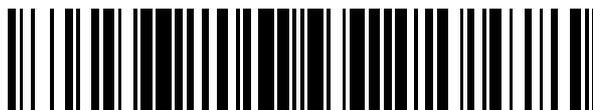


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 955**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12713673 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2691116**

54 Título: **Nanopartículas cargadas con fármaco antitumoral quimioterápico**

30 Prioridad:

31.03.2011 EP 11305364

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

19.07.2016

73 Titular/es:

**ONXEO (100.0%)
49, boulevard du General Martial Valin
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**PISANI, EMILIA;
LEBEL-BINAY, SOPHIE y
POLARD, VALÉRIE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 577 955 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas cargadas con fármaco antitumoral quimioterápico

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la medicina, y en particular de la oncología. Se refiere a un tratamiento de cáncer, en particular carcinoma hepatocelular, con Nanopartículas cargadas con al menos un fármaco antitumoral quimioterápico.

10

Antecedentes de la invención

El cáncer se caracteriza por un crecimiento no controlado de células asociado con comportamiento maligno: invasión y metástasis. Es una causa principal de mortalidad en la mayoría de los países industrializados. Pueden usarse diferentes modos de tratamiento del cáncer: quimioterapia, radioterapia, cirugía, inmunoterapia y hormonoterapia.

15

La quimioterapia puede definirse como el uso de agentes antitumorales quimioterápicos para tratar el cáncer. En líneas generales, la mayoría de los agentes antitumorales quimioterápicos funcionan alterando la mitosis (división celular) o la síntesis de ADN, seleccionando como diana eficazmente células en rápida división.

20

Los agentes antitumorales quimioterápicos se administran lo más a menudo por vía parenteral, digno de mención por vía intravenosa (i.v.) o por vía intraarterial (i.a.). La quimioterapia i.v. o i.a. puede administrarse a lo largo diferentes periodos de tiempo, dependiendo del fármaco y el tipo de cáncer que va a tratarse.

25

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el quinto cáncer más común en hombres (523.000 casos en todo el mundo) y el séptimo en mujeres (226.000 casos en todo el mundo), y la mayor parte de la carga es en países en desarrollo, en los que se produce casi el 85% de los casos, y particularmente en hombres: la razón hombre/mujer global es de aproximadamente 4/1. Las regiones de alta incidencia son el este y el sureste de Asia, África central y occidental, pero también Melanesia y Micronesia/Polinesia. Se estiman tasas bajas en regiones desarrolladas, con la excepción del sur de Europa donde la incidencia en hombres (ASR 10,5 por 100.000) es significativamente superior que en otras regiones desarrolladas (Globocan 2008, OMS, International Agency for Research on Cancer (IARC), Cancer Incidence and Mortality Worldwide 2008).

30

35

Hubo 694.000 muertes estimadas por cáncer de hígado en 2008 (477.000 en hombres, 217.000 en mujeres) y, debido a su alta letalidad (razón global de mortalidad con respecto a incidencia de 0,93), el cáncer de hígado es la tercera causa más común de muerte por cáncer en todo el mundo. La distribución geográfica de las tasas de mortalidad es similar a la observada para la incidencia (Globocan 2008, OMS, International Agency for Research on Cancer (IARC), Cancer Incidence and Mortality Worldwide 2008).

40

Habitualmente, se produce CHC en personas que padecen cirrosis o enfermedad hepática crónica (EHC). Todos los factores que favorecen el desarrollo de EHC o cirrosis son en consecuencia factores de riesgo para CHC. Los principales factores etiológicos son infección por virus de la hepatitis B (VHB; 53%), infección por virus de la hepatitis C (VHC; 25%), enfermedades hepáticas alcohólicas (EHA; 15-43%) o trastornos dismetabólicos tales como esteatohepatitis no alcohólica (EHNA; 20%) obesidad y diabetes. Otros factores son menos frecuentes: hemocromatosis, otras enfermedades hepáticas inflamatorias o biliares crónicas. Las aflatoxinas, producidas por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* que crecen en cereales, cacahuetes y otros productos alimenticios, son agentes hepatotóxicos y la exposición crónica a estas micotoxinas conduce a desarrollo de CHC. Los efectos de productos químicos están debatiéndose todavía y no son prominentes.

45

50

Las estrategias terapéuticas actuales para CHC pueden dividirse en tratamientos curativos tales como intervenciones quirúrgicas (resección tumoral y trasplante de hígado), intervenciones percutáneas (inyección de etanol, ablación térmica por radiofrecuencia) o tratamientos paliativos tales como intervenciones transarteriales (principalmente quimioembolización transarterial o TACE), terapias sistémicas y estrategias experimentales (H.C. Spangenberg, R. Thimine, H.E. Blum, *Biologics: Targets & Therapy*, 2008, 2(3), 453). En pacientes cuidadosamente seleccionados, la resección y el trasplante de hígado permiten una supervivencia a los 5 años del 60% al 70%. Desafortunadamente, la mayoría de los pacientes en los países occidentales presentan un CHC intermedio o avanzado en el diagnóstico, con la incapacidad consecuente para usar estos tratamientos curativos (L. Faloppi, M. Scartozzi, E. Maccaroni, P.M. Di Pietro, R. Berardi, M. Del Prete, S. Cascinu, *Cancer Treat. Rev.*, 2011, 37(3), 169).

55

60

Entre los tratamientos paliativos, se ha mostrado que el enfoque intraarterial con quimioembolización (TACE) induce respuestas objetivas en el 16-55% de los pacientes, aunque muchos ensayos aleatorizados no mostraron ningún beneficio de supervivencia. Desafortunadamente, se sabe que TACE va acompañada a menudo por efectos secundarios graves como insuficiencia hepática o disfunción renal (K. Kamada, T. Nakanishi, M. Kitamoto, H. Aikata, Y. Kawakami, K. Ito, T. Asahara, G. Kajiyama, *J. Vasc. Interv. Radiol.*, 2001, 12(7), 847).

65

Hasta hace poco, no estaba disponible ninguna terapia para pacientes con HCC avanzados que prolongara la

supervivencia global (SG), indicando la necesidad de nuevas terapias dirigidas (H.C. Spangenberg, R. Thimine, H.E. Blum, *Biologics: Targets & Therapy*, 2008, 2(3), 453). En 2007 y por primera vez, sorafenib (Nexavar®), un inhibidor multicitinasa, mostró un aumento todavía modesto de la supervivencia global con respecto al placebo en pacientes con CHC no reseccionable. Además de este agente, actualmente están sometiéndose a prueba diversas moléculas diferentes en CHC en estadio avanzado entre las cuales Brivanib, otro inhibidor multicitinasa oral que está sometiéndose a prueba actualmente en varios estudios de fase III (H.C. Spangenberg, R. Thimine, H.E. Blum, *Biologics: Targets & Therapy*, 2008, 2(3), 453 - K. Almhanna, *PA Philip, Onco. Targets Ther.*, 2009, 18(2), 261).

Aún cuando sorafenib es el tratamiento de referencia para CHC en estadio avanzado y está registrado para el tratamiento de CHC sin restricciones por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y la Food and Drug Administration (FDA), los criterios de inclusión estrechos de los ensayos clínicos dejan a muchos pacientes sin tratamiento eficaz demostrado con respecto a su estadio de enfermedad. Además, puesto que suceden fracasos del tratamiento en algunos pacientes con sorafenib, sigue habiendo todavía una necesidad médica para esos pacientes para mejorar la eficacia del tratamiento, el régimen del fármaco y la tolerancia global, y para superar la resistencia (M. Peck-Radosavljevic, *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2010, 3(4), 259).

El CHC se conoce como un cáncer sólido hipervascular caracterizado por un alto grado de farmacoresistencia (T. Wakamatsu, Y. Nakahashi, D. Hachimine, T. Seki, K. Okazaki, *Int. J. Oncol.*, 2007, 31(6), 1465). Los mecanismos de esta quimiorresistencia en CHC son múltiples. Sin embargo, el mecanismo más común está relacionado con transportadores de resistencia a múltiples fármacos (MDR), bombas de MRP y P-gp (D.M. Bradshaw, R.J. Arceci, *J. Clin. Oncol.*, 1998, 16(11), 3674. Revisión. Errata en: *J. Clin. Oncol.*, 1999, 17(4), 1330). Estas bombas permiten que las células tumorales expulsen diferentes tipos de agentes quimioterápicos al entorno extracelular (Y. Chen, S.M. Simon, *J. Cell Biol.* 2000, 148(5), 863). La quimiorresistencia relacionada con el fenotipo MDR puede ser intrínseca o adquirirse durante la quimioterapia. La quimiorresistencia, ya sea espontánea o adquirida, es un grave problema en el tratamiento del cáncer. CHC es a menudo quimiorresistente de manera intrínseca, lo que es la causa principal del fracaso de su terapia (R. Pérez-Tomás, *Curr Med Chem.*, 2006, 13(16), 1859, Review). Esto supone un gran obstáculo en la quimioterapia del cáncer porque es necesario administrar dosis superiores de fármacos y a su vez esto puede provocar efectos secundarios graves (F. Yan, X.M. Wang, Z.C. Liu, C. Pan, S.B. Yuan, Q.M. Ma, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 2010, 9(3), 287). La quimiorresistencia afecta a los agentes quimioterápicos principales y especialmente a las antraciclinas (como doxorubicina), alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas o taxanos. La escasa eficacia de los agentes quimioterápicos atribuida a la sobreexpresión del gen de MDR subyace a la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento para CHC, que tendrían en cuenta los problemas de resistencia.

La doxorubicina es un agente quimioterápico, cuya eficacia se ha mostrado en varios cánceres incluyendo CHC. Sin embargo, la infusión i.v. de doxorubicina en CHC es modesta con una tasa de respuesta objetiva del 5-10%. Un ensayo clínico grande, aleatorizado, multicéntrico comparó la eficacia de doxorubicina 60 mg/m² administrada a través de la vía i.v. y thymitaq, un inhibidor de la timidilato sintasa directa (Porta C., 2006). En los 446 pacientes aleatorizados con CHC no reseccionable, se encontró que el efecto de la doxorubicina era modesto. Se supone que el modesto efecto de la doxorubicina en pacientes con CHC resulta de mecanismos de resistencia a múltiples fármacos (MDR) relacionados con la sobreactividad de las bombas celulares Pgp y MRP. Se han evaluado muchas estrategias para superar estos problemas de resistencia, incluyendo el uso de inhibidores de Pgp y MRP. El desarrollo de estos fármacos se ha detenido debido a su perfil de seguridad.

En CHC, se desarrollaron nuevas estrategias usando agentes citotóxicos mediante inyección intraarterial (i.a.) hepática con el fin de reducir la toxicidad sistémica, inducir necrosis de tumores hepáticos importantes y salvar el parénquima hepático sano.

La tecnología descrita en la patente EP 1056477, y su equivalente estadounidense US 6881421, usa polímero de poli(cianoacrilato de alquilo) (PACA) para formular principios activos en Nanopartículas. El documento EP 1056477, y su equivalente estadounidense US 6881421, indica el uso de un agente complejante para complejar el principio activo durante la preparación de las Nanopartículas para proteger el principio activo de reacciones químicas que son necesarias para la formación de la partícula. Por tanto, el principio activo se asocia ventajosamente de una manera no covalente con la partícula y se protege de reacciones o de la degradación. Se enseñan por tanto Nanopartículas que comprenden un principio farmacéuticamente activo, un polímero tal como poli(cianoacrilato de alquilo) y un agente complejante tal como ciclodextrinas, en el documento EP 1056477 y en su equivalente estadounidense US 6881421.

La doxorubicina cargada en dichas Nanopartículas (a continuación en el presente documento denominadas "Nanopartículas cargadas con doxorubicina") es una formulación de fármaco que asocia una clase de Nanopartículas de PACA, poli(cianoacrilato de isohexilo) (PIHCA), con el agente quimioterápico doxorubicina.

Dichas Nanopartículas presentan mecanismos originales para sortear MDR que pueden resumirse tal como sigue:

Las Nanopartículas cargadas con doxorubicina se adsorben a la superficie de células tumorales y liberan la doxorubicina atrapada de manera próxima a la membrana celular, lo que conduce a una alta concentración de

gradiente local (Colin de Verdière A, Cancer Chemother Pharmacol. 1994; 33(6):504-8).

Las Nanopartículas se degradan y liberan poli(ácido cianoacrílico) soluble que podría interactuar con la membrana plasmática y contribuir a la mejora de la administración intracelular de doxorubicina (De Verdière AC, Br J Cancer. 1997;76 (2):198-205).

El polímero soluble también podría enmascarar la carga positiva de la doxorubicina, impidiendo por tanto su flujo de salida por la Pgp (De Verdière 1997, Br J Cancer. 1997; 76(2):198-205), actuando como un par iónico sin ningún enlace covalente). Se evita por tanto la interacción directa con bombas de MDR (Pgp y MRP).

En el hombre, se ha evaluado la eficacia y seguridad de las Nanopartículas cargadas con doxorubicina a través de la vía intraarterial hepática en 2 ensayos clínicos: en un ensayo clínico de fase I-II abierto y un ensayo clínico de fase II aleatorizado (tabla 1).

Tabla 1: Resumen de diseños de estudio para el desarrollo clínico de Nanopartículas cargadas con doxorubicina

Fase / número de estudio	Descripción	Vía Dosificación	Población	Pacientes planeados/completo	Estado
Fase I/II BA/2002/03/02	Abierto MC SD Dosis esc.	i.a. hepática 10 mg/m ² 20 mg/m ² 30 mg/m ² 35 mg/m ² 40 mg/m ²	CHC avanzado	21/20	Completado
Fase II/III BA/2006/03/03	Abierto, MC R PG	i.a. hepática 30 mg/m ² cada 4 semanas máx. 3 inyecciones	CHC avanzado	200/28	Detenido

El estudio BA2002/03/02 (estudio de fase I/II en pacientes con carcinoma hepatocelular avanzado) se llevó a cabo según un diseño multicéntrico, abierto, con dosis escalonadas en pacientes que padecen CHC. Las Nanopartículas cargadas con doxorubicina se inyectaron a través de la vía intraarterial (i.a.) hepática como un bolo. Se inyectaron a cohortes sucesivas de 3 pacientes una única dosis de 10, 20 y 30 mg/m² de Nanopartículas cargadas con doxorubicina. Puesto que la dosis de 30 mg/m² se toleraba bien, se corrigió el protocolo para abordar 40 mg/m² y luego 35 mg/m². Puesto que estas 2 dosis se consideraban tóxicas, se administró a pacientes adicionales una dosis de Nanopartículas cargadas con doxorubicina de 30 mg/m² en 15 minutos. Dos pacientes recibieron una segunda dosis i.a. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina y un paciente recibió 3 infusiones i.a.

Se incluyeron veinte pacientes en este estudio. Aparte de los AAET (acontecimientos adversos emergentes del tratamiento) respiratorios graves notificados a 35 y 40 mg/m², la tolerancia era aceptable; la mayoría de los AAET fueron de corta duración y de gravedad leve. Todos fueron reversibles sin secuelas. Globalmente, el 50% de los AAET no graves se esperaban como ya notificados con doxorubicina libre. Los AAET más frecuentes fueron leucopenia (n=13; 65%), neutropenia (n=12; 60%), náuseas (n=10; 50%), anemia y dolor abdominal (n=9; 45%), astenia, fiebre, alopecia (n=6; 30%) y tos (n=5; 25%). Se notificó un aumento en transaminasas en 11 pacientes (55%) y se esperaba como probablemente relacionado con la eficacia del tratamiento. Dos pacientes tenían síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) a la dosis de Nanopartículas cargadas con doxorubicina de 35 mg/m².

Los datos de eficacia demostraban claramente una señal de eficacia con una supervivencia media y una mediana de supervivencia de 548 y 315 días respectivamente, una tasa de respuesta objetiva del 65 al 80% según los criterios del estudio clínico.

Basándose en estos datos, se comparó la eficacia y seguridad de una infusión de 15 minutos por vía i.a. hepática de Nanopartículas cargadas con doxorubicina con las del tratamiento de referencia.

El segundo estudio BA2006/03/03 (estudio de fase II/III en pacientes con CHC avanzado) se llevó a cabo según un diseño multicéntrico, comparativo, abierto, aleatorizado (con una razón 2/1) en pacientes que padecen CHC avanzado. Se inyectaron las Nanopartículas cargadas con doxorubicina a través de la vía i.a. como una infusión de 15 minutos a la dosis de 30 mg/m², precedida y seguida por una medicación previa oral con metilprednisona. Se incluyeron cincuenta pacientes en la primera parte del estudio. 33 pacientes recibieron tres infusiones de Nanopartículas cargadas con doxorubicina a intervalos de 4 semanas y cada uno de los otros 17 pacientes recibió el mejor tratamiento de referencia adaptado a la gravedad de la enfermedad. Al final de esta primera fase, si se consideraba que las Nanopartículas cargadas con doxorubicina eran activas en 2/3 de los pacientes (pacientes

libres de progresión local a los 3 meses), entonces se incluyeron 150 pacientes adicionales.

Este estudio se interrumpió prematuramente cuando se habían incluido 28 pacientes debido a la aparición de SDRA que condujo a la muerte de 2 pacientes tratados con Nanopartículas cargadas con doxorubicina. 17 pacientes habían recibido 39 infusiones de Nanopartículas cargadas con doxorubicina y 11 se aleatorizaron en el grupo control. Ningún paciente murió de SDRA en el grupo control.

A pesar de que muchos pacientes en el grupo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina no completaron el tratamiento según el protocolo (3 infusiones separadas por 4 semanas) debido a la interrupción prematura del estudio, el 63% de los pacientes en el grupo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina estaban libres de progresión local en el mes 3 (frente al 75% que mostraban progresión local en el grupo control). Se monitorizaron los pacientes incluidos y se registró la supervivencia hasta febrero de 2011. La supervivencia global fue significativamente más larga en el grupo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina que en el grupo control. En este punto de tiempo, la supervivencia global media y la mediana de supervivencia global era de 952 días para el grupo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina frente a 449 días para el control.

Además, la supervivencia era significativamente mucho más larga en pacientes que habían completado 3 ciclos de Nanopartículas cargadas con doxorubicina tal como se requería en el protocolo. La supervivencia global media y la mediana de supervivencia global eran dos veces tan largas en el grupo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina que había recibido 3 inyecciones i.a. como en el grupo control. Asimismo, la supervivencia era mucho más larga en pacientes que habían completado 3 ciclos de Nanopartículas cargadas con doxorubicina que en aquellos que habían recibido sólo una o 2 inyecciones i.a. de 30 mg/m² de Nanopartículas cargadas con doxorubicina. Estos datos confirmaban la fuerte señal de eficacia de Nanopartículas cargadas con doxorubicina en el tratamiento de pacientes que padecen CHC avanzado.

Por tanto, aunque muy prometedor en cuanto a eficacia, el uso de Nanopartículas cargadas con fármaco quimioterápico, tal como Nanopartículas cargadas con doxorubicina, en el tratamiento de cáncer, y en particular tratamiento de CHC, no es posible actualmente debido a sus graves acontecimientos adversos pulmonares. Se necesitan por tanto nuevos enfoques que permitan un uso más seguro, reduciendo la probabilidad de aparición de acontecimientos adversos pulmonares y su gravedad en límites aceptables debido a la razón de beneficio/riesgo. En particular, sería muy ventajoso disminuir los acontecimientos adversos pulmonares inducidos por estas Nanopartículas y al mismo tiempo mantener la buena eficacia ya observada.

Sumario de la invención

Los inventores tuvieron éxito en la obtención de un modelo animal adecuado para los acontecimientos adversos pulmonares graves y, entonces, han encontrado sorprendentemente que los efectos secundarios toxicológicos graves, en particular lesiones del pulmón, asociadas con la administración intraarterial o intravenosa de Nanopartículas cargadas con un agente quimioterápico, pueden prevenirse mediante la infusión intravenosa o intraarterial de dichas Nanopartículas durante varias horas.

Basándose en esto, la presente invención se refiere a Nanopartículas que comprenden al menos un agente antitumoral quimioterápico, al menos un poli(cianoacrilato de alquilo) y al menos una ciclodextrina, para su uso para tratar un cáncer, administrándose las Nanopartículas mediante infusión intravenosa o intraarterial durante al menos 2 horas. En particular, las Nanopartículas pueden administrarse mediante infusión intravenosa o intraarterial durante entre 2 y 24 horas, más particularmente durante entre 4 y 12 horas, incluso más particularmente durante aproximadamente 6 horas. En una realización particular, la administración es mediante infusión intravenosa.

Preferiblemente, el polímero de poli(cianoacrilato de alquilo) comprendido en las Nanopartículas es un polímero de poli(cianoacrilato de isohexilo).

Las Nanopartículas usadas en la invención pueden comprender dicho al menos un agente quimioterápico a una concentración de desde 0,01 hasta 200 mg/g de Nanopartículas, desde el 0,1 hasta el 70% p/p de dicha al menos una ciclodextrina y desde el 1 hasta el 25% p/p de dicho al menos un poli(cianoacrilato de alquilo).

El agente antitumoral quimioterápico comprendido en las Nanopartículas puede seleccionarse del grupo que consiste en antracilinas, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides vegetales de venenos del huso, agentes alquilantes, antimetabolitos, elipticina y harmina, y cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, el agente antitumoral quimioterápico es una antraciclina. Más preferiblemente, el agente quimioterápico se selecciona del grupo que consiste en doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, valrubicina, pirarubicina, zorubicina, aclarubicina, detorubicina, carminomicina, morfolinodoxorubicina, morfolinodaunorubicina, metoximorfolinodoxorubicina, cualquier sal farmacéuticamente aceptable de las mismas y cualquier combinación de las mismas. En una realización particularmente preferida, el agente antitumoral quimioterápico es doxorubicina o cualquier sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En esta realización, la dosificación de doxorubicina puede ser de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 75 mg/m², desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 60 mg/m², desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 45 mg/m², desde

aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 mg/m², desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 30 mg/m² c puede ser de aproximadamente 20 mg/m² o 30 mg/m².

El cáncer tratado con las Nanopartículas puede ser un tumor sólido o un tumor hematopoyético, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en carcinoma hepatocelular, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia mielógena crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma de células B grandes difuso, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, mieloma múltiple, neuroblastoma, sarcoma de Edwing, osteosarcoma, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, cáncer de estómago, nefroblastoma, sarcoma de Kaposi y linfoma no Hodgkin. En una realización particularmente preferida, el cáncer es un carcinoma hepatocelular.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar el cáncer, donde el método comprende administrar mediante infusión intravenosa o intraarterial durante al menos 2 horas, una cantidad terapéuticamente eficaz de Nanopartículas que comprenden al menos un agente quimioterápico, al menos un poli(cianoacrilato de alquilo) y al menos una ciclodextrina a un paciente que necesite un tratamiento de este tipo. Preferentemente, las Nanopartículas se administran en forma de una composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente. Todas las realizaciones que se han dado a conocer anteriormente para las Nanopartículas están englobadas en este aspecto. En una realización particular, la administración es mediante infusión intravenosa.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de Nanopartículas que comprenden al menos un agente quimioterápico, al menos un poli(cianoacrilato de alquilo) y al menos una ciclodextrina para el tratamiento del cáncer, administrándose en dichas Nanopartículas mediante infusión intravenosa o intraarterial durante al menos 2 horas. Todas las realizaciones que se han dado a conocer anteriormente para las Nanopartículas están englobadas en este aspecto. En una realización particular, la administración es mediante infusión intravenosa.

En un último aspecto, la presente invención se refiere al uso de Nanopartículas que comprenden al menos un agente quimioterápico, al menos un poli(cianoacrilato de alquilo) y al menos una ciclodextrina, para la elaboración de una preparación farmacéutica para el tratamiento del cáncer, administrándose dicha composición farmacéutica mediante infusión intravenosa o intraarterial durante al menos 2 horas. Todas las realizaciones que se han dado a conocer anteriormente para las Nanopartículas están englobadas en este aspecto. En una realización particular, la administración es mediante infusión intravenosa.

Descripción detallada de la invención

Como trabajo preliminar a la presente invención, los inventores han establecido y evaluado un modelo de rata para investigar acontecimientos adversos respiratorios observados en ensayos clínicos previos para el tratamiento de carcinoma hepatocelular mediante infusión intraarterial hepática de doxorubicina formulada en Nanopartículas que comprenden un polímero de poli(cianoacrilato de alquilo) y una ciclodextrina (a continuación en el presente documento denominada "Nanopartícula cargada con doxorubicina"). Usando este modelo, han demostrado en el presente documento que la infusión intravenosa de dichas Nanopartículas durante al menos 2 horas permite reducir fuertemente los efectos secundarios toxicológicos, en particular lesiones del pulmón, en comparación con inyección intravenosa en bolo a la misma dosis. Este nuevo enfoque terapéutico permite un uso más seguro de las Nanopartículas y entonces aumenta drásticamente la razón de beneficio/riesgo.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a Nanopartículas que comprenden al menos un agente antitumoral quimioterápico para su uso para tratar un cáncer, administrándose las Nanopartículas mediante infusión intravenosa o intraarterial durante al menos 2 horas.

El experto en la técnica, al considerar el descenso de la toxicidad pulmonar inducida por dichas Nanopartículas gracias a su infusión intravenosa durante al menos 2 horas, habría esperado un descenso similar con su infusión intraarterial durante al menos 2 horas.

Ciertamente, en el estado actual de la técnica existe constancia de un modelo analítico para la infusión intraarterial frente a la intravenosa de doxorubicina y muestra que las dos curvas de disminución de la concentración de doxorubicina son similares. Así pues, la misma curva teórica se ajusta y utiliza para ambos casos ("An analytical model for intra-arterial versus intravenous infusion of Adriamycin", Logan SE *et al.*, Biomed Sci Instrum. 1989;25:239-46). Este artículo indica que incluso si se hacen estas observaciones para la inyección en bolo, existen relaciones similares para la infusión continua. Ciertamente, se puede entender la infusión continua como una serie de inyecciones en bolo infinitesimales, comportándose cada una de las cuales como se describe en dicho modelo analítico.

Además, el estado actual de la técnica confirma que en pacientes que recibieron doxorubicina mediante una vena sistémica, el nivel del fármaco en la sangre periférica fue comparable al obtenido a partir de la sangre periférica de un paciente que recibió doxorubicina intraarterialmente (Comparison of Regional versus Systemic Chemotherapy with Adriamycin, Didolkar *et al.*, Ann. Surg., marzo de 1978, vol. 187, n.º 3, págs. 332-336).

Las Nanopartículas usadas en la presente invención comprenden al menos un agente antitumoral quimioterápico, al menos un polímero de poli(cianoacrilato de alquilo) y al menos un compuesto que puede formar un complejo con el agente antitumoral quimioterápico, preferiblemente elegido de entre los oligosacáridos cíclicos, en particular de entre las ciclodextrinas. Tales Nanopartículas se han descrito anteriormente en la patente europea EP 1056477 y su equivalente estadounidense US 6881421, que se incluyen en el presente documento como referencia.

El polímero de poli(cianoacrilato de alquilo) puede ser lineal o ramificado, preferiblemente ramificado. El grupo alquilo del poli(cianoacrilato de alquilo) puede ser lineal o ramificado, preferiblemente ramificado. En una realización particular, el polímero de poli(cianoacrilato de alquilo) es un poli(cianoacrilato de alquilo C₁-C₁₂), preferiblemente un poli(cianoacrilato de alquilo C₄-C₁₀), más preferiblemente un poli(cianoacrilato de alquilo C₆-C₈). En una realización preferida, el polímero de poli(cianoacrilato de alquilo) es un poli(cianoacrilato de isohexilo). El monómero correspondiente a este último polímero está disponible, por ejemplo, bajo la marca comercial Monorex® por Bioalliance Pharma (Francia).

La ciclodextrina puede ser neutra o cargada, nativa (ciclodextrinas α , β , γ , δ , ϵ), ramificada o polimerizada, o incluso químicamente modificada, por ejemplo, mediante sustitución de uno o más hidroxipropilos por grupos tales como alquilos, arilos, alrilalquilos, glicosídicos o mediante eterificación, esterificación con alcoholes o ácido alifáticos. Entre los grupos anteriores, se da preferencia particular a los elegidos del grupo que consiste en grupos hidroxipropilo, metil-m y sulfobutil éter, y mezclas de los mismos. En una realización preferida, la ciclodextrina se selecciona del grupo que consiste en hidroxipropil-beta-ciclodextrina y/o beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente, y mezclas de las mismas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "agente quimioterápico" o "agente antitumoral quimioterápico" se refiere a cualquier fármaco o compuesto químico con actividad anticancerígena que inhibe o detiene el crecimiento de células cancerosas o células precancerosas inmaduras, destruye células cancerosas o células precancerosas inmaduras, aumenta la susceptibilidad de células cancerosas o precancerosas a otros agentes quimioterápicos y/o inhibe la metástasis de células cancerosas.

En una realización particular, el agente quimioterápico se selecciona del grupo que consiste en antraciclinas, inhibidores de topoisomerasa I y/o II, alcaloides vegetales de venenos del huso, agentes alquilantes, antimetabolitos, elipticina y harmina.

Las antraciclinas (o antibióticos de antraciclina) se derivan de bacterias *Streptomyces*. Estos compuestos se usan para tratar una amplia gama de cánceres, incluyendo por ejemplo carcinoma hepatocelular, leucemias, linfomas y cánceres de mama, de útero, de ovarios y de pulmón. Las antraciclinas tienen tres mecanismos de acción: (i) inhibición de la síntesis de ADN y ARN mediante intercalación entre pares de bases de la hebra de ADN/ARN, impidiendo por tanto la replicación de células cancerosas que crecen rápidamente; (ii) inhibición de la enzima topoisomerasa II, impidiendo la relajación del ADN superenrollado y bloqueando por tanto la transcripción y replicación del ADN; y (iii) creación de radicales libres de oxígeno mediados por hierro que dañan el ADN y las membranas celulares. Las antraciclinas incluyen, pero no se limitan a doxorubicina (también denominada adriamicina), daunorubicina, epirubicina, idarubicina, valrubicina, pirarubicina, zorubicina, aclarubicina, detorubicina, carminomicina, morfolinodoxorubicina, morfolinodaunorubicina, metoximorfolinodoxorubicina y sus sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Preferiblemente, la antraciclina se selecciona del grupo que consiste en doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, pirarubicina, zorubicina y aclarubicina, y cualquier sal farmacéuticamente aceptable de las mismas. En una realización preferida, la antraciclina es doxorubicina o cualquier sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Las topoisomerasas son enzimas esenciales que mantienen la topología del ADN. La inhibición de topoisomerasas de tipo I o tipo II interfiere con tanto la transcripción como la replicación del ADN afectando al superenrollamiento del ADN apropiado. Algunos inhibidores de topoisomerasa de tipo I incluyen derivados de camptotecinas. Los derivados de camptotecinas se refieren a análogos de camptotecinas tales como irinotecán, topotecán, hexatecán, silatecán, lutortecán, karenitecina (BNP1350), gimatecán (ST1481), belotecán (CKD602) o sus sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de inhibidores de topoisomerasa de tipo II incluyen, pero no se limitan a, amsacrina, etopósido, etopósido fosfato y tenipósido. Estos son derivados semisintéticos de epipodofilotoxinas, alcaloides que se encuentran de manera natural en la raíz del podofilo americano (*Podophyllum peltatum*). En una realización particular, el inhibidor de topoisomerasa se selecciona del grupo que consiste en irinotecán, su metabolito activo SN38 y topotecán, y cualquier sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En una realización preferida, el inhibidor de topoisomerasa es irinotecán.

Los alcaloides vegetales de venenos del huso se derivan de plantas y bloquean la división celular impidiendo la función de los microtúbulos, esencial para la división celular. Estos alcaloides incluyen, pero no se limitan a, alcaloides de la vinca (como vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y vinpocetina) y taxanos. Los taxanos incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel, docetaxel, larotaxel, cabazitaxel, ortataxel, tesetaxel y sus sales farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, el taxano se selecciona del grupo que consiste en paclitaxel y docetaxel, y cualquier sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. El paclitaxel se derivó originalmente del tejo del pacífico. El docetaxel es un análogo semisintético de paclitaxel. En contraposición a los taxanos, los alcaloides

de la vinca destruyen los husos mitóticos. Tanto los taxanos como los alcaloides de la vinca se denominan por tanto venenos del huso o venenos de la mitosis, pero actúan de diferentes modos.

Los agentes alquilantes se denominan así porque tienen la capacidad para añadir grupos alquilo a muchos grupos electronegativos en condiciones presentes en las células. Alteran la función celular formando enlaces covalentes con los grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo y fosfato en moléculas biológicamente importantes. Digno de mención, se cree que su citotoxicidad resulta de la inhibición de la síntesis del ADN. Los agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida y compuestos de platino tales como oxaliplatino, cisplatino o carboplatino.

Un antimetabolito es un producto químico que inhibe el uso de un metabolito, que es parte del metabolismo normal. Tales sustancias son a menudo similares en estructura al metabolito con el que interfieren. La presencia de antimetabolitos altera el crecimiento celular y la división celular.

Los análogos de purina o pirimidina previenen la incorporación de nucleótidos al ADN, deteniendo la síntesis de ADN y por tanto las divisiones celulares. También afectan a la síntesis de ARN. Los ejemplos de análogos de purina incluyen azatioprina, mercaptopurina, tioguanina, fludarabina, pentostatina y cladribina. Los ejemplos de análogos de pirimidina incluyen 5-fluorouracilo (5FU), que inhibe la timidilato sintasa, floxuridina (FUDR) y arabinósido de citosina (citarabina).

Los antifolatos son fármacos que alteran la función de ácidos fólicos. Muchos se usan en la quimioterapia del cáncer, algunos se usan como antibióticos o agentes antiprotozoarios. Un ejemplo bien conocido es metotrexato. Éste es un análogo de ácido fólico y, debido a su similitud estructural con el mismo, se une a e inhibe la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) e impide por tanto la formación de tetrahidrofolato. El tetrahidrofolato es esencial para la síntesis de purina y pirimidina, y esto conduce a una inhibición de la producción de ADN, ARN y proteínas (ya que el tetrahidrofolato también está implicado en la síntesis de los aminoácidos serina y metionina). Otros antifolatos incluyen, pero no se limitan a, trimetoprim, raltitrexed, pirimetamina y pemetrexed.

Los ejemplos de agentes quimioterápicos anteriores no son limitativos y pueden cargarse otros agentes en las Nanopartículas. Entre otros, pueden mencionarse elipticina y harmina.

La elipticina es un producto alcaloide vegetal natural que se aisló del árbol de hoja perenne de la familia Apocynaceae. Se encontró que la elipticina tiene actividad citotóxica y anticancerígena (Dalton *et al.*, Aust. J. Chem., 1967, 20, 2715). Se encontró que el derivado de elipticina hidroxilado en la posición 9 (9-hidroxielipticinio) tiene mayor actividad antitumoral que la elipticina en muchos tumores experimentales (Le Pecq *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 1974, 71, 5078-5082). Se realizaron investigaciones para identificar un derivado de elipticina apropiado para tratamiento en seres humano y condujeron a la preparación de Celiptium, o N2-metil-9-hidroxielipticinio (NMHE), que se ha usado para el tratamiento de algunos cánceres humanos, en particular para el tratamiento de metástasis ósea de cánceres de mama. Otros derivados de 9-hidroxi-elipticina, tales como acetato de 2-(dietilamino-2-etil)9-hidroxielipticinio, acetato de 2-(diisopropilamino-etil)9-hidroxi-elipticinio y 2-(beta-piperidino-2-etil)9-hidroxielipticinio, se habían descrito por ejemplo en la patente estadounidense US 4.310.667.

La harmina es un producto alcaloide vegetal natural que se aisló de las semillas de *Peganum harmala*. *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) es una planta ampliamente distribuida en pastizales semiáridos en Asia central, norte de África, oriente medio y Australia. Los compuestos farmacológicamente activos de *P. harmala* son varios alcaloides que se encuentran especialmente en las semillas y las raíces. Estos incluyen 3-carbolinas tales como harmina, harmalina, harmol, harmalol y harmán, y derivados de quinazolina: vasicina y vasicinona. Se encontró que los alcaloides de *Peganum harmala* tienen un potencial antitumoral significativo (Lamchouri *et al.*, Therapie, 1999, 54(6):753-8). La proliferación de líneas celulares tumorales se redujo significativamente. Se notificó que la harmina presenta citotoxicidad fuerte frente a varias líneas celulares tumorales humanas (Ishida *et al.*, Bioorg Med Chem Lett, 1999, 9(23):3319-24). También se ha descrito la actividad anticancerígena de dímeros de harmol por ejemplo en la patente internacional WO 2009047298.

En una realización preferida, el agente quimioterápico es una antraciclina, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, valrubicina, pirarubicina, zorubicina, aclarubicina, detorubicina, carminomicina, morfolinodoxorubicina, morfolinodaunorubicina, metoximorfolinodoxorubicina, cualquier sal farmacéuticamente aceptable de las mismas y cualquier combinación de las mismas, más preferiblemente doxorubicina o cualquier sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Tal como se usa en el presente documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos dados a conocer en los que el compuesto original se modifica preparando sales de ácidos o bases del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del presente compuesto formadas, por ejemplo, a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, bencenosulfónico,

glucurónico, glutámico, benzoico, salicílico, toluenosulfónico, oxálico, fumárico, maleico, láctico y similares. Las sales de adición adicionales incluyen sales de amonio tales como trometamina, meglumina o epolamina, sales de metales tales como sodio, potasio, calcio, zinc o magnesio. Por ejemplo, una sal de doxorubicina adecuada es el clorhidrato de doxorubicina.

5 En una realización particular, las Nanopartículas usadas en la invención comprenden al menos un agente quimioterápico, preferiblemente seleccionado de entre antraciclinas, al menos un poli(cianoacrilato de alquilo C₁-C₁₂), preferiblemente un poli(cianoacrilato de isohexilo), y al menos una ciclodextrina, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en hidroxipropil-beta-ciclodextrina y beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente, y mezclas de las mismas. En una realización particularmente preferida, las Nanopartículas comprenden doxorubicina, un poli(cianoacrilato de isohexilo) y una hidroxipropil-beta-ciclodextrina.

10 El agente quimioterápico está presente generalmente a una concentración de desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 200 mg/g de Nanopartículas, preferiblemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 50 mg/g.

15 La proporción de ciclodextrina es en general de desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 70% en peso de Nanopartículas, preferiblemente desde aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 30%, más preferiblemente desde aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 20%. La proporción del agente quimioterápico y la proporción de ciclodextrina son independientes entre sí.

20 La proporción de polímero de poli(cianoacrilato de alquilo) es en general de desde aproximadamente el 1 hasta aproximadamente el 25% en peso de Nanopartículas, preferiblemente desde aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 15%.

25 En una realización particular, las Nanopartículas comprenden un agente quimioterápico a una concentración de desde 0,01 hasta 200 mg/g de Nanopartículas, desde el 0,1 hasta el 70% p/p de ciclodextrina y desde el 1 hasta el 25% p/p de poli(cianoacrilato de alquilo), preferiblemente de poli(cianoacrilato de isohexilo).

30 Tal como se usa en esta memoria descriptiva, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores \pm el 10% del valor especificado. Por ejemplo, "aproximadamente 1" significa desde 0,9 hasta 1,1 cuando se considera el 10% y desde 0,95 hasta 1,05 cuando se considera el 5%. Cuando se usa "aproximadamente" en relación con intervalos numéricos, por ejemplo "de aproximadamente 1 a aproximadamente 3", o "entre aproximadamente uno y aproximadamente tres", preferiblemente se aplica la definición de "aproximadamente" facilitada anteriormente para un número a cada número que define el comienzo y el final de un intervalo por separado. Preferiblemente, cuando se usa "aproximadamente" en relación con cualquier valor numérico, el "aproximadamente" puede eliminarse.

35 Las Nanopartículas usadas en la presente invención pueden prepararse según cualquier método conocido por el experto. Un método de este tipo se da a conocer, por ejemplo, en la patente europea EP 1056477 y su equivalente estadounidense US 6881421.

En particular, las Nanopartículas pueden prepararse mediante un método que comprende las etapas de

- 40 a) preparar, en un ácido acuoso, un complejo del agente quimioterápico con ciclodextrina;
- 45 b) añadir gradualmente el monómero de cianoacrilato de alquilo, preferiblemente el monómero de cianoacrilato de isohexilo, en la disolución obtenida en la etapa (a); y
- 50 c) realizar la polimerización de este monómero, opcionalmente en presencia de uno o más agentes tensioactivos y/o estabilizantes.

Preferiblemente, la polimerización es aniónica pero también puede inducirse mediante otros agentes, en particular mediante agentes fotoquímicos. En una realización particular, la polimerización se realiza en presencia de un agente tensioactivo tal como poloxámero o dextrano (tal como dextrano 70.000) u otros agentes tensioactivos no iónicos (como polisorbato, ésteres de sorbitano u otros). Se prefieren poloxámeros, tales como poloxámero 407, poloxámero 401, poloxámero 237, poloxámero 338, poloxámero 331, poloxámero 231 o poloxámero 188 (también denominado Pluronic® F68). Se prefiere más poloxámero 188.

60 El tamaño de las Nanopartículas es de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 300 nm, preferiblemente desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 300 nm, más preferiblemente de aproximadamente 200 nm. El tamaño de estas Nanopartículas está relacionado esencialmente con la concentración de la ciclodextrina.

65 Las Nanopartículas tal como describieron anteriormente se administran en forma de una composición farmacéutica que comprende dichas Nanopartículas y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en el presente documento, el término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a los compuestos, materiales, excipientes, composiciones o formas farmacéuticas que, dentro del alcance del criterio médico competente, son adecuados para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas acordes con una razón de beneficio/riesgo razonable.

La composición farmacéutica que comprende dichas Nanopartículas se formula según la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ª ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York) conocida por un experto en la técnica. En particular, las composiciones farmacéuticas posibles incluyen las adecuadas para administración intravenosa, intraarterial e intratumoral. Para estas formulaciones, pueden usarse excipientes convencionales según técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Tales composiciones para administración parenteral son generalmente disoluciones o suspensiones estériles fisiológicamente compatibles que opcionalmente pueden prepararse inmediatamente antes de su uso a partir de una forma sólida o liofilizada. Pueden disolverse en el vehículo adyuvantes tales como un anestésico local, agentes conservantes y de tamponamiento y puede incluirse un agente tensioactivo o humectante en la composición para facilitar la distribución uniforme de las Nanopartículas.

La composición farmacéutica puede comprender uno o varios tipos de Nanopartículas, que comprenden uno o varios agentes quimioterápicos diferentes.

Además de las Nanopartículas descritas anteriormente, la composición farmacéutica puede comprender además al menos una sustancia activa adicional, tal como otro agente quimioterápico incluido en las Nanopartículas.

Las Nanopartículas usadas en la presente invención van a administrarse a un paciente que lo necesita para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz del/de los agente(s) quimioterápico(s).

Tal como se usa en el presente documento, el término “paciente” se refiere a o bien un animal, tal como un animal valioso para fines de cría, compañía o conservación, o bien preferiblemente un ser humano o un niño, que está aquejado de, o tiene el potencial de verse aquejado de cáncer.

Tal como se usa en el presente documento, una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto que es eficaz en la prevención, reducción, eliminación, tratamiento o control de los síntomas de las enfermedades y los estados descritos en el presente documento. El término “control” pretende referirse a todos los procesos en los que puede haber una ralentización, interrupción, detención, o parada de la progresión de las enfermedades y los estados descritos en el presente documento, pero no necesariamente indica una eliminación total de todos los síntomas de la enfermedad y el estado, y pretende incluir el tratamiento profiláctico. La cantidad de Nanopartículas que va a administrarse tiene que determinarse mediante un procedimiento convencional bien conocido por los expertos habituales en la técnica. En particular, tienen que tenerse en cuenta datos fisiológicos del paciente (por ejemplo, edad, tamaño y peso), el tipo y localización del cáncer, la naturaleza del agente quimioterápico para determinar la dosificación apropiada.

En una realización particular, el agente quimioterápico es doxorubicina y las Nanopartículas van a administrarse en una cantidad que proporciona una dosificación de doxorubicina de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 75 mg/m², preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 60 mg/m², preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 45 mg/m², más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30 mg/m², desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 30 mg/m². Más preferiblemente, la dosificación de doxorubicina puede ser de aproximadamente 20 mg/m² o 30 mg/m².

El área de superficie corporal de un paciente puede calcularse fácilmente por el experto a partir del peso corporal y la altura del paciente (por ejemplo un peso corporal de aproximadamente 65 kg corresponde a una superficie corporal de aproximadamente 1,8 m²).

Los inventores han demostrado en el presente documento que la infusión intravenosa o intraarterial de Nanopartículas durante al menos 2 horas permite reducir fuertemente los efectos secundarios toxicológicos del tratamiento, entonces aumenta drásticamente la razón de beneficio/riesgo.

En consecuencia, las Nanopartículas tal como se describieron anteriormente van a administrarse mediante infusión intravenosa o intraarterial durante al menos 2 horas, preferiblemente durante entre 2 y 24 horas, más preferiblemente durante entre 4 y 12 horas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 6 horas. El volumen que va a administrarse y la velocidad de flujo pueden determinarse fácilmente por el experto con el fin de infundir una cantidad terapéuticamente eficaz de Nanopartículas en al menos dos horas.

Las Nanopartículas pueden administrarse en más de un tratamiento. Pueden administrarse en uno o varios ciclos de tratamiento adicionales (tras el tratamiento inicial, es decir, la primera infusión) con un intervalo de aproximadamente dos a aproximadamente ocho semanas entre los tratamientos, preferiblemente de aproximadamente tres a

aproximadamente cuatro semanas, más preferiblemente de aproximadamente cuatro semanas. En una realización, la administración de las Nanopartículas se produce en el primer día de un ciclo de 2 semanas a 8 semanas. En una realización particular, las Nanopartículas se administran en dos o tres tratamientos con un intervalo entre cada tratamiento de dos a aproximadamente ocho semanas, preferiblemente de aproximadamente cuatro semanas. Las dosis administradas en cada ciclo de tratamiento pueden ser idénticas o diferentes. El número de ciclos de tratamiento y las dosis que van a administrarse pueden determinarse por el médico según el estado fisiológico del paciente y la evolución de la enfermedad. En otra realización preferida, se administran uno o varios ciclos de tratamiento adicionales tal como se han descrito anteriormente durante de uno a 28 meses.

10 Tal y como se usa en el presente documento, el término “administración intravenosa” (“i.v”) se refiere a la infusión de sustancias líquidas directamente en una vena.

15 Este término se refiere a cualquier tipo de dispositivos de acceso intravenoso. En particular, este término se refiere a la aguja hipodérmica. Esta es la forma más simple de acceso intravenoso en el que se hace pasar una aguja hueca a través de la piel directamente al interior de la vena. Esta aguja puede estar conectada directamente a una jeringuilla o puede estar conectada a un tubo con una determinada longitud y, desde allí, a cualquier colección o sistema de infusión que se desee.

20 El sitio más conveniente es a menudo el brazo, especialmente las venas del dorso de la mano, o la vena mediana del codo pero se puede utilizar cualquier vena identificable.

25 También se refiere a una cánula periférica. Una vía i.v. periférica (CVP o IVP) consiste en un catéter corto (una longitud de unos pocos centímetros) insertado a través de la piel y en el interior de una vena periférica (cualquier vena que no esté dentro del pecho o del abdomen). Esta adopta normalmente la forma de un dispositivo de cánula sobre aguja, en el cual se monta una cánula plástica flexible en un trocar de metal. Una vez que la punta de la aguja y la cánula se sitúan en la vena, se retira el trocar y se desecha, se hace avanzar la cánula hacia el interior de la vena hasta la posición apropiada y se asegura.

30 Se puede utilizar cualquier vena accesible, aunque las venas del brazo y de la mano son las que se usan más comúnmente, utilizándose las venas de la pierna y el pie mucho menos.

35 Este término también se puede referir al flujo en vías i.v. centrales a través de un catéter con su punta dentro de una vena importante, normalmente la vena cava superior o vena cava inferior, o dentro de la aurícula derecha del corazón. Esto tiene varias ventajas respecto a la i.v. periférica:

- Puede suministrar fluidos y medicamentos que serían excesivamente irritantes para las venas periféricas debido a su concentración o composición química. Éstos incluyen algunos fármacos quimioterápicos y la nutrición parenteral total.
- Los medicamentos alcanzan el corazón inmediatamente y son distribuidos rápidamente al resto del cuerpo.

40 Existen varios tipos de vías i.v. centrales, dependiendo de la ruta que el catéter tome desde el exterior del cuerpo a la vena.

45 También se puede referir a un catéter central insertado periféricamente (CCIP) que se utiliza cuando se requiere un acceso intravenoso a lo largo de un periodo de tiempo prolongado o cuando el material que se va a infundir causaría un daño rápido y un fallo temprano de una i.v. periférica y cuando pueda ser demasiado peligroso intentar utilizar una vía central convencional. Los usos típicos para un CCIP incluyen: tratamientos quimioterápicos largos, terapia antibiótica ampliada o nutrición parenteral total.

50 La vía de CCIP se inserta a través de una envoltura y se introduce en una vena periférica, normalmente en el brazo, y a continuación se hace avanzar con cuidado hacia delante hasta que el catéter está en la vena cava superior o en la aurícula derecha.

55 Los dispositivos de acceso intravenoso también pueden ser vías venosas centrales. Existen varios tipos de catéteres que utilizan una ruta más directa hacia el interior de las venas centrales. Estos se denominan de manera general vías venosas centrales. En el tipo más sencillo de acceso venoso central, se inserta un catéter en la vena subclavia, yugular interna o (menos comúnmente) una vena femoral y se hace avanzar hacia el corazón hasta que alcanza la vena cava superior o la aurícula derecha.

60 Este término también se refiere a conexiones implantables (a las que a menudo se hace referencia por sus nombres comerciales tales como Port-a-Cath o MediPort) que son una vía venosa central que no tiene un conector externo, en su lugar, tiene una pequeña cámara que se cubre con goma de silicona y se implanta bajo la piel. El medicamento se administra de manera intermitente atravesando con una pequeña aguja la piel, que perfora la silicona y se introduce en la cámara. Es posible dejar la conexión en el cuerpo del paciente durante años; sin embargo, si se hace esto, se debe acceder a la cámara mensualmente.

65

El suministro de agentes terapéuticos por vía intraarterial requiere una cateterización vascular selectiva que se logra adaptando la configuración del catéter a la anatomía vascular.

5 Tal y como se usa en el presente documento, el término “administración intraarterial” se refiere a la infusión de sustancias líquidas directamente en una arteria. Este término se refiere a cualquier tipo de dispositivos de acceso intraarterial.

10 Este término se puede referir a una vía arterial, o vía art o vía a, que es un catéter delgado insertado en una arteria. Una vía arterial se inserta normalmente en la muñeca (arteria radial); pero también se puede insertar en el codo (arteria humeral), ingle (arteria femoral), pie (arteria dorsal del pie).

15 Este término se puede referir a un sistema de infusión subcutánea continua o bomba con jeringa, que es una bomba de infusión pequeña (algunas incluyen las opciones de infundir y extraer), que se utiliza para administrar gradualmente pequeñas cantidades de fluido a un paciente o para su uso en la investigación química y biomédica. Los sistemas de infusión subcutánea continua también son útiles para suministrar medicamentos a lo largo de varios minutos. En el caso de un medicamento que se deba introducir lentamente a lo largo del transcurso de varios minutos, este dispositivo permite al personal ahorrar tiempo y reduce errores.

20 Este término también se refiere a los sistemas Cáteter-Conexión. Para facilitar la administración a largo plazo de agentes quimioterápicos, se han desarrollado sistemas catéter-conexión implantables percutáneamente para su uso a largo plazo. Estos sistemas permiten una punción fácil y repetitiva en la terapia de infusión sin causar demasiado daño a los vasos y su uso es confortable para el paciente. El sistema del catéter se puede implantar quirúrgicamente en la arteria gastroduodenal o mediante las arterias subclavia, axilar o humeral en el interior de la arteria hepática común o en la arteria femoral. La configuración del catéter utilizado depende de la anatomía vascular del paciente.

25 El dispositivo de catéter-conexión estándar consiste en una cámara conectora de titanio con una membrana de goma de silicona en el sitio de la punción y un tubo lateral sobre el que se desliza el catéter de silicona. La conexión entre el catéter de silicona y el catéter diagnóstico angiográfico se refuerza con una cánula metálica pequeña (Liver Intraarterial Chemotherapy: Use of the Femoral Artery for Percutaneous Implantation of Catheter-Port Systems, Karin Anna Herrmann *et al.* abril de 2000, Radiology, 215, 294-299).

30 Este término también se puede referir a la quimioterapia intraarterial (QIA) que es un método quimioterápico innovador utilizado para tratar el cáncer de hígado, así como también distintos tipos de cáncer que se hayan extendido al hígado, tal como el cáncer pancreático metastásico. La QIA se utiliza para dirigir la quimioterapia directamente al tumor a través de un catéter colocado en la arteria. El objetivo de la QIA es concentrar el fármaco dentro del tumor y minimizar la exposición de los tejidos sanos. Durante la QIA, se inserta un catéter delgado a través de la arteria femoral en la pierna derecha. Se realiza una angiografía para obtener un “mapa” de las arterias. A continuación, se utiliza este mapa para insertar una vía en el interior de la arteria hepática que es el vaso sanguíneo principal que suministra sangre al hígado. Utilizando un tinte de una jeringuilla para asegurarse de que la vía está en la posición correcta, se inyecta el fármaco o fármacos quimioterápicos directamente en la arteria.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “cáncer” se refiere a la presencia de células que presentan características típicas de células que provocan cáncer, tales como proliferación no controlada, inmortalidad, potencial metastásico, rápido crecimiento y velocidad de proliferación, y determinados rasgos morfológicos característicos. Este término se refiere a cualquier tipo de tumor maligno (primario o metástasis). En particular, este término se refiere a cualquier trastorno celular proliferativo maligno tal como tumor sólido o tumor hematopoyético, incluyendo carcinoma, sarcoma, linfoma, tumor de células madre, blastoma. Preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer hepático, en particular carcinoma hepatocelular, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia mielógena crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma de células B grandes difuso, cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, mieloma múltiple, neuroblastoma, sarcoma de Edwing, osteosarcoma, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, cáncer de estómago, nefroblastoma, sarcoma de Kaposi y linfoma no Hodgkin. Más preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma hepatocelular, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia mielógena crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma de células B grandes difuso, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de vejiga, mieloma múltiple, neuroblastoma, sarcoma de Edwing, osteosarcoma, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, cáncer de estómago, nefroblastoma, sarcoma de Kaposi y linfoma no Hodgkin. En una realización preferida, el cáncer es cáncer hepático, preferiblemente un carcinoma hepatocelular.

60 En una realización particular, las Nanopartículas comprenden doxorubicina, poli(cianoacrilato de isohexilo), hidroxipropil-beta-ciclodextrina y/o beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente, para su uso para tratar un carcinoma hepatocelular, administrándose las Nanopartículas mediante infusión intravenosa o intraarterial durante al menos 2 horas.

65 Los siguientes ejemplos se facilitan para fines de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos*Ejemplo 1: Fabricación de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (Nanopartículas cargadas con doxorubicina)*

5 Se presenta el producto de Nanopartículas cargadas con doxorubicina desarrollado como un liofilizado estéril para
 10 suspensión inyectable que contiene clorhidrato de doxorubicina como principio activo y otros excipientes incluyendo
 el polímero de las Nanopartículas, PIHCA. Se obtienen las Nanopartículas cargadas con fármaco mediante
 15 polimerización en emulsión acuosa de monómero de cianoacrilato de isohexilo (IHCA) añadido por goteo en la
 disolución a granel que contiene el principio activo doxorubicina y los otros excipientes (P. Couvreur, B. Kanté, M.
 Roland, P. Guiot, P. Baudhuin, P. Speiser, J. Pharm. Pharmacol., 1979, 31, 331). Al final de la polimerización, se
 obtiene una suspensión estable de Nanopartículas que atrapan la doxorubicina. El tamaño medio de las
 Nanopartículas está comprendido entre 100 nm y 300 nm. A continuación, se filtra la suspensión de Nanopartículas
 y se llenan de manera aséptica en viales de vidrio antes de la liofilización. El producto liofilizado de Nanopartículas
 cargadas con doxorubicina debe mantenerse protegido de la luz y la humedad y almacenarse en una nevera entre
 2°C - 8°C, para fines de estabilidad.

Materiales de partida

20 Para 100 ml de volumen total de medios de polimerización:

Excipientes	Cantidad (gramos)
Glucosa anhidra	5
Lactosa	0,4
Poloxámero 188	1
Hidroxipropil-beta-ciclodextrina	0,5
H ₂ O	c.s.p 100 ml
Ácido cítrico anhidro (1 M)	c.s.p pH = 3 a 4

Método para preparar 100 ml de medio de polimerización (el pH comprende entre 3 y 4)

- 25 - Se añaden los excipientes a aproximadamente 75 ml de H₂O.
 - Se disuelven los excipientes con una barra agitadora magnética
 - Finalización con H₂O hasta obtener un volumen de 100 ml.
 30 - Se ajusta finalmente el pH con ácido cítrico 1 M.

Método para preparar Nanopartícula cargada con doxorubicina (lotes de 5 ml)

- 35 - En un matraz de 10 ml:
 - Añadir 4,625 ml de medios de polimerización
 - Añadir 375 µl de disolución de doxorubicina a 10 mg/ml
 40 - Mezclar con una barra agitadora magnética
 - Añadir 50 µl de disolución de IHCA pura (densidad de IHCA = 0,980)
 45 - Dejar que se produzca la polimerización hasta un periodo de tiempo de 2 h 30 o más, bajo agitación magnética y
 temperatura ambiente
 - Filtración sobre filtros de 2 µm.

50 *Ejemplo 2: Evaluación de un modelo de efectos adversos inducidos tras una única inyección en bolo i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina en ratas Wistar sanas*

El ensayo clínico de fase 2-3 multicéntrico, aleatorizado descrito anteriormente que evaluaba la Nanopartícula cargada con doxorubicina en carcinoma hepatocelular avanzado mediante la vía arterial se ha detenido en 2008 por

la dificultad respiratoria de grave a mortal en los pacientes tratados.

El objetivo del presente estudio *in vivo* era establecer y evaluar un modelo de rata que puede inducir signos toxicológicos y lesiones de pulmón similares a los acontecimientos adversos pulmonares graves observados en dicho ensayo clínico. Los inventores estudiaron los efectos toxicológicos de una única inyección i.v. en bolo de un lote clínico de Nanopartículas cargadas con doxorubicina sobre ratas Wistar sanas a tiempos de monitorización tempranos (24 h, 48 h, 72 h) y tardíos (7 días).

Se eligieron los niveles de dosis de 5, 7,5 y 10 mg/kg según estudios *in vivo* previos, corresponden respectivamente a dosis humanas de 30 mg/m², 45 mg/m² y 60 mg/m².

Administración del fármaco

El estudio implicó finalmente 123 ratas Wistar macho.

Se pesaron las ratas y se distribuyeron según su peso corporal individual para formar 5 grupos de 24 ratas el día del tratamiento i.v.

Se administró la dosis i.v. como un bolo a una velocidad de aproximadamente 1000 µl/min. o 3700 µg de doxorubicina-HCl/min. en la vena del pene bajo anestesia ligera con isoflurano.

- Las ratas de los grupos 1 a 4 recibieron una única inyección i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote BA003-07C001PH) a 5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente (Q1Dx1). Se administró la suspensión de fármaco según el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, para administrar un volumen de dosis de 340 µl de una suspensión de 3,71 mg/ml a una rata de 250 g.

- Las ratas de los grupos 5 a 8 recibieron una única inyección i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote BA003-07C001PH) a 7,5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente (Q1Dx1). Se administró la suspensión de fármaco según el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, para administrar un volumen de dosis de 510 µl de una suspensión de 3,71 mg/ml a una rata de 250 g.

- Las ratas de los grupos 9 a 12 recibieron una única inyección i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote BA003-07C001PH) a 10 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente (Q1Dx1). Se administró la suspensión de fármaco según el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, para administrar un volumen de dosis de 670 µl de una suspensión de 3,71 mg/ml a una rata de 250 g.

- Las ratas de los grupos 13 a 16 recibieron una única inyección i.v. de doxorubicina a 7,5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente (Q1Dx1). Se administró la disolución según el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, para administrar un volumen de dosis de 530 µl de una suspensión de 3,55 mg/ml a una rata de 250 g.

- Las ratas de los grupos 17 a 20 (grupo control de excipiente) recibieron una única administración i.v. del mismo volumen de disolución de excipiente que el grupo tratado con 10 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina. Se administró la disolución según el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, para administrar un volumen de dosis de 670 µl de disolución a una rata de 250 g.

- Las ratas del grupo 21 (grupo control no tratado) no recibieron tratamiento.

La asignación del tratamiento se decidió al azar y fue tal como se da a conocer en la tabla.

Tabla 2: Asignación del tratamiento de ratas en el D0

Grupo	N.º de animales por grupo	Tratamiento	Vía	Dosis mg/kg, dox-HCl equivalente	Cantidad de dox-HCl equivalente (mg, peso de rata = 250 g)	Dosis mg/kg, NP-PIHCA equivalente	Programa de tratamiento	Día programado de sacrificio
1	6	Nano-partículas	i.v.	5	1,250	66,50	Q1Dx1	D1
2	6	Nano-partículas	i.v.	5	1,250	66,50	Q1Dx1	D2
3	6	Nano-partículas	i.v.	5	1,250	66,50	Q1Dx1	D3

4	6	Nano-partículas	i.v.	5	1,250	66,50	Q1Dx1	D7
5	6	Nano-partículas	i.v.	7,5	1,875	99,75	Q1Dx1	D1
6	6	Nano-partículas	i.v.	7,5	1,875	99,75	Q1Dx1	D2
7	6	Nano-partículas	i.v.	7,5	1,875	99,75	Q1Dx1	D3
8	6	Nano-partículas	i.v.	7,5	1,875	99,75	Q1Dx1	D7
9	6	Nano-partículas	i.v.	10	2,500	133,00	Q1Dx1	D1
10	6	Nano-partículas	i.v.	10	2,500	133,00	Q1Dx1	D2
11	6	Nano-partículas	i.v.	10	2,500	133,00	Q1Dx1	D3
12	5	Nano-partículas	i.v.	10	2,500	133,00	Q1Dx1	D7
13	6	Doxorubicina	i.v.	7,5	1,875	-	Q1Dx1	D1
14	6	Doxorubicina	i.v.	7,5	1,875	-	Q1Dx1	D2
15	6	Doxorubicina	i.v.	7,5	1,875	-	Q1Dx1	D3
16	6	Doxorubicina	i.v.	7,5	1,875	-	Q1Dx1	D7
17	6	Control de excipiente	i.v.	-	-	-	Q1Dx1	D1
18	6	Control de excipiente	i.v.	-	-	-	Q1Dx1	D2
19	6	Control de excipiente	i.v.	-	-	-	Q1Dx1	D3
20	6	Control de excipiente	i.v.	-	-	-	Q1Dx1	D7
21	4	Control no tratado	-	-	-	-	-	-

Resultados

5 En primer lugar, los inventores observaron a las dosis más altas de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (7,5 mg/kg y 10 mg/kg) un importante número de muertes durante los primeros dos días de seguimiento. Estas muertes estaban estrechamente asociadas con lesiones de pulmón caracterizadas por:

- modificaciones macroscópicas de los pulmones

10 - presencia de exudados

- aumento del peso de los pulmones

- edemas, alveolitis

15 No se observaron ni mortalidad ni lesiones de pulmón en el grupo tratado con la inyección en bolo i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina 5 mg/kg, de doxorubicina libre a 7,5 mg/kg o con los excipientes de Nanopartículas.

Por tanto, este estudio permite establecer un modelo de rata de lesión de pulmón tras la administración en bolo i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina y estudiar la prevención de estos acontecimientos adversos graves.

5 Para la investigación adicional en la prevención de estos acontecimientos adversos, se eligió la dosis de 7,5 mg/kg como la dosis que permitía seguir la lesión de pulmón hasta el día 2 con muertes no programadas limitadas en comparación con la dosis de 10 mg/kg.

Ejemplo 3: Investigación del impacto de la velocidad de administración sobre la tolerancia de una única inyección i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina en ratas Wistar sanas

10 Para investigar los acontecimientos adversos respiratorios observados en ensayos clínicos con Nanopartículas cargadas con doxorubicina, se ha establecido un modelo de rata de lesión de pulmón. Estudios previos (ejemplo 2) mostraron que la administración en bolo i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina a la dosis de 7,5 mg/kg a ratas Wistar sanas inducía efectos toxicológicos importantes, con lesión de pulmón y dificultad respiratoria. Además, 15 48 h tras la inyección, en el 63% de las ratas inyectadas, se observó mortalidad correlacionada con lesión de pulmón importante.

El objetivo del presente estudio era comparar la tolerancia de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote clínico BA003-07C001PH) al mismo nivel de dosis de 7,5 mg/kg inyectado por vía intravenosa mediante una única inyección en bolo (1000 µl/min. o 3660 µg de doxorubicina-HCl/min.) o mediante una perfusión de 2 horas (4,3 µl/min. o 15,6 µg de doxorubicina-HCl/min.). Se eligió el nivel de dosis de 5 mg/kg (correspondiente a 30 mg/m² en ser humano) administrado mediante una única inyección i.v. en bolo (1000 µl/min. o 3660 µg de doxorubicina-HCl/min.) como dosis en bolo segura basándose en los resultados del estudio previo: no se observaron ni mortalidad ni lesiones de pulmón a esta dosis. Se realizó el sacrificio de las ratas 48 h tras el tratamiento, según el esquema de 20 aparición de efectos toxicológicos observados en estudios previos. 25

Administración del fármaco

30 El estudio implicó 32 ratas Wistar macho.

Se pesaron las ratas y se distribuyeron según su peso corporal individual para formar 5 grupos de 6 ratas para el bolo i.v. u 8 ratas para la perfusión i.v. el día del primer tratamiento i.v.

35 Se realizó la inyección i.v. bajo anestesia ligera con isoflurano a través de la vena femoral en el caso de la perfusión a una velocidad de 4,3 µl/min. (correspondiente a 15,6 µg de (dox-HCl)/min.) para una rata de 250 g (suspensión de 3,66 mg/ml) y mediante la vena del pene en el caso de inyección en bolo a una velocidad de aproximadamente 1000 µl/min. (correspondiente a 3660 µg de (dox-HCl)/min.).

40 Para determinar la dosis real administrada, se pesó cada jeringuilla y catéter antes y después del tratamiento.

• Las ratas del grupo 1 recibieron una única inyección por perfusión i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote BA003-07C001PH) a 7,5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente (Q1Dx1). Se administró la suspensión de fármaco según el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, para administrar un volumen de dosis de 2,05 ml/kg de una suspensión 3,66 mg/ml. Se definió la velocidad de perfusión como 4,3 µl/min. (15,6 µg de (dox-HCl)/min.) para una rata de 250 g (perfusión de 2 h). 45

• Las ratas del grupo 2 recibieron una única inyección i.v. en bolo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote BA003-07C001PH) a 7,5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente (Q1Dx1). Se administró la suspensión de fármaco según el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, para administrar un volumen de dosis de 2,05 ml/kg de una suspensión de 3,66 mg/ml. Se definió la velocidad de inyección como 1000 µl/min. (3660 µg de (dox-HCl)/min.). 50

• Las ratas del grupo 3 recibieron una única inyección en bolo i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote BA003-07C001PH) a 5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente (Q1Dx1). Se administró la suspensión de fármaco según el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, para administrar un volumen de dosis de 1,37 ml/kg de una suspensión de 3,66 mg/ml. Se definió la velocidad de inyección como 1000 µl/min. (3660 µg de (dox-HCl)/min.). 55

• Las ratas del grupo 4 (grupo control de excipiente) recibieron una única administración i.v. del mismo volumen de disolución de excipiente que el grupo tratado con 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina. Se administró la disolución según el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, para administrar un volumen de dosis de 2,05 ml/kg. 60

• Se anestesiaron las ratas del grupo 5 (control de anestesia/cirugía) y se insertó en la vena femoral un catéter lleno con solución salina y conectado a una jeringuilla de solución salina. Se mantuvieron las ratas bajo anestesia durante 65

2 horas tras la cirugía. Se decidió la asignación del tratamiento según su peso corporal individual tal como sigue:

Tabla 3: Asignación del tratamiento de ratas en el día de la administración

Grupo	N.º de animales/grupo	Tratamiento	Vía	Dosis mg/kg, doxo. HCl equivalente	Cantidad de doxo. HCl equivalente (mg, peso de rata = 250 g)	Dosis mg/kg, NP-PIHCA equivalente	Programa de tratamiento
1	8	<i>Nanopartículas BA003-07C001PH</i>	i.v., perfusión	7,5	1,875	99,75	Q1Dx1
2	6	<i>Nanopartículas BA003-07C001PH</i>	i.v., bolo	7,5	1,875	99,75	Q1Dx1
3	6	<i>Nanopartículas BA003-07C001PH</i>	i.v., bolo	5	1,250	66,50	Q1Dx1
4	6	<i>Control de excipiente</i>	i.v., bolo	-	-	-	Q1Dx1
5	6	<i>Control de anestesia/cirugía</i>	-	-	-	-	-

5 **Resultados**

• **Mortalidad**

10 En el grupo de bolo i.v. de 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina, se encontraron dos ratas muertas de 6 en el D1 tras la inyección en bolo y se encontraron dos ratas muertas en el D2, correspondiente a una tasa de mortalidad de 4/6 ratas tratadas (66,7%) al final del estudio.

15 En el grupo de perfusión i.v. de 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina, se encontró la primera rata tratada muerta en el D2 tras el tratamiento, correspondiente a una tasa de mortalidad de 1/8 ratas tratadas (12,5%) al final del estudio.

En el grupo de bolo i.v. de 5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina IV, no se observó mortalidad hasta el final del estudio.

20 En el grupo de control de excipiente y en el grupo de control de anestesia/cirugía, no se observó mortalidad hasta el final del estudio.

Tabla 4: Seguimiento de la mortalidad

Tratamiento		D1	D2	Al final del estudio
Nanopartículas 7,5 mg/kg, bolo i.v.	Rata n.º	6	4	2
	Muerte	2/6	2/4	4/6
	Mortalidad	33,3%	50,0%	66,7%
Nanopartículas 7,5 mg/kg, perfusión i.v.	Rata n.º	8	8	7
	Muerte	0/8	1/8	1/8
	Mortalidad	0%	12,5%	12,5%
Nanopartículas 5 mg/kg, bolo i.v.	Rata n.º	6	6	6
	Muerte	0/6	0/6	0/6
	Mortalidad	0%	0%	0%
Control de anestesia/cirugía	Rata n.º	6	6	6
	Muerte	0/6	0/6	0/6
	Mortalidad	0%	0%	0%

Control de excipiente, bolo i.v.	Rata n.º	6	6	6
	Muerte	0/6	0/6	0/6
	Mortalidad	0%	0%	0%

• Examen de los pulmones

5 Se observaron lesiones de pulmón importantes en el grupo tratado con bolo i.v. de 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina ya fueran ratas muertas (2/2) o ratas sacrificadas (3/4). Estas alteraciones fisiológicas se caracterizaban por la presencia de exudado en la cavidad torácica, el aumento del peso de los pulmones y pulmones hemorrágicos con puntos oscuros.

10 En el grupo tratado con perfusión i.v. de 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina, los inventores observaron exudado en la cavidad torácica de una rata: la rata n.º 1 que se encontró muerta en el día D2. Además, esta rata mostraba pulmones hemorrágicos. Los inventores no observaron exudado en la cavidad torácica para las otras ratas de este grupo. Sin embargo, observaron pulmones hemorrágicos para la rata n.º 2 que mostraba una disminución de su estado de salud general antes del sacrificio. Debe indicarse que el color de los pulmones de las ratas n.º 3 y n.º 4 no era uniforme. Las últimas 4 ratas de este grupo de perfusión de 8 animales no mostraron ninguna alteración de los pulmones.

15 Los inventores no observaron ningún exudado en la cavidad torácica y ninguna alteración macroscópica de los pulmones en el grupo tratado con bolo i.v. de 5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina, el grupo control de excipiente y el grupo control de anestesia/cirugía.

20 Tabla 5: Resumen de lesión de pulmón macroscópica

Tratamiento	Rata n.º	Incidencia de lesiones macroscópicas
Nanopartículas 7,5 mg/kg, bolo i.v.	6	5/6
Nanopartículas 7,5 mg/kg, perfusión i.v.	8	2/8
Nanopartículas 5 mg/kg, bolo i.v.	6	0/6
Control de anestesia/cirugía	6	0/6
Control de excipiente	6	0/6

Conclusión

25 Los inventores describieron previamente un modelo de rata de lesión de pulmón tras una inyección en bolo i.v. (1000 µl/min. o 3660 µg de doxorubicina-HCl/min.) de Nanopartículas cargadas con doxorubicina al nivel de dosis de 7,5 mg/kg (dosis humana equivalente, DHE = 45 mg/m²). Los inventores observaron, 48 h tras el tratamiento, una alta mortalidad (el 62,5% de los animales tratados) y una fuerte lesión de pulmón con exudados en la cavidad torácica, pulmones hemorrágicos con puntos oscuros y un aumento significativo del peso de los pulmones (el 98% frente al grupo control).

30 En este estudio, los inventores confirmaron por primera vez la toxicidad pulmonar de una inyección en bolo i.v. (1000 µl/min. o 3660 µg de doxorubicina-HCl/min.) de Nanopartículas cargadas con doxorubicina al nivel de dosis de 7,5 mg/kg, con observaciones macroscópicas en los pulmones similares (exudados en la cavidad torácica, pulmones hemorrágicos con puntos oscuros), un aumento del peso de los pulmones (el 116,6% frente al grupo control, p=0,0038) y una mortalidad asociada (el 66,7% de los animales tratados).

35 Además, el presente estudio mostró sorprendentemente que una velocidad de perfusión lenta de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (perfusión de 2 h, 4,3 µl/min. o 15,6 µg de doxorubicina-HCl/min.) al nivel de dosis de 7,5 mg/kg reducía fuertemente estos efectos secundarios toxicológicos en comparación con una inyección i.v. en bolo a la misma dosis, 48 h tras la administración. De hecho, la mortalidad se redujo notablemente en el grupo de perfusión ya que el 87,5% de las ratas estaban todavía vivas 48 h tras el tratamiento en comparación con el 33,3% en el grupo de bolo al mismo nivel de dosis. También se redujeron las lesiones de pulmón macroscópicas en el grupo de perfusión ya que sólo 2/8 ratas mostraban pulmones hemorrágicos mientras que 5/6 ratas mostraban pulmones normales en el grupo de bolo al mismo nivel de dosis. Del mismo modo, el aumento del peso de los pulmones era más débil y no era significativo en el grupo de perfusión en comparación con el grupo de bolo (75,4%).

40 *Ejemplo 4: Evaluación histológica del pulmón y corazón de ratas sanas después de una única inyección intravenosa de Nanopartículas cargadas con doxorubicina. Estudio comparativo entre la administración i.v. en bolo y por perfusión*

Estudios previos mostraron que la administración i.v. en bolo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina con una dosis de 7,5 mg/kg a ratas Wistar sanas indujo efectos toxicológicos importantes, con sufrimiento respiratorio y lesión pulmonar. Además, en un 63-67% de las ratas tratadas, se observó mortalidad en las 48 h posteriores a la inyección y se correlacionó con lesiones pulmonares importantes (ejemplo 2). Investigaciones adicionales demostraron que una administración i.v. lenta de Nanopartículas cargadas con doxorubicina con un nivel de dosis de 7,5 mg/kg redujo de manera notable los efectos secundarios toxicológicos en comparación con una inyección i.v. en bolo de la misma dosis. No se observaron ni mortalidad ni lesión pulmonar macroscópica en el grupo de perfusión 48 h después del tratamiento en comparación con el grupo de bolo (87.5% de mortalidad y lesión pulmonar). El incremento del peso pulmonar también fue significativamente menor en el grupo de perfusión (12%) en comparación con el grupo de bolo (166%). Estos estudios también demostraron que la inyección i.v. en bolo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina con un nivel de dosis menor, de 5 mg/kg, es segura y bien tolerada sin mortalidad ni lesión pulmonar (ejemplo 3).

Los efectos adversos importantes de los que se ha informado en el campo de la toxicidad pulmonar inducida por el fármaco son cambios histológicos en el parénquima pulmonar, la pleura, las vías respiratorias, el sistema vascular pulmonar y el mediastino. Las lesiones histológicas consisten en cambios pulmonares tales como el daño alveolar, la fibrosis e infiltrado inflamatorio (Pereverzeva E *et al.*, Influence of the formulation on the tolerance profile of nanoparticle-bound doxorubicin in healthy rats: focus on cardio- and testicular toxicity. *Int J Pharm.* 2007, 337(1-2):346-56). Se sabe que el edema perivascular es un parámetro importante en la evaluación de la toxicidad pulmonar, particularmente en la hipersensibilidad (Tigani B *et al.*, Resolution of the oedema associated with allergic pulmonary inflammation in rats assessed noninvasively by magnetic resonance imaging. *British Journal of Pharmacology.* 2003, 140, 2, 239-246). Se dispone de pocos datos en la biografía relacionados con la toxicidad pulmonar de doxorubicina.

Para investigar aún más las lesiones pulmonares observadas, se llevó a cabo una evaluación histológica después de una tinción HES (Hematoxilina-Eritrosina-Safranina) del pulmón y corazón de ratas Wistar sanas inyectadas por vía intravenosa con Nanopartículas cargadas con doxorubicina. Los cambios histológicos estudiados fueron en concreto el edema perivascular pulmonar, el daño alveolar, la inflamación pleural y los infiltrados celulares.

Tratamiento/administración del fármaco

Se han llevado a cabo dos experimentos para este estudio histológico.

Para los dos experimentos, se realizó la inyección i.v. con anestesia ligera con isoflurano en la vena femoral en el caso de perfusión con una velocidad de 4,3 µl/min y en la vena del pene en el caso de una inyección por bolo con una velocidad de aproximadamente 1000 µl/min. Para determinar la dosis real administrada, se pesó cada jeringuilla y catéter antes y después del tratamiento.

Primer experimento (BA003-PKT-010Rv01)

En el primer experimento se utilizaron 16 ratas Wistar macho. Se pesaron las ratas y se distribuyeron de acuerdo con su peso corporal individual para formar 5 grupos de 3 ratas para el bolo i.v. y 4 ratas para la perfusión i.v.

- Las ratas del grupo 1 recibieron una única inyección i.v. en bolo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote clínico BA003-07C001PH) a 7,5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente. Se definió la velocidad de inyección como 1000 µl/min. (3660 µg de (dox-HCl)/min.).

- Las ratas del grupo 2 recibieron una única inyección por perfusión i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote clínico BA003-07C001PH) a 7,5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente. Se definió la velocidad de perfusión como 4,3 µl/min. (15,6 µg de (dox-HCl)/min.) (2 h de perfusión).

- Las ratas del grupo 3 recibieron una única inyección i.v. en bolo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote clínico BA003-07C001PH) a 5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente. Se definió la velocidad de inyección como 1000 µl/min. (3660 µg de (dox-HCl)/min.).

- Se anestesiaron las ratas del grupo 4 (control de anestesia/cirugía) y se insertó en la vena femoral un catéter lleno con solución salina y conectado a una jeringuilla de solución salina. Se mantuvieron las ratas bajo anestesia durante 2 horas tras la cirugía.

- Las ratas del grupo 5 (grupo control de excipiente) recibieron una única administración i.v. del mismo volumen de disolución de excipiente que el grupo tratado con 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina.

Se decidió la asignación del tratamiento tal como sigue:

Tabla 6: Asignación del tratamiento de ratas en el día de la administración

Grupo	N.º de animales/grupo	Tratamiento	Vía	Dosis mg/kg, doxo·HCl equivalente
1	3	<i>Nanopartículas cargadas con doxorubicina BA003-07C001PH</i>	i.v., bolo	7,5
2	4	<i>Nanopartículas cargadas con doxorubicina BA003-07C001PH</i>	i.v., perfusión	7,5
3	3	<i>Nanopartículas cargadas con doxorubicina BA003-07C001PH</i>	i.v., bolo	5
4	3	<i>Control de anestesia/cirugía</i>	-	-
5	3	<i>Control de excipiente</i>	i.v., bolo	-

Segundo experimento (BA003-PKT-011Rv01)

5 En el segundo experimento se utilizaron 14 ratas Wistar macho. Se pesaron las ratas y se distribuyeron de acuerdo con su peso corporal individual para formar 4 grupos de 4 ratas para el bolo i.v. y 3 ratas para la perfusión i.v.

10 • Las ratas del grupo 1 recibieron una única inyección i.v. en bolo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote clínico BA003-07C001PH) a 7,5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente. Se definió la velocidad de inyección como 1000 µl/min. (3660 µg de (dox-HCl)/min.).

15 • Las ratas del grupo 2 recibieron una única inyección por perfusión i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote clínico BA003-07C001PH) a 7,5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente. Se definió la velocidad de perfusión como 4,3 µl/min. (15,6 µg de (dox-HCl)/min.) (2 h de perfusión).

• Las ratas del grupo 3 recibieron una única inyección i.v. en bolo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote clínico BA003-07C001PH) a 5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente. Se definió la velocidad de inyección como 1000 µl/min. (3660 µg de (dox-HCl)/min.).

20 • Las ratas del grupo 4 (grupo control de excipiente) recibieron una única administración i.v. del mismo volumen de disolución de excipiente que el grupo tratado con 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina.

Se decidió la asignación del tratamiento tal como sigue:

25 Tabla 7: Asignación del tratamiento de ratas en el día de la administración

Grupo	N.º de animales/grupo	Tratamiento	Vía	Dosis mg/kg, doxo·HCl equivalente
1	3	<i>Nanopartículas cargadas con doxorubicina BA003-07C001PH</i>	i.v., bolo	7,5
2	3	<i>Nanopartículas cargadas con doxorubicina BA003-07C001PH</i>	i.v., perfusión	7,5
3	4	<i>Nanopartículas cargadas con doxorubicina BA003-07C001PH</i>	i.v., bolo	5
4	3	<i>Control de excipientes</i>	i.v., bolo	-

Resultados

30 En ambos experimentos, se sacrificaron las ratas 48 horas después de la administración del producto por inyección intravenosa i.v. de una sobredosis de pentobarbital.

35 En el primer experimento, se observó que 1/3 de las ratas estaban muertas 24 h después de la administración i.v. en bolo de 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina y en el segundo experimento, se observó que 3/4 de las ratas estaban muertas 24 horas o 48 horas después de la administración i.v. en bolo de 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina. Éstas observaciones han de tenerse en cuenta al interpretar las siguientes observaciones histológicas.

40 En estos dos experimentos que estudian la inyección intravenosa de un lote clínico de Nanopartículas cargadas con doxorubicina en ratas Wistar sanas, se observaron cambios histológicos que consistían en edema perivascular pulmonar de intensidad variable, daño alveolar ocasional y una ligera inflamación pleural. El principal rasgo

observado en los animales tratados fue un alargamiento del área perivascular que consistía en un aspecto edematoso.

5 Se observaron daños pulmonares y cardíacos importantes en el grupo que recibió 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina con una velocidad de bolo de aproximadamente 1000 µl/min (o 3700 µg de doxorubicina HCl/min) que había causado la muerte de los animales. Se observó un edema perivascular importante en el grupo tratado con 7,5 mg/kg de bolo: se observó un aumento de una relación de 21,8 ($p = 0,0065$) en este grupo en comparación con el grupo de control.

10 La dosis de 7,5 mg/kg, cuando se administró mediante un procedimiento de perfusión con una velocidad de aproximadamente 4,3 µl/min (o 15,6 µg de doxorubicina-HCl/min), indujo lesiones histológicas pulmonares leves o moderadas y ninguna lesión cardíaca al contrario que el mismo nivel de dosis administrado como una inyección en bolo.

15 Los animales del grupo de bolo i.v. de 5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina únicamente mostraron lesiones pulmonares leves. El edema perivascular pulmonar fue similar en el grupo de bolo de 5 mg/kg y en el grupo de perfusión de 7,5 mg/kg y se redujo de manera notable en comparación con el grupo tratado con bolo de 7,5 mg/kg.

20 En conjunto, estos resultados demostraron que la reducción de la velocidad de infusión de las Nanopartículas cargadas con doxorubicina disminuyó de manera importante la incidencia de sufrimiento respiratorio letal en ratas sanas caracterizado principalmente por un edema perivascular pulmonar.

25 *Ejemplo 5: Investigación de posibles efectos toxicológicos retardados de una única perfusión i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina en ratas Wistar sanas*

30 Se demostró que una perfusión i.v. de 2 horas de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (4,2 µl/min o 15,6 µg de doxorubicina-HCl/min para una suspensión de 3,7 mg/mL) inducía un descenso importante de los efectos toxicológicos en este nivel de dosis, cuando se comparaba con una única inyección i.v. en bolo. Se observó un descenso de la mortalidad, con un 79% de ratas muertas dos días después del tratamiento en el grupo de bolo frente a un 6,7% en el grupo de perfusión. Además, se observó una notable reducción de las lesiones pulmonares dos días después del tratamiento por perfusión (ejemplos 3 y 4).

35 En estos estudios, el sacrificio se realizó siempre dos días después de la administración de Nanopartículas cargadas con doxorubicina ya fuera en el grupo tratado por bolo o en el grupo tratado por perfusión.

40 El objetivo del presente estudio es estudiar los posibles efectos toxicológicos retardados después de una perfusión de 2 h de Nanopartículas cargadas con doxorubicina. De esta manera, las ratas tratadas con una perfusión de Nanopartículas cargadas con doxorubicina con el nivel de dosis de 7,5 mg/kg serán sacrificadas siete días después del tratamiento, en comparación con las ratas sacrificadas después de 48 h tal como se realizó en los estudios anteriores.

Tratamiento con el fármaco/administración

45 En el estudio se utilizaron 34 ratas Wistar macho.

50 Se pesaron las ratas y se distribuyeron para formar 5 grupos de 6 a 8 ratas. La inyección i.v. se realizó con anestesia ligera con isoflurano en la vena femoral en el caso de una perfusión de 2 h de una suspensión de 3,69 mg/mL con una velocidad de 4,2 µl/min o 15,6 µg de doxorubicina HCl/min para una rata de 250 g. En el caso de la inyección en bolo en la vena del pene, la velocidad de inyección fue de aproximadamente 1000 µl/min o 3660 µg de doxorubicina HCl/min.

Para determinar la dosis administrada real, se pesó cada jeringuilla y catéter antes y después del tratamiento.

55 • Las ratas del grupo 1, recibirán una única inyección i.v. en bolo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote BA003-07C001PH) a 7,5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente. Se administró la suspensión del fármaco de acuerdo con el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, de manera que se administrase un volumen de dosis de 2,04 ml/kg de una suspensión de 3,69 mg/ml. Se definió la velocidad de inyección como 1000 µl/min o 3660 µg de doxorubicina HCl/min.

60 • Las ratas del grupo 2 recibieron una única perfusión i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote BA003-07C001PH) a 7,5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente. Se administró la suspensión del fármaco de acuerdo con el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, de manera que se administrase un volumen de dosis de 2,04 ml/kg de una suspensión de 3,69 mg/ml. Se definió la velocidad de inyección como 4,2 µl/min o 15,6 µg de doxorubicina HCl/min para una rata de 250 g (2 h de perfusión). Se sacrificaron las ratas 48 h después del tratamiento.

65

- Las ratas del grupo 3 recibieron una única perfusión i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote BA003-07C001PH) a 7,5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente. Se administró la suspensión del fármaco de acuerdo con el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, de manera que se administrase un volumen de dosis de 2,04 ml/kg de una suspensión de 3,69 mg/ml. Se definió la velocidad de inyección como 4,2 µl/min o 15.6 µg de doxorubicina HCl/min para una rata de 250 g (2 h de perfusión). Se sacrificaron las ratas 7 días después del tratamiento.
- Las ratas del grupo 4 (grupo de control de excipiente) recibieron una única administración i.v. del mismo volumen de una disolución de excipiente que el grupo tratado con 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina. Se administró la disolución de acuerdo con el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, de manera que se administrase un volumen de dosis de 2,04 ml/kg. Se definió la velocidad de inyección como 1000 µl/min. Se sacrificaron las ratas 48 h después del tratamiento.
- Las ratas del grupo 5 (grupo de control de excipiente) recibieron una única administración i.v. del mismo volumen de una disolución de excipiente que el grupo tratado con 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina. Se administró la disolución de acuerdo con el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, de manera que se administrase un volumen de dosis de 2,04 ml/kg. Se definió la velocidad de inyección como 1000 µl/min. Se sacrificaron las ratas 7 días después del tratamiento.

Se decidió la asignación del tratamiento tal como sigue:

Tabla 8: Asignación del tratamiento de ratas en el día de la administración

Grupo	N.º de animales por grupo	Tratamiento	Vía	Dosis mg/kg, dox-HCl equivalente	Cantidad de dox-HCl equivalente (mg, peso de rata = 250 g)	Dosis mg/kg, PIHCA equivalente	Sacrificio
1	6	Nanopartículas cargadas con doxorubicina BA003-07C001PH	i.v., bolo	7,5	1,875	99,75	D2
2	8	Nanopartículas cargadas con doxorubicina BA003-07C001PH	i.v., perfusión	7,5	1,875	99,75	D2
3	8	Nanopartículas cargadas con doxorubicina BA003-07C001PH	i.v., perfusión	7,5	1,875	99,75	D7
4	6	Control de excipiente	i.v., bolo	-	-	-	D2
5	6	Control de excipiente	i.v., bolo	-	-	-	D7

• **Mortalidad**

En el grupo de bolo, se detectaron tres ratas muertas 24 h después del tratamiento (50% de las ratas inyectadas) y se detectó una rata muerta 48 h después del tratamiento, lo que corresponde a una tasa de mortalidad de un 66,7% al final de la monitorización.

En el grupo de perfusión, se detectaron dos ratas muertas al final de la perfusión y se detectó una rata muerta 24 h después del tratamiento. La tasa de mortalidad fue de aproximadamente un 20% al final de la monitorización en el D7, considerando que todas las ratas habían sido infundidas en el D0.

No se observó mortalidad en el grupo de control de excipiente.

Tabla 9: Seguimiento de la mortalidad durante el estudio de los grupos tratados con Nanopartículas cargadas con doxorubicina (NA = No aplicable)

Tratamiento		D0	D1	D2	D7	Al final del estudio
Nanopartículas cargadas con doxorubicina, 7,5 mg/kg, bolo i.v.	Número de ratas	6	6	3	NA	2
	Muerte	0/6	3/6	1/3	NA	4/6

	Mortalidad (%)	0	50	33,3	NA	66,7
Nanopartículas cargadas con doxorubicina, 7,5 mg/kg, perfusión i.v.	Número de ratas	16	13	12	7	7
	Muerte	2/15*	1/13	0/12	0/7	3/15
	Mortalidad (%)	13,3	7,7	0	0	20

*Retirada del seguimiento de la rata n.º 13 del grupo de perfusión de Nanopartículas cargadas con doxorubicina debido a una fuga del fármaco en el catéter durante el tiempo de infusión en el D0.

• *Examen macroscópico de los pulmones*

- 5 Se observaron lesiones pulmonares importantes en el grupo tratado i.v. con bolo con 7,5 mg/kg ya fuera en las ratas muertas o en una de las dos ratas supervivientes (ratas 5/6). Estas alteraciones fisiológicas estuvieron caracterizadas por la presencia de fluido en la cavidad torácica, el incremento del peso pulmonar, pulmones hemorrágicos y/o pulmones con puntos oscuros.
- 10 Los autores no observaron ningún exudado en la cavidad torácica en el grupo de perfusión i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina con 7,5 mg/kg. Sin embargo, dos ratas mostraron cambios en el color de los pulmones, como la rata n.º 12 muerta en el D1 (con pulmones oscuros y hemorrágicos) y la rata n.º 4 sacrificada en el D7 (pulmones claros con puntos oscuros).
- 15 Cabe destacar que las ratas en el grupo de control de excipiente mostraron pulmones con un color no uniforme en comparación con los estudios previos.

Tabla 10: Resumen de la incidencia de lesiones pulmonares macroscópicas

Tratamiento	Número de ratas	Incidencia de lesiones pulmonares macroscópicas
<i>Nanopartículas cargadas con doxorubicina, 7,5 mg/kg, bolo i.v.</i>	6	5/6
<i>Nanopartículas cargadas con doxorubicina, 7,5 mg/kg, perfusión i.v.</i>	15	2/15
<i>Control de excipiente</i>	12	0/12

20 • *Peso pulmonar*

Se comparó el peso pulmonar medio de cada grupo tratado con Nanopartículas cargadas con doxorubicina con el peso pulmonar medio del grupo de control de excipiente.

25 El incremento del peso pulmonar en el grupo de bolo i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina de 7,5 mg/kg fue importante y estadísticamente significativo en comparación con el grupo de control de excipiente (131%, p=0,003).

30 El incremento del peso pulmonar en comparación con el grupo de control fue menor y no significativo en el grupo de perfusión i.v. de 7,5 mg/kg en el D2 (31%, p=0,154). En el D7, este incremento del peso pulmonar en el grupo de perfusión en comparación con el grupo de control fue similar al observado en el D2 (40%, p=0.178).

Conclusión

35 En el presente estudio, los autores mostraron que una perfusión de dos horas de Nanopartículas cargadas con doxorubicina con un nivel de dosis de 7,5 mg/kg no indujo efectos toxicológicos retardados 7 días después del tratamiento. Ciertamente, la mayoría las ratas no mostraron lesiones pulmonares (86% de las ratas inyectadas) en el grupo de perfusión 7 días después del tratamiento. Además, no se observó ninguna diferencia en los diversos órganos observados dos días o siete días después de la administración del tratamiento por perfusión.

40 Ejemplo 6: Investigación de los efectos toxicológicos después de una única perfusión i.v. de 150 min de Nanopartículas cargadas con doxorubicina en ratas Wistar sanas

45 Los autores describieron previamente (ejemplo 3) que una velocidad de perfusión lenta de aproximadamente 120 min de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (4,3 µl/min o 15,6 µg doxo HCl/min) redujo de manera notable los efectos secundarios toxicológicos en comparación con la inyección i.v. en bolo con el mismo nivel de dosis.

El objetivo del presente estudio fue comparar el impacto en la tolerancia y la toxicidad pulmonar de la velocidad de perfusión de Nanopartículas cargadas con una suspensión de doxorubicina con un nivel de dosis de 7,5 mg/kg.

De esta manera, se administraron las Nanopartículas cargadas con doxorubicina mediante perfusión i.v. con las velocidades de 12,5 µg/min (que corresponde a una perfusión de 150 min para una rata de 250 g y para una suspensión de Nanopartículas cargadas con doxorubicina a 3,7 mg/mL de doxo HCl equivalente). Se realizó el sacrificio de las ratas 48 h después del tratamiento, de acuerdo con el esquema de aparición de los efectos toxicológicos observados.

Administración del fármaco

En el estudio se utilizaron 41 ratas Wistar macho.

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente para formar 6 grupos de 6 ratas (grupos de inyección en bolo), 12 ratas (grupo de perfusión de Nanopartículas cargadas con doxorubicina) y 4 ratas (perfusión de la disolución de excipiente) el día del primer tratamiento i.v.

La inyección i.v. se realizó con anestesia ligera con isoflurano en la vena femoral en el caso de una perfusión de 150 min con una velocidad de 12,5 µg de doxo HCl/min o 3,4 µl/min para una rata de 250 g y una suspensión de 3,70 mg/ml. En el caso de una inyección por bolo en la vena del pene, la velocidad de inyección fue de aproximadamente 1000 µl/min o 3660 µg doxo HCl/min.

Para determinar la dosis administrada real, se pesó cada jeringuilla y catéter antes y después del tratamiento.

- Las ratas del grupo 1, recibieron una única inyección de perfusión i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote BA003-07C001PH) a 7,5 mg/kg de doxorubicina HCl equivalente (Q1Dx1). Se administró la suspensión del fármaco de acuerdo con el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, de manera que se administrase un volumen de dosis de 2,02 ml/kg de una suspensión de 3,70 mg/ml. Se definió la velocidad de inyección como 3,4 µl/min o 12,5 µg de doxo HCl/min para una rata de 250 g (perfusión de 150 min).
- Las ratas del grupo 2 recibieron una única inyección i.v. en bolo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote BA003-07C001PH) a 7,5 mg/kg de doxo HCl equivalente (Q1Dx1). Se administró la suspensión del fármaco de acuerdo con el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, de manera que se administrase un volumen de dosis de 2,02 ml/kg de una suspensión de 3,70 mg/ml. Se definió la velocidad de inyección como 1000 µl/min o 3660 µg de doxo HCl/min.
- Las ratas del grupo 3 recibieron una única inyección i.v. en bolo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (lote BA003-07C001PH) a 5 mg/kg de doxo HCl equivalente (Q1Dx1). Se administró la suspensión del fármaco de acuerdo con el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, de manera que se administrase un volumen de dosis de 1,34 ml/kg de una suspensión de 3,70 mg/ml. Se definió la velocidad de inyección como 1000 µl/min o 3660 µg de doxo HCl/min.
- Las ratas del grupo 4 (grupo de Nanopartículas) recibieron una única administración i.v. del mismo volumen de Nanopartículas que el grupo tratado con 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina. Se administró la suspensión de acuerdo con el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración, de manera que se administrase un volumen de dosis de 2,02 ml/kg. Se definió la velocidad de inyección como 1000 µl/min.
- Las ratas del grupo 5 y 6 recibieron una única administración i.v. del mismo volumen de una disolución de excipiente que el grupo tratado con 7,5 mg/kg de Nanopartículas cargadas con doxorubicina con una velocidad de bolo de 1000 µl/min (grupo de control de bolo de excipiente) y una velocidad de perfusión de 3,4 y 4,2 µl/min (grupo de control de perfusión de excipiente). Se administró la disolución de acuerdo con el peso corporal de la rata determinado justo antes de la administración.

Se decidió la asignación del tratamiento tal como sigue:

Tabla 11: Asignación del tratamiento de las ratas en el día de administración

Grupo	N.º de animales/ grupo	Tratamiento	Vía	Dosis mg/kg, dox- HCl equivalente	Cantidad de dox- HCl equivalente (mg, peso de rata = 250 g)	Dosis mg/kg, PIHCA equivalente
1	12	Nanopartículas cargadas con doxorubicina BA003-07C001PH	i.v., perfusión	7,5	1,875	99,75
2	6	Nanopartículas cargadas con doxorubicina BA003-07C001PH	i.v., bolo	7,5	1,875	99,75
3	6	Nanopartículas cargadas con doxorubicina BA003-07C001PH	i.v., bolo	5	1,250	66,5

4	6	Nanopartículas	i.v., bolo	-	-	99,75
5	6	Control de excipiente	i.v., bolo	-	-	-
6	4	Control de excipiente	i.v., bolo	-	-	-

- **Mortalidad**

Únicamente se observó mortalidad en el grupo tratado con bolo i.v. con 7,5 mg/kg. Se detectaron cuatro ratas muertas 48 h después del tratamiento (66,7% de las ratas inyectadas).

5 No se observó diferencia en la supervivencia entre el grupo de control de excipiente, el grupo de perfusión i.v. de 7,5 mg/kg, el grupo de bolo de 5 mg/kg y el grupo de Nanopartículas.

Tabla 12: Seguimiento de la mortalidad

Tratamiento	Mortalidad en el D1	Mortalidad en el D2
Nanopartículas cargadas con doxorubicina, BA003-07C001PH, 7,5 mg/kg, bolo i.v.	0/6 (0%)	4/6 (66,7%)
Nanopartículas cargadas con doxorubicina, BA003-07C001PH, 7,5 mg/kg, perfusión i.v.	0/12 (0%)	0/12 (0%)
Nanopartículas cargadas con doxorubicina, BA003-07C001PH, 5 mg/kg, bolo i.v.	0/6 (0%)	0/6 (0%)
Nanopartículas, bolo i.v.	0/6 (0%)	0/6 (0%)
Control de excipiente, bolo i.v.	0/6 (0%)	0/6 (0%)

- **Examen macroscópico de los pulmones**

Se observaron lesiones pulmonares importantes en el grupo tratado i.v. con bolo con 7,5 mg/kg. Estas alteraciones fisiológicas estuvieron caracterizadas por la presencia de fluido en la cavidad torácica, el incremento del peso pulmonar y pulmones hemorrágicos para las ratas muertas. Se observaron pulmones con un color no homogéneo y con puntos negros en una rata superviviente/2. Los autores no observaron ningún exudado en la cavidad torácica ni alteraciones pulmonares macroscópicas en el grupo de perfusión i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina con 7,5 mg/kg, grupo tratado i.v. con bolo con 5 mg/kg, grupo de Nanopartículas y grupo de bolo de control de excipiente. Cabe destacar que los pulmones pueden presentar un color no homogéneo en estos grupos.

20 No se observó una alteración pulmonar macroscópica en los grupos de perfusión de control de excipiente (3,4 o 4,2 µl/min) sacrificados justo después del tratamiento.

Tabla 13: Resumen de la incidencia de lesiones pulmonares macroscópicas

Tratamiento	Número de ratas	Incidencia de lesiones pulmonares macroscópicas
Nanopartículas cargadas con doxorubicina, BA003-07C001PH, 7,5 mg/kg, bolo i.v.	6	5/6
Nanopartículas cargadas con doxorubicina, BA003-07C001PH, 7,5 mg/kg, perfusión i.v. de 150 min	12	0/12
Nanopartículas cargadas con doxorubicina, BA003-07C001PH, 5 mg/kg, bolo i.v.	6	0/6
Nanopartículas, bolo i.v.	6	0/6
Control de bolo de excipiente	6	0/6
Control de perfusión de excipiente	4	0/4

- **Peso pulmonar**

Se comparó el peso pulmonar medio de cada grupo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina con el peso pulmonar medio del grupo de control de bolo de excipiente.

El incremento del peso pulmonar en el grupo de bolo i.v. de Nanopartículas cargadas con doxorubicina de 7,5 mg/kg fue importante en comparación con el grupo de control de bolo de excipiente (124,2%, p=0,007). No se observó un incremento del peso pulmonar en el grupo de perfusión de Nanopartículas cargadas con doxorubicina de 7,5 mg/kg en comparación con el grupo de control (2,1%, p=0,472). Además, el incremento del peso pulmonar en los grupos de 5 mg/kg y de Nanopartículas fue poco importante en comparación con el grupo de control de bolo de excipiente con respectivamente un 5,4% (p=0,349) y 7,9% (p=0,051).

Conclusión

El presente estudio mostró que la disminución de la velocidad de perfusión desde 15,6 µg de doxo HCl/min hasta 12,5 µg/min todavía reduce el impacto del tratamiento en los pulmones, ya que no se observó mortalidad en el grupo

de perfusión y el peso pulmonar medio fue similar al grupo de control de excipiente. En comparación, el peso pulmonar medio se incrementó en un 124% en el grupo de bolo de 7,5 mg/kg.

Ejemplo 7: fase III del estudio clínico

5 El estudio tiene como objetivo principal demostrar la eficacia de las infusiones i.v. lentas de Nanopartículas cargadas con doxorubicina en pacientes con CHC.

Diseño del ensayo

10 El estudio es un estudio multicéntrico, aleatorizado, controlado, abierto que compara la eficacia y seguridad de infusiones intravenosas repetidas lentas de 2 dosis de Nanopartículas cargadas con doxorubicina (20 mg/m² y 30 mg/m²) con el mejor tratamiento de apoyo (BSC, por sus siglas en inglés) en pacientes que padecen carcinoma hepatocelular (CHC) avanzado tras el fracaso o intolerancia a Sorafenib. El estudio se llevará a cabo en múltiples centros de hepatología y oncología que tratan a pacientes con CHC con o sin cirrosis. En función de los datos de supervivencia obtenidos en el ensayo clínico de fase II, se ha calculado que han de incluirse 390 pacientes para
15 comparar de manera eficaz la eficacia de 20 mg/m² de Nanopartículas cargadas con doxorubicina y 30 mg/m² de Nanopartículas cargadas con doxorubicina con la del BSC. El Comité de Supervisión de Datos y Seguridad (CSDS) llevará a cabo una evaluación de la seguridad de manera periódica al menos dos veces al año y cada 25 pacientes o cada 50 infusiones de Nanopartículas cargadas con doxorubicina, dependiendo de cuál ocurra antes. Los pacientes que cumplan con el criterio de inclusión/exclusión serán aleatorizados de acuerdo con una relación 1:1:1 para recibir
20 20 mg/m² de Nanopartículas cargadas con doxorubicina o 30 mg/m² de Nanopartículas cargadas con doxorubicina o el mejor tratamiento complementario (BSC). Únicamente aquellos pacientes cuyas expectativas de supervivencia sean superiores a los 2 meses y que pueden recibir más de 1 infusión de Nanopartículas cargadas con doxorubicina podrán ser incluidos.

25 La duración del estudio para cada paciente incluye un periodo de cribado de 28 días como máximo antes de someterlo a una distribución aleatoria. A continuación, se someterá al paciente a una distribución aleatoria y recibirá una infusión de Nanopartículas cargadas con doxorubicina de 20 mg/m² o Nanopartículas cargadas con doxorubicina de 30 mg/m² a lo largo de 6 horas por vía i.v. o se le administrará el BSC. Los pacientes recibirán tantos ciclos como sea posible hasta una progresión tumoral inequívoca (evaluada por el investigador), curación o
30 aparición de una toxicidad inaceptable. Serán evaluados para determinar la eficacia cada 2 meses.

Los pacientes distribuidos de manera aleatoria en los grupos de Nanopartículas cargadas con doxorubicina serán hospitalizados desde el Día 0 de cada ciclo de tratamiento y se les dará el alta en el Día 3. Se administrará el
35 tratamiento del estudio (20 o 30 mg/m² de Nanopartículas cargadas con doxorubicina) por infusión a lo largo de 6 horas por vía intravenosa en el Día 1 y se repetirá cada 4 semanas hasta una progresión tumoral inequívoca (evaluada por el investigador) o toxicidad. Se realizará una visita de estudio el Día 14 de cada ciclo. Dos meses después de la última administración del fármaco de estudio, se realizará una visita de finalización del estudio.

40 Los pacientes distribuidos de manera aleatoria en el grupo de control (grupo de “mejor tratamiento de apoyo”) recibirán tratamientos de la manera habitual y se les hará un seguimiento de acuerdo con la práctica normal del centro. Serán obligatorias visitas de estudio en el Día 1 y el Día 14 de cada ciclo.

45 Para un paciente distribuido de manera aleatoria en el grupo de Nanopartículas cargadas con doxorubicina, la dosis total de doxorubicina no excederá los 450 mg/m².

Se mantendrá el seguimiento del estado de supervivencia de todos los pacientes (incluidos los pacientes que se retiran de manera prematura) cada 3 meses hasta su muerte.

Selección de sujetos

50 **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Todos los pacientes incluidos en el estudio tienen que cumplir los siguientes criterios para su inclusión en el estudio:

- 55 1. Hombres o mujeres no embarazadas, que no están en lactancia materna;
2. Edad ≥ 18 años;
- 60 3. Paciente con
- CHC avanzado (BCLC-C según la clasificación de estadiaje de BCLC) que ha progresado (criterios de RECIST) con terapia con sorafenib o intolerantes a sorafenib, o;
- 65 - CHC intermedio (BCLC-B) no elegibles o pacientes que no responden a la quimioembolización transarterial (TACE) y que han progresado con o son intolerantes a la terapia con sorafenib

4. CHC diagnosticado según los criterios de AASLD:
- Criterios citohistológicos;
- 5 - Criterios no invasivos:
- Nódulo ≥ 20 mm: una técnica de obtención de imágenes entre IRM y exploración CT que muestra potenciación arterial;
- 10 - Nódulo de 10-20 mm: dos técnicas de obtención de imágenes que muestran potenciación arterial y lavado portal;
5. Sin cirrosis o con cirrosis no descompensada y una puntuación de Child-Pugh de desde A5 hasta B7 incluida.
6. Estado funcional ECOG de 0 o 1;
- 15
7. Pruebas de laboratorio con los siguientes valores:
- Trombocitos $\geq 50.000 / \text{mm}^3$
 - Recuento de neutrófilos $\geq 1000/\text{mm}^3$
 - Hemoglobina $\geq 10 \text{ g/dL}$
- 20
- Transaminasas séricas $< 5 \text{ ULN}$ (NCI/CTC grados 0, 1 o 2)
 - Fosfatasas alcalinas $< 5 \text{ ULN}$ (NCI/CTC grados 0, 1 o 2)
 - Bilirrubina sérica $< 35 \mu\text{M/l}$ (o $2,0 \text{ mg/dL}$);
- 25
8. Declaración escrita de consentimiento informado con fecha y firma.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Nanopartículas que comprenden al menos un agente antitumoral quimioterápico, al menos un poli(cianoacrilato de alquilo) y al menos una ciclodextrina, para su uso para tratar un cáncer, donde las Nanopartículas se administran por infusión intravenosa o intraarterial durante al menos 2 horas, dicho al menos un agente antitumoral quimioterápico es la doxorubicina o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables y la dosificación de doxorubicina está comprendida entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 mg/m².
- 10 2. Las Nanopartículas para su uso según la reivindicación 1, donde la dosificación de doxorubicina es de aproximadamente 20 mg/m².
3. Las Nanopartículas para su uso según la reivindicación 1, donde la dosificación de doxorubicina es de aproximadamente 30 mg/m².
- 15 4. Las Nanopartículas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde las Nanopartículas se administran por infusión intravenosa o intraarterial durante entre 2 y 24 horas.
- 20 5. Las Nanopartículas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde las Nanopartículas se administran por infusión intravenosa o intraarterial durante entre aproximadamente 4 y 12 horas.
6. Las Nanopartículas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde las Nanopartículas se administran por infusión intravenosa o intraarterial durante aproximadamente 6 horas.
- 25 7. Las Nanopartículas para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicho al menos un poli(cianoacrilato de alquilo) es poli(cianoacrilato de isohexilo).
- 30 8. Las Nanopartículas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde las nanopartículas comprenden dicho al menos un agente quimioterápico con una concentración de desde 0,01 hasta 200 mg/g de Nanopartículas, desde un 0,1 hasta un 70% p/p de dicha al menos una ciclodextrina y desde un 1 hasta un 25% p/p de dicho al menos un poli(cianoacrilato de alquilo).
- 35 9. Las Nanopartículas para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el cáncer es un tumor sólido o un tumor hematopoyético, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en carcinoma hepatocelular, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia mielógena crónica, enfermedad de Hodgkin, linfoma de células B grandes difuso, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, mieloma múltiple, neuroblastoma, sarcoma de Edwing, osteosarcoma, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, cáncer de estómago, nefroblastoma, sarcoma de Kaposi y linfoma no Hodgkin.
- 40 10. Las Nanopartículas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el cáncer es un carcinoma hepatocelular.