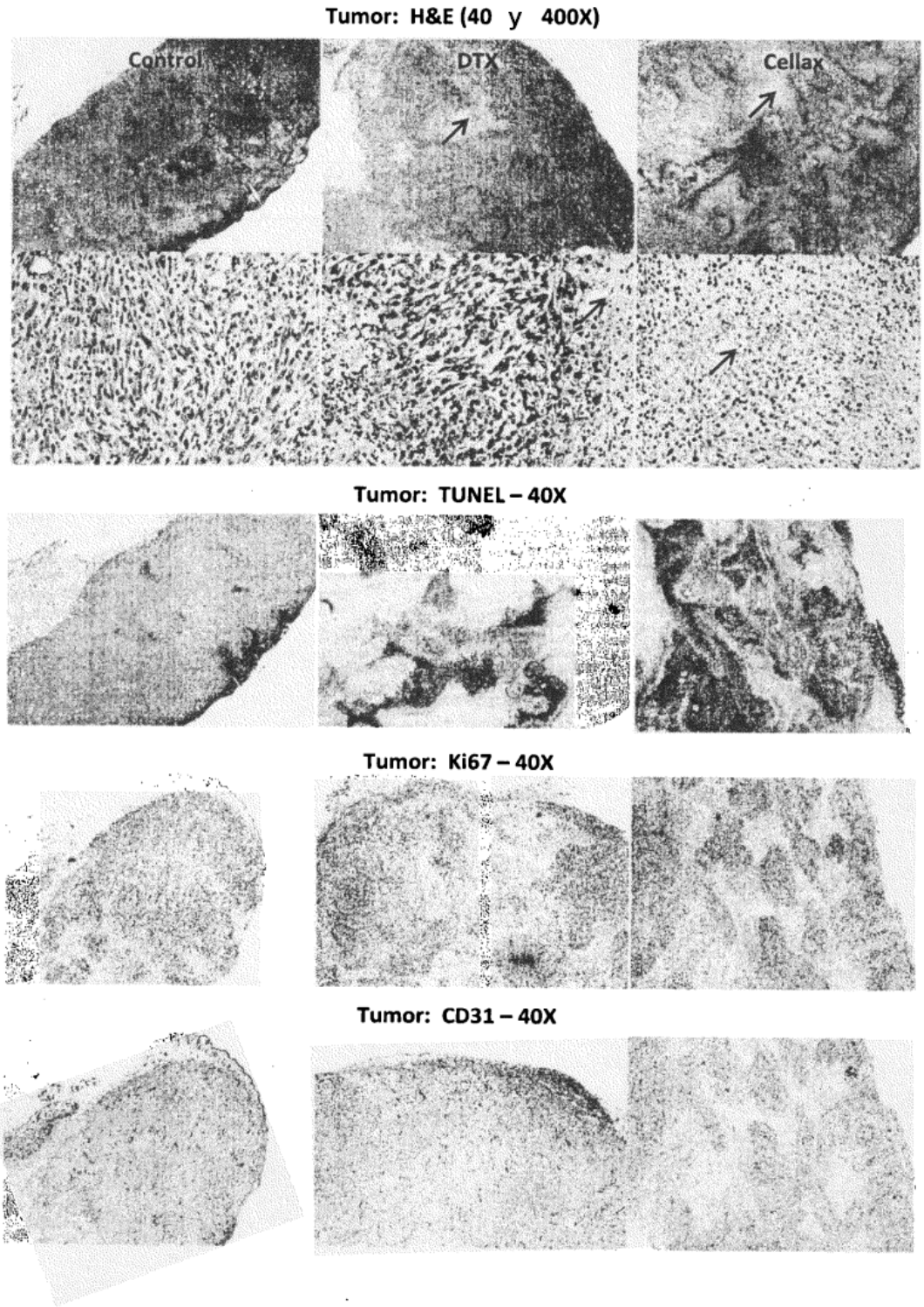

Tumor: H&E (40 y 400X)
Control
DTX
Cellax
Tumor: TUNEL – 40X
Tumor: Ki67 – 40X
Tumor: CD31 – 40X

Figura 8B

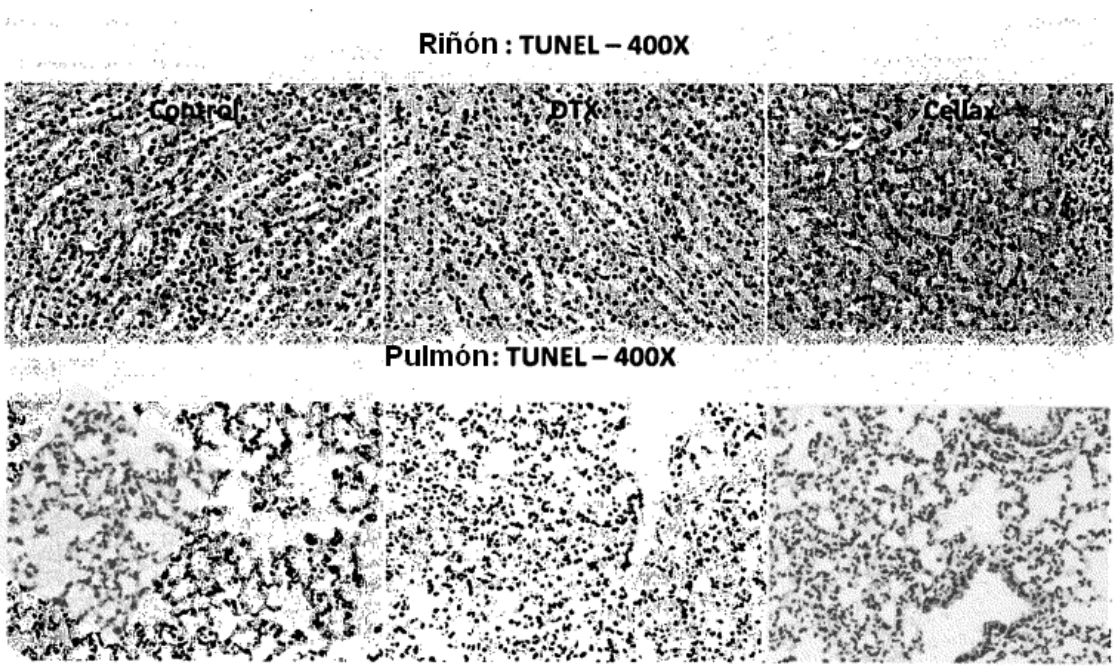


Figura 9

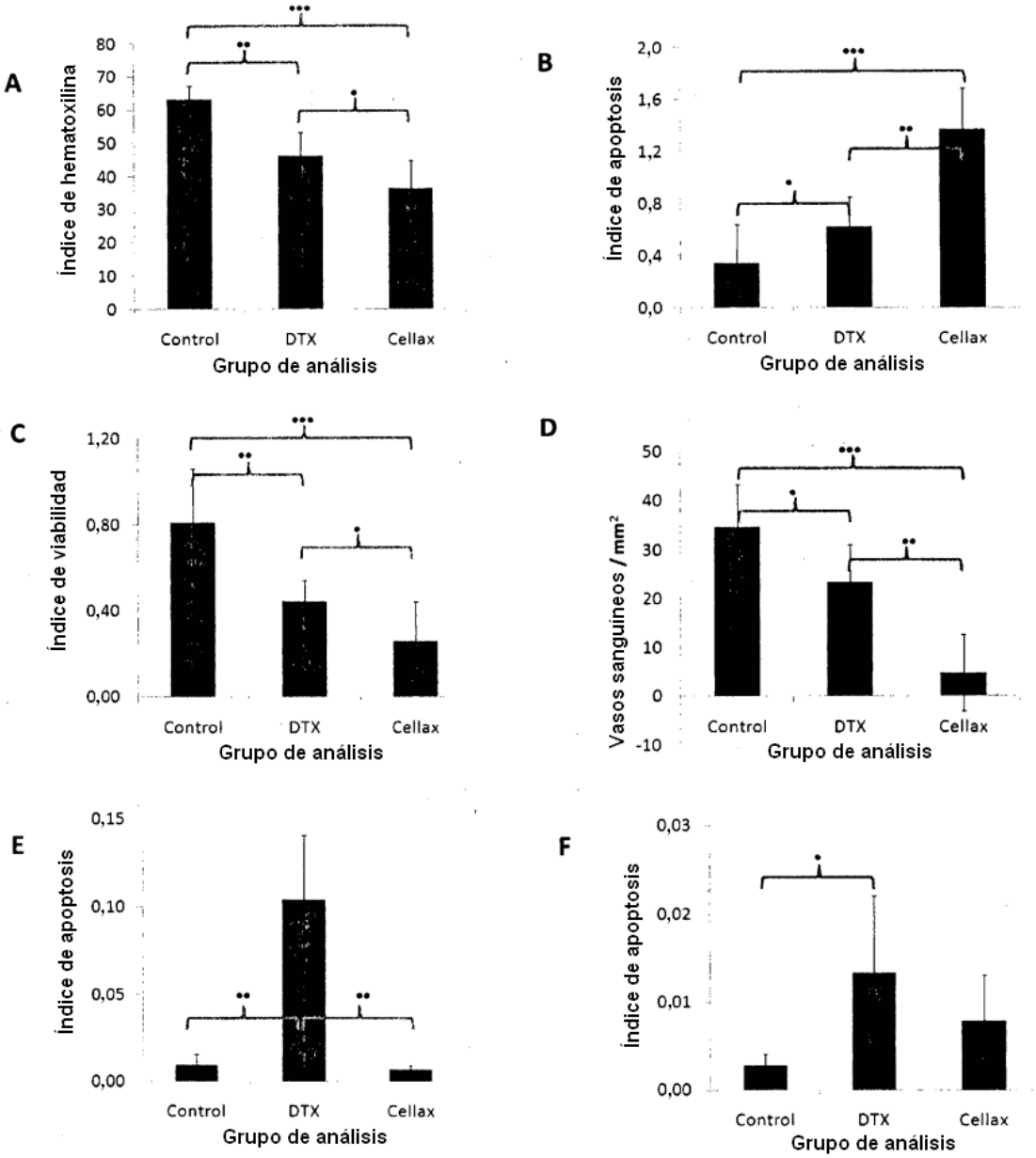

A
Índice de hematoxilina
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
DTX
Cellax
Grupo de análisis
B
Índice de apoptosis
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
0,0
Control
DTX
Cellax
Grupo de análisis
C
Índice de viabilidad
1,20
0,80
0,40
0,00
Control
DTX
Cellax
Grupo de análisis
D
Vasos sanguineos / mm²
50
40
30
20
10
0
-10
Control
DTX
Cellax
Grupo de análisis
E
Índice de apoptosis
0,15
0,10
0,05
0,00
Control
DTX
Cellax
Grupo de análisis
F
Índice de apoptosis
0,03
0,02
0,01
0,00
Control
DTX
Cellax
Grupo de análisis

Figura 10

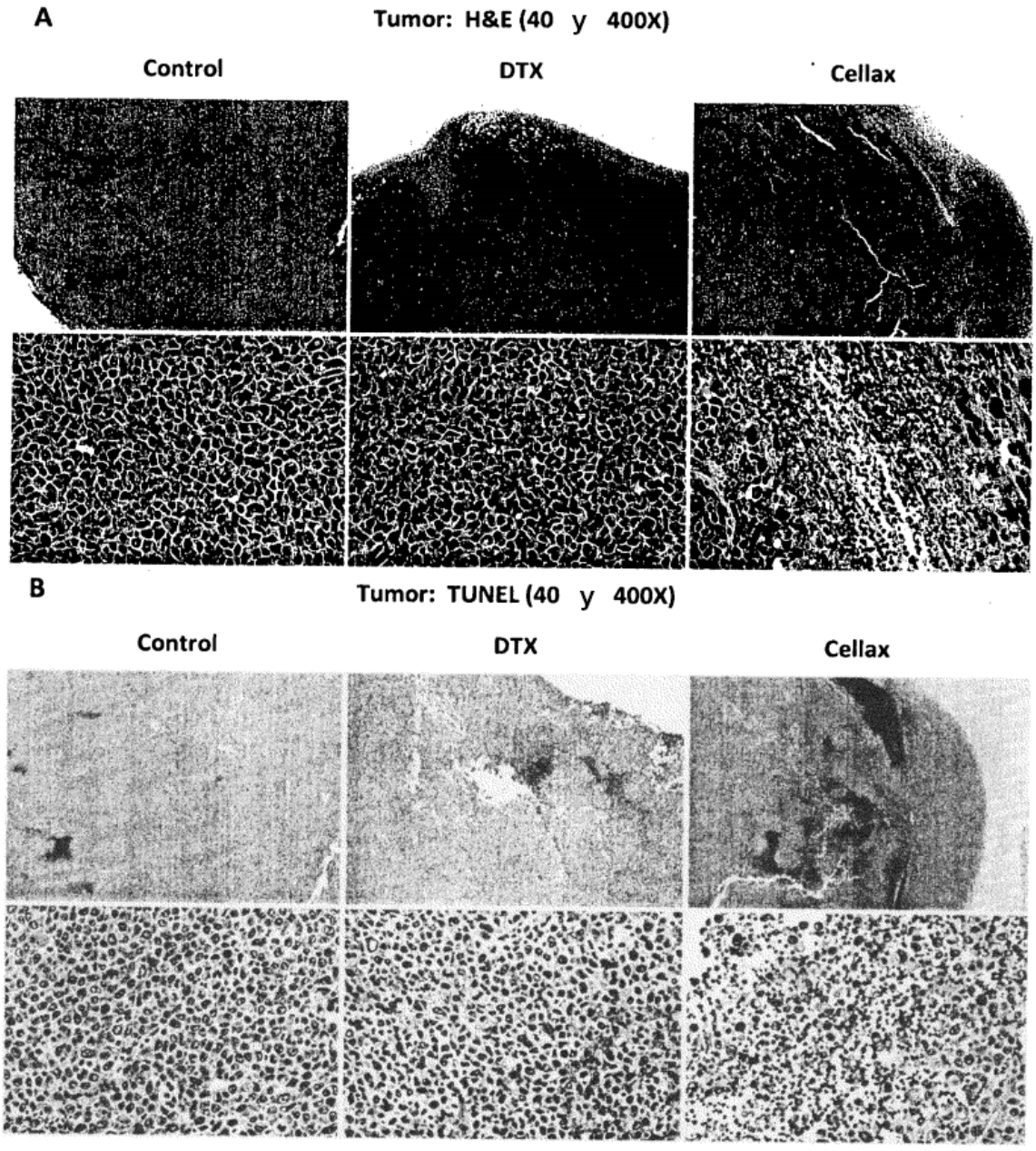

A
Tumor: H&E (40 y 400X)
Control
DTX
Cellax
B
Tumor: TUNEL (40 y 400X)
Control
DTX
Cellax

Figura 11

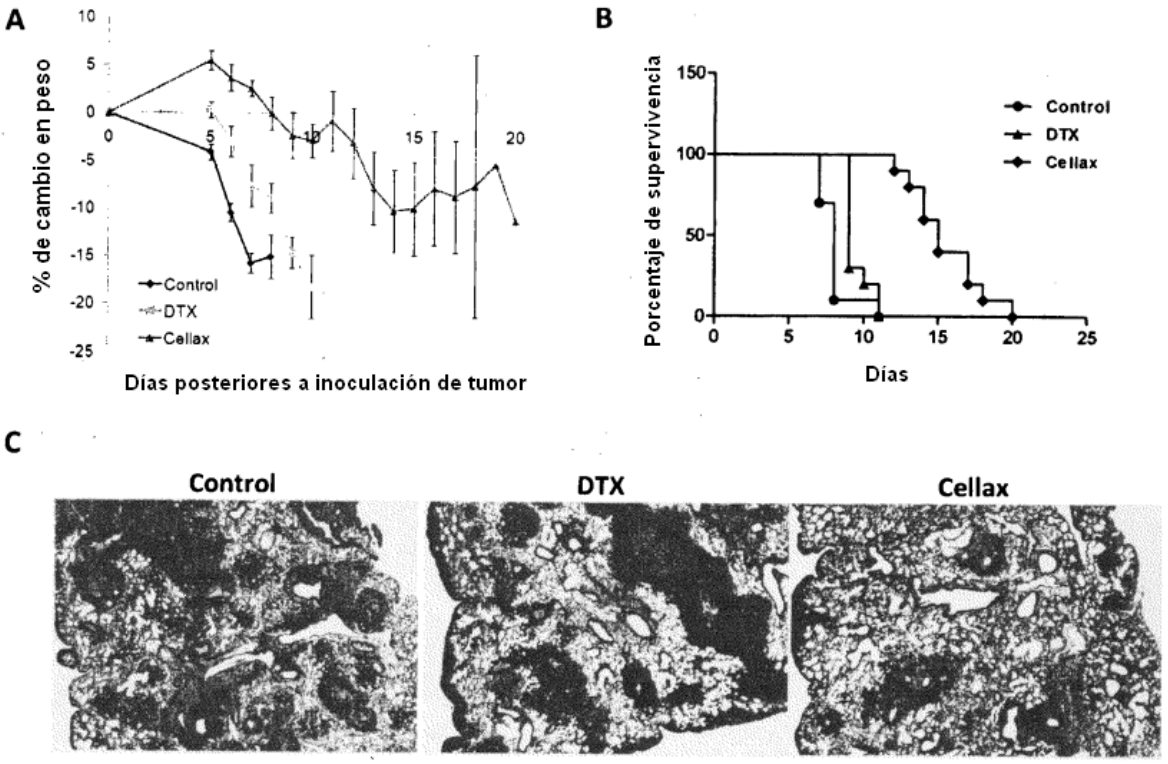
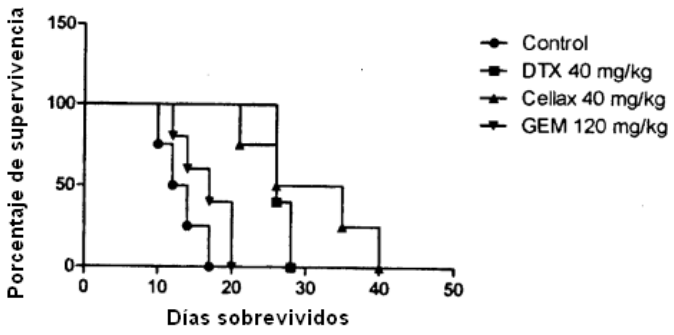



Figura 12