

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 106**

51 Int. Cl.:

A61K 9/10 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2018** **PCT/US2018/037219**
87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2018** **WO18231908**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2018** **E 18735171 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025** **EP 3615004**

54 Título: **Métodos de tratamiento de los trastornos pulmonares**

30 Prioridad:

14.06.2017 US 201762519257 P
09.02.2018 US 201862628582 P
06.04.2018 US 201862653942 P
31.05.2018 US 201862678387 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.04.2025

73 Titular/es:

CRITITECH, INC. (100.00%)
1849 E. 1450 Road
Lawrence, KS 66044, US

72 Inventor/es:

BALTEZOR, MICHAEL;
McCLOREY, MATTHEW;
JOHNSTON, WILLIAM;
DIZEREGA, GERE, S. y
VERCO, JAMES

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 015 106 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

Métodos de tratamiento de los trastornos pulmonares

Referencia cruzada

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos números de serie 62/519257 presentada el 14 de junio de 2017; 62/628582 presentada el 9 de febrero de 2018; 62/653942 presentada el 6 de abril de 2018; y 62/678387 presentada el 31 de mayo de 2018.

Antecedentes

- 10 El cáncer de pulmón es el segundo cáncer más común y uno de los más letales. Las terapias convencionales, como la resección quirúrgica, la radiación y la quimioterapia, no han dado como resultado tasas de supervivencia a largo plazo satisfactorias. La administración sistémica de medicamentos, incluso en dosis altas, da como resultado que sólo una cantidad limitada de los fármacos de taxano llegue a los tumores pulmonares. De este modo, se necesitan métodos mejorados de tratamiento de los tumores pulmonares.

Sumario

- 15 La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas y se basa en la enseñanza general que incluye los diversos aspectos y facetas que se describen a continuación.

Antecedentes técnicos

- 20 En un aspecto, la enseñanza proporciona una suspensión aerosolizada que comprende partículas de taxano que comprenden al menos el 95 % en peso del taxano, en la que las partículas de taxano tienen un tamaño de partícula medio (número) de entre 0.4 μm y 2 μm según lo determinado por oscurecimiento de luz o difracción láser, un área de superficie específica (SSA) de entre 12 m^2/g y 60 $\pm$ 3 m^2/g medido por la isoterma de Brunauer-Emmett-Teller y una densidad aparente media de entre 0.050 $\pm$ 0.0025 g/cm^3 y 0.12 $\pm$ 0.006 g/cm^3 como se mide vertiendo las partículas en un cilindro graduado, sin golpear, a temperatura ambiente, para su uso en el tratamiento de un tumor pulmonar, en el que la suspensión se administra por vía pulmonar mediante nebulización a un sujeto con un tumor pulmonar, y en el que el taxano comprende paclitaxel, docetaxel o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En una faceta, las partículas de taxano pueden tener un tamaño de partícula medio (número) de entre 0.4 μm y aproximadamente 1.2 μm , o entre aproximadamente 0.6 μm y aproximadamente 1.0 μm .

- 30 En otra faceta, las partículas de taxano pueden tener un área superficial específica (SSA) de al menos 14 m^2/g , 16 m^2/g , 18 m^2/g , 20 m^2/g , 25 m^2/g , 30 m^2/g , 32 m^2/g , 34 m^2/g , o 35 m^2/g . Más concretamente, el SSA es según las reivindicaciones. En otra faceta la suspensión comprende:

(a) las partículas de taxano;

(b) un portador farmacéuticamente aceptable; y

- 35 (c) un polisorbato, en la que el polisorbato está presente en la suspensión en una concentración de entre aproximadamente 0.01 % v/v y aproximadamente 1.5 % v/v, o entre aproximadamente 0.01 % v/v y aproximadamente 1 % v/v, aproximadamente 0.01 % v/v y aproximadamente 0.5 % v/v, aproximadamente 0.01 % v/v y aproximadamente 0.4 % v/v, aproximadamente 0.01 % v/v y aproximadamente 0.25 % v/v, aproximadamente 0.05 % v/v y aproximadamente 0.5 % v/v, aproximadamente 0.05 % v/v y aproximadamente 0.25 % v/v, aproximadamente 0.1 % v/v y aproximadamente 0.5 % v/v, aproximadamente 0.1 % v/v y aproximadamente 0.25 % v/v, aproximadamente 0.1 % v/v, aproximadamente 0.16 v/v, o aproximadamente 0.25 % v/v. En una faceta, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser solución salina, tal como una solución de cloruro de sodio al 0.9 %. En otra faceta, el polisorbato puede ser polisorbato 80. En una faceta adicional, el taxano puede estar presente en la suspensión en una concentración entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 40 mg/ml, o aproximadamente 6 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml.

- 45 En otra faceta, las partículas de taxano pueden no estar recubiertas y excluir lípidos, polímeros, proteínas tales como albúmina, aceite de ricino polietoxilado y/o glicéridos de polietilenglicol compuestos de mono-, di- y triglicéridos y mono- y diésteres de polietilenglicol.

En una faceta, el taxano puede comprender paclitaxel o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en esta faceta, las partículas pueden tener una o más de las siguientes características:

- 50 (a) una densidad aparente media (no compactada) de entre aproximadamente 0.060 g/cm^3 y aproximadamente 0.11 g/cm^3 ;

(b) un SSA de al menos 15 m^2/g , 18 m^2/g , 20 m^2/g , 25 m^2/g , 30 m^2/g , 32 m^2/g , 34 m^2/g , o 35 m^2/g ;

- (c) un SSA de entre aproximadamente 22 m²/g y aproximadamente 40 m²/g, 25 m²/g y aproximadamente 40 m²/g, 30 m²/g y aproximadamente 40 m²/g, o entre aproximadamente 35 m²/g y aproximadamente 40 m²/g; y/o
- (d) en las que al menos el 40 % (p/p) del paclitaxel se disuelve en 30 minutos o menos en una solución de 50 % de metanol/50 % de agua (v/v) a 37 °C y pH 7.0 en un aparato de paletas USP II que funciona a 75 RPM.
- 5 En otra faceta, las partículas de taxano pueden comprender docetaxel o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en esta faceta, las partículas pueden tener una o más de las siguientes características:
- (a) una densidad aparente media (no compactada) de entre aproximadamente 0.06 g/cm³ y aproximadamente 0.1 g/cm³;
- (b) un SSA de al menos 15 m²/g, 18 m²/g, 20 m²/g, 25 m²/g, 30 m²/g, 35 m²/g, 40 m²/g, o 42 m²/g;
- 10 (c) un SSA de entre aproximadamente 20 m²/g y aproximadamente 50 m²/g, o entre aproximadamente 35 m²/g y aproximadamente 46 m²/g; y/o
- (d) en las que al menos el 20 % (p/p) del docetaxel se disuelve en 30 minutos o menos en una solución de 15 % de metanol/85 % de agua (v/v) a 37 °C y pH 7.0 en un aparato de paletas USP II que funciona a 75 RPM.
- 15 En otra faceta, las partículas de taxano pueden estar en forma cristalina. En una faceta adicional, las suspensiones de las mismas se aerosolizan para su administración, y las gotitas de aerosol tienen un diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) de entre aproximadamente 0.5 µm y aproximadamente 6 µm de diámetro, o entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 3 µm de diámetro, o aproximadamente 2 µm y aproximadamente 3 µm de diámetro.
- 20 En una faceta, el taxano puede permanecer detectable en el tejido pulmonar del sujeto durante al menos 4 días después de la administración.
- En algunas facetas, las partículas de taxano residen en el sitio del tumor después de la administración de la composición exponiendo el tumor a las partículas de taxano durante una cantidad sostenida de tiempo suficiente para estimular el sistema inmunitario endógeno del sujeto, lo que da como resultado la producción de células tumorocidas y la infiltración de las células tumorocidas en el tumor a un nivel suficiente para tratar el tumor. En algunas facetas, la estimulación de los sistemas inmunitarios endógenos produce una respuesta inmunitaria celular (mediada por células). En otras facetas, la estimulación del sistema inmunitario endógeno produce una respuesta inmunitaria humoral. En algunas facetas, la estimulación del sistema inmunitario endógeno produce una vacuna tumoral. En algunas facetas se reducen o eliminan las metástasis.
- 25 En una faceta, el tiempo sostenido es de al menos 4 semanas.
- 30 En algunas facetas, las células tumorocidas comprenden células T, células B o células asesinas naturales (NK), o combinaciones de las mismas.
- En algunas facetas, la composición se administra en dos o más administraciones separadas.
- En algunas facetas, las dos o más administraciones separadas se administran una vez por semana durante al menos dos semanas.
- 35 En otras facetas, las dos o más administraciones separadas se administran dos veces por semana durante al menos una semana, en la que las dos o más administraciones separadas están separadas por al menos un día.
- En algunas facetas, el tratamiento del tumor es la eliminación del tumor.
- Breve descripción de las figuras
- 40 La figura 1 es un gráfico de los niveles de paclitaxel en el tejido pulmonar y en el plasma a lo largo del tiempo a partir de un estudio de inhalación.
- La figura 2 es un gráfico del diámetro aerodinámico de una formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL a partir de un estudio de inhalación.
- 45 La figura 3 es un gráfico del diámetro aerodinámico de una formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/mL de un estudio de inhalación.
- La figura 4 es un gráfico de los niveles plasmáticos de paclitaxel a lo largo del tiempo a partir de un estudio de inhalación.
- La figura 5 es un gráfico de los niveles de paclitaxel en el tejido pulmonar a lo largo del tiempo a partir de un estudio de inhalación.

La figura 6 es un gráfico de los niveles de paclitaxel en el tejido pulmonar y en el plasma a lo largo del tiempo a partir de un estudio de inhalación.

La figura 7 es un diagrama de un nebulizador Hospitak con chorro de aire comprimido.

- 5 La figura 8 es un gráfico del peso corporal del animal a lo largo del tiempo a partir a partir del estudio del cáncer de pulmón ortotópico.

La figura 9 es un gráfico del cambio de peso corporal de los animales a lo largo del tiempo a partir del estudio del cáncer de pulmón ortotópico.

La figura 10 es un gráfico de los pesos de los pulmones de animales a partir del estudio del cáncer de pulmón ortotópico.

- 10 La figura 11 es un gráfico de las proporciones entre el peso de los pulmones y el peso corporal de los animales a partir del estudio del cáncer de pulmón ortotópico.

La figura 12 es un gráfico de las proporciones entre el peso de los pulmones y el peso del cerebro de animales a partir del estudio del cáncer de pulmón ortotópico.

La figura 13 es un gráfico de las áreas tumorales promedio a partir del estudio ortotópico del cáncer de pulmón.

- 15 La figura 14 es un gráfico de las áreas tumorales promedio a partir del estudio ortotópico del cáncer de pulmón.

La figura 15 es un gráfico de regresión tumoral a partir del estudio del cáncer de pulmón ortotópico.

La figura 16 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las masas tumorales pulmonares. (2x).

- 20 La figura 17 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - Control 1006, Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las células indiferenciadas dentro de las masas tumorales pulmonares.

La figura 18 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las células indiferenciadas dentro de las masas tumorales pulmonares.

- 25 La figura 19 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de células indiferenciadas dentro de las masas tumorales pulmonares que muestran masas dentro de los espacios alveolares. a(20x).

La figura 20 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las células primitivas dentro de las masas tumorales pulmonares. b(10x).

- 30 La figura 21 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las células primitivas dentro de las masas tumorales pulmonares. b20x.

La figura 22 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las células primitivas dentro de las masas tumorales pulmonares. b(40x).

- 35 La figura 23 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las células primitivas dentro de las masas tumorales pulmonares. b(40x).

La figura 24 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico: 1006 (control), adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0, bronquiolo. Características primarias de células indiferenciadas que se muestran dentro del bronquiolo. c(20x).

- 40 La figura 25 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0 glándulas. Características primarias de la diferenciación de las glándulas acinares dentro de las masas tumorales pulmonares. d(10x).

La figura 26 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 1006 (control), Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0 glándulas. Características primarias de la diferenciación de las glándulas acinares dentro de las masas tumorales pulmonares. d(20x).

- 45 La figura 27 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0 glándulas. Características primarias de la diferenciación de las glándulas acinares dentro de las masas tumorales pulmonares. d(20x).

- La figura 27 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 2001 (IV ABRAXANE®) Adenocarcinoma-2, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de la masa tumoral pulmonar que empuja debajo de un bronquiolo y no muestra evidencia de invasión intravascular. (2x).
- 5 La figura 28 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 2001 (IV ABRAXANE®) Adenocarcinoma-2, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de la masa tumoral pulmonar que empuja debajo de un bronquiolo y no muestra evidencia de invasión intravascular. (4x).
- La figura 29 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 2001 (IV ABRAXANE®) Adenocarcinoma-2, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de la masa tumoral pulmonar que empuja debajo de un bronquiolo. (10x).
- 10 La figura 30 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 2003 (IV ABRAXANE®) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1. Características de las masas tumorales pulmonares en regresión. (4x).
- La figura 31 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 2003 (IV ABRAXANE®) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1. Características de las masas tumorales pulmonares en regresión. (10x).
- 15 La figura 32 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 2003 (IV ABRAXANE®) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1. Características de las masas tumorales pulmonares en regresión. (20x).
- La figura 33 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 2003 (IV ABRAXANE®) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1. Características de las masas tumorales pulmonares en regresión. Obsérvense los linfocitos y macrófagos a lo largo del borde. 1(40x).
- 20 La figura 34 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 2003 (IV ABRAXANE®) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1. Características de las masas tumorales pulmonares en regresión. Obsérvense los linfocitos y macrófagos a lo largo del borde. 2(40x).
- La figura 35 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 2003 (IV ABRAXANE®) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1. Características de las masas tumorales pulmonares en regresión. Obsérvense los macrófagos más grandes, espumosos y pigmentados. 2, 2x(40x).
- 25 La figura 36 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 2010 (IV ABRAXANE®) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las masas tumorales pulmonares. (2x).
- 30 La figura 37 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 2010 (IV ABRAXANE®) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las masas tumorales pulmonares. (20x).
- La figura 38 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 2010 (IV ABRAXANE®) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las masas tumorales pulmonares. Obsérvense la evidencia sutil de macrófagos a lo largo del borde. (40x).
- 35 La figura 39 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 4009 (formulación de partículas de paclitaxel IH 1x alta) Adenocarcinoma-0, Primitivo-0, Regresión-4. Características de las masas tumorales pulmonares que han experimentado regresión completa. (2x).
- La figura 40 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 4009 (formulación de partículas de paclitaxel IH 1x alta) Adenocarcinoma-0, Primitivo-0, Regresión-4. Características de una masa tumoral pulmonar que ha experimentado regresión completa. Obsérvense la fibrosis del estroma. (10x).
- 40 La figura 41 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 4009 (formulación de partículas de paclitaxel IH 1x alta) Adenocarcinoma-0, Primitivo-0, Regresión-4. Características de una masa tumoral pulmonar que ha experimentado regresión completa. Obsérvense la fibrosis del estroma y los linfocitos y macrófagos a lo largo del borde. (40x).
- 45 La figura 42 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 5010 (formulación de partículas de paclitaxel IH 2x baja) Adenocarcinoma-1, Primitivo-0, Regresión-3. Características de las masas tumorales pulmonares en regresión. (2x).
- 50

La figura 43 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 5010 (formulación de partículas de paclitaxel IH 2x baja) Adenocarcinoma-1, Primitivo-0, Regresión-3. Características de una masa tumoral pulmonar que está en regresión. (10x).

5 La figura 44 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 5010 (formulación de partículas de paclitaxel IH 2x baja) Adenocarcinoma-1, Primitivo-0, Regresión-3. Características de una masa tumoral pulmonar que está en regresión. (20x).

La figura 45 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 5010 (formulación de partículas de paclitaxel IH 2x baja) Adenocarcinoma-1, Primitivo-0, Regresión-3. Características de una masa tumoral pulmonar que está en regresión. (40x).

10 La figura 46 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 6005 (formulación de partículas de paclitaxel IH 2x alta) Adenocarcinoma-1, Primitivo-0, Regresión-4. Características de una masa tumoral pulmonar que está en regresión. (2x).

15 La figura 47 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 6005 (formulación de partículas de paclitaxel IH 2x alta) Adenocarcinoma-1, Primitivo-0, Regresión-4. Características de una masa tumoral pulmonar que está en regresión. Obsérvese la fibrosis del estroma y los linfocitos y macrófagos a lo largo del borde. (10x).

20 La figura 48 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 6005 (formulación de partículas de paclitaxel IH 2x alta) Adenocarcinoma-1, Primitivo-0, Regresión-4. Características de una masa tumoral pulmonar que está en regresión. Obsérvense los linfocitos y macrófagos a lo largo del borde. (20x).

La figura 49 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 6005 (formulación de partículas de paclitaxel IH 2x alta) Adenocarcinoma-1, Primitivo-0, Regresión-4. Obsérvense los linfocitos y macrófagos a lo largo del borde. (40x).

25 La figura 50 es una microfotografía de una preparación de tejido de cáncer de pulmón ortotópico - 6005 (formulación de partículas de paclitaxel IH 2x alta) Adenocarcinoma-1, Primitivo-0, Regresión-4. Obsérvese la presencia de un área focal de células tumorales residuales dentro de un alvéolo. 2(40x).

La figura 51 es un gráfico del peso corporal del animal a lo largo del tiempo a partir de un estudio de inhalación.

La figura 52 es un gráfico del cambio del peso corporal de los animales a lo largo del tiempo a partir de un estudio de inhalación.

30 La figura 53 es un gráfico de los niveles plasmáticos de paclitaxel a lo largo del tiempo a partir de un estudio de inhalación.

La figura 54 es un gráfico de los niveles de paclitaxel en el tejido pulmonar a lo largo del tiempo a partir de un estudio de inhalación.

35 Solamente las formulaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones son según la invención. Cualquier otra formulación se divulga únicamente con fines ilustrativos.

Descripción detallada

Como se usan en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. "Y" como se usa en el presente documento se usa indistintamente con "o" a menos que se indique expresamente lo contrario.

40 Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" significa +/- cinco por ciento (5 %) de la unidad de medida mencionada.

Todas las facetas de cualquier aspecto de la enseñanza pueden usarse en combinación, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

45 A menos que el contexto requiera claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras "comprender", "que comprende" y similares deben interpretarse en un sentido inclusivo, en oposición a un sentido exclusivo o exhaustivo; es decir, en el sentido de "incluyendo, pero no limitado a". Las palabras que utilizan el número singular o plural también incluyen el número plural y singular, respectivamente. Además, las palabras "en el presente documento", "arriba" y "abajo" y palabras de significado similar, cuando se utilicen en esta solicitud, se referirán a esta solicitud en su totalidad y no a ninguna parte particular de la solicitud. Las composiciones para el uso definido pueden "comprender", "consistir esencialmente en" o "consistir en" cualquiera de los ingredientes o etapas divulgados a lo largo de la memoria descriptiva.

La descripción de las facetas de la divulgación no pretende ser exhaustiva ni limitar la divulgación a la forma precisa en que se divulga. Si bien las facetas específicas y los ejemplos de la divulgación se describen en el presente documento con fines ilustrativos, son posibles diversas modificaciones equivalentes dentro del alcance de la divulgación, como reconocerán los expertos en la técnica pertinente. Solamente aquellas facetas que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas son según la invención.

En un primer aspecto, la enseñanza proporciona una suspensión aerosolizada que comprende partículas de taxano que comprenden al menos el 95 % en peso del taxano, en la que las partículas de taxano tienen un tamaño de partícula medio (número) de entre 0.4 μm y 2 μm según se determina por oscurecimiento de luz o difracción láser, un área de superficie específica (SSA) de entre 12 m^2/g y $60 \pm 3 \text{ m}^2/\text{g}$ medido por la isoterma de Brunauer-Emmett-Teller y una densidad aparente media de entre $0.050 \pm 0.0025 \text{ g/cm}^3$ y $0.12 \pm 0.006 \text{ g/cm}^3$ como se mide vertiendo las partículas en un cilindro graduado, sin golpear, a temperatura ambiente, para su uso en el tratamiento de un tumor pulmonar, en el que la suspensión se administra por vía pulmonar mediante nebulización a un sujeto con un tumor pulmonar, y en el que el taxano comprende paclitaxel, docetaxel o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que la administración pulmonar de las partículas de taxano según las enseñanzas da como resultado tiempos de residencia del taxano en los pulmones mucho más largos de lo que era posible anteriormente utilizando cualquier otra formulación de taxano. Como se muestra en los ejemplos que siguen, el taxano permanece detectable en el tejido pulmonar del sujeto durante al menos 96 horas después de la administración. En diversas facetas adicionales, el taxano permanece detectable en el tejido pulmonar del sujeto durante al menos 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228, 240, 252, 264, 276, 288, 300, 312, 324 o 336 horas después de la administración.

Otro aspecto de la enseñanza es que las partículas de taxano se exponen a un tumor pulmonar después de la administración de la composición durante una cantidad sostenida de tiempo suficiente para estimular el sistema inmunitario endógeno del sujeto, lo que da como resultado la producción de células tumorocidas y la infiltración de las células tumorocidas en el tumor a un nivel suficiente para tratar el tumor. En algunas facetas, la estimulación de los sistemas inmunitarios endógenos produce una respuesta inmunitaria celular (mediada por células). En otras facetas, la estimulación del sistema inmunitario endógeno produce una respuesta inmunitaria humoral. En algunas facetas, la estimulación del sistema inmunitario endógeno produce una vacuna tumoral. En algunas facetas se reducen o eliminan las metástasis. Las células tumorocidas pueden comprender células T, células B o células asesinas naturales (NK), o combinaciones de las mismas. En algunas facetas, el tiempo de exposición sostenida es de al menos 108, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 204, 216, 228, 240, 252, 264, 276, 288, 300, 312, 324 o 336 horas. En otras facetas diversas, el tiempo de exposición sostenido es de al menos 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas. La composición puede administrarse mediante administración pulmonar en una sola administración (ciclo) de una dosis única, o en dos o más administraciones separadas (2 o más ciclos) de dosis únicas. En algunas facetas, las dos o más administraciones separadas se administran con una diferencia de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 14 días. En algunas facetas, las dos o más administraciones separadas se administran con 2 a 12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-12, 5-11, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-12, 6-11, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-12, 7-11, 7-10, 7-9, 7-8, 8-12, 8-11, 8-10, 8-9, 9-12, 9-11, 9-10, 10-12, 10-11, 11-12, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 semanas de diferencia. En algunas facetas, la composición se administra en 2-5, 2-4, 2-3, 3-5, 3-4, 2, 3, 4, 5 o más administraciones separadas. En algunas facetas, las dos o más administraciones separadas se administran con un intervalo de 2 a 12 semanas. En algunas facetas, la composición se administra en dos a cinco administraciones separadas. En algunas facetas, las dos o más administraciones separadas se administran una vez por semana durante al menos dos semanas. En otras facetas, las dos o más administraciones separadas se administran dos veces por semana durante al menos una semana, en las que las dos o más administraciones separadas están separadas por al menos un día. En algunas facetas el método de tratamiento da como resultado la eliminación (erradicación) del tumor. En algunas facetas, la composición se administra en 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más administraciones separadas. En otras facetas, la composición se administra en 7 o más administraciones separadas.

Como se usa en el presente documento, "partículas de taxano" son partículas que consisten esencialmente en el taxano (es decir: al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % en peso de taxano) que tienen un tamaño de partícula medio (número) de entre 0.4 μm y 2 μm . Las partículas de taxano para su uso en la enseñanza no están recubiertas y no están incrustadas, contenidas, encerradas o encapsuladas dentro de un excipiente sólido. Sin embargo, las partículas de taxano de la enseñanza pueden contener impurezas y subproductos que por lo general se encuentran durante la preparación del taxano. Aun así, las partículas de taxano comprenden al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % en peso de taxano, lo que significa que las partículas de taxano consisten o consisten esencialmente en taxano sustancialmente puro.

Los taxanos son una clase de diterpenoides que contienen un núcleo de taxadieno y que son muy poco solubles en agua. Las partículas de taxano de la enseñanza comprenden paclitaxel, docetaxel o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los ingredientes farmacéuticos activos (API) de paclitaxel y docetaxel están disponibles comercialmente en Phyton Biotech LLC, Vancouver, Canadá. El API de docetaxel contiene no menos del 95 %, o no menos del 97.5 % de docetaxel calculado sobre la base anhidra y libre de disolventes. El API de paclitaxel contiene no menos del 95 %, o no menos del 97 % de paclitaxel calculado sobre la base anhidra y libre de disolventes. En algunas facetas, el API de paclitaxel y el API de docetaxel son de grado USP y/o EP. El API de paclitaxel se puede preparar a partir de un procedimiento químico semisintético o de una fuente natural tal como la fermentación o extracción de células vegetales.

El tumor pulmonar es cualquier tumor presente dentro de los pulmones y puede ser un tumor pulmonar primario o metastásico. Los ejemplos de tumores pulmonares incluyen el carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC) y el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC). En una faceta, el tumor pulmonar es SCLC. En otra faceta, el tumor pulmonar es un NSCLC. El sujeto puede ser cualquier mamífero sujeto a tumores pulmonares, incluidos, pero no limitados a, humanos y otros primates, perros, gatos, caballos, ganado, cerdos, ovejas, cabras, etc.

La "cantidad eficaz" de la partícula de taxano puede ser determinada por el médico tratante basándose en todos los factores relevantes. Las partículas de taxano pueden ser el único taxano administrado o pueden administrarse con otros agentes terapéuticos según lo considere apropiado el médico tratante a la luz de todas las circunstancias. En una faceta, el sujeto es tratado con el estándar de atención para el tumor que se va a tratar, tal como quimioterapia intravenosa, radioterapia, resección quirúrgica, etc.

Como se usa en el presente documento, "tratar", "tratamiento" o "tratando" significa lograr uno o más de los siguientes: (a) reducir el tamaño del tumor; (b) reducir la tasa de crecimiento del tumor; (c) eliminar un tumor; (d) reducir o limitar el desarrollo y/o la propagación de metástasis, o eliminar metástasis. En algunas facetas el tratamiento consiste en eliminar un tumor.

En una faceta específica de la enseñanza, la administración pulmonar comprende la inhalación de una dosis única de partículas de taxano, ya sea por vía nasal, oral o ambas. Las partículas de taxano se pueden administrar en dos o más administraciones (dosis) separadas. Las partículas de taxano están formuladas como un aerosol (es decir: gotas líquidas de una suspensión estable de partículas antineoplásicas en un medio gaseoso). Las partículas de taxano transportadas por aerosol pueden depositarse en las vías respiratorias por sedimentación gravitacional, impactación inercial y/o difusión. En la presente invención, la administración pulmonar comprende la inhalación de partículas de taxano aerosolizadas mediante nebulización. Los nebulizadores generalmente utilizan aire comprimido o energía ultrasónica para crear gotas de aerosol inhalables de partículas de taxano o suspensiones de las mismas. En esta faceta, la nebulización da como resultado la administración pulmonar al sujeto de gotitas de aerosol de las partículas de taxano o de una suspensión de las mismas.

En facetas adicionales, las partículas de taxano tienen un tamaño de partícula medio (número) de entre 0.5 μm y 1.5 μm .

En facetas adicionales, las partículas de taxano pueden tener un número de tamaño de partícula medio en el intervalo de aproximadamente 0.5 μm a aproximadamente 1.4 μm , de 0.4 μm a aproximadamente 0.8 μm , de 0.4 μm a aproximadamente 0.7 μm , o de aproximadamente 0.5 μm a aproximadamente 0.7 μm . En una faceta adicional, las partículas de taxano tienen un número de tamaño de partícula medio de entre 0.4 μm y aproximadamente 1.2 μm , o entre aproximadamente 0.6 μm y aproximadamente 1.0 μm . En otra faceta, las partículas de taxano tienen un número de tamaño de partícula medio de entre 0.6 μm y 0.861 μm , o entre aproximadamente 0.5 μm y aproximadamente 0.7 μm , o entre 0.4 μm y aproximadamente 1 μm , o entre 0.4 μm y menos de 1 μm .

El tamaño de partícula de las partículas de taxano se puede determinar mediante un instrumento analizador de tamaño de partículas y la medición se expresa como el diámetro medio basado en una distribución numérica (número). Un instrumento analizador de tamaño de partículas adecuado es aquel que emplea la técnica analítica de oscurecimiento de la luz, también conocida como fotozona o detección óptica de partículas individuales (SPOS). Un instrumento analizador de tamaño de partículas por oscurecimiento de la luz adecuado es el ACCUSIZER, tal como el ACCUSIZER 780 SIS, disponible en Particle Sizing Systems, Port Richey, Florida. Otro instrumento analizador de tamaño de partículas adecuado es aquel que emplea difracción láser, tal como el Shimadzu SALD-7101.

En la presente invención, las partículas de taxano se aerosolizan para su administración, y el diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) de las gotas de aerosol de las partículas de taxano o suspensiones de las mismas puede ser cualquier diámetro adecuado para su uso en la enseñanza. En una faceta, las gotas de aerosol tienen un MMAD de entre aproximadamente 0.5 μm y aproximadamente 6 μm de diámetro. En diversas facetas adicionales, las gotitas de aerosol tienen un MMAD de entre aproximadamente 0.5 μm y aproximadamente 5.5 μm de diámetro, aproximadamente 0.5 μm y aproximadamente 5 μm de diámetro, aproximadamente 0.5 μm y aproximadamente 4.5 μm de diámetro, aproximadamente 0.5 μm y aproximadamente 4 μm de diámetro, aproximadamente 0.5 μm y aproximadamente 3.5 μm de diámetro,

aproximadamente 0.5 μm y aproximadamente 3 μm de diámetro, aproximadamente 0.5 μm y aproximadamente 2.5 μm de diámetro, aproximadamente 0.5 μm y aproximadamente 2 μm de diámetro, aproximadamente 1 μm y aproximadamente 5.5 μm de diámetro, aproximadamente 1 μm y aproximadamente 5 μm de diámetro, aproximadamente 1 μm y aproximadamente 4.5 μm de diámetro, aproximadamente 1 μm y aproximadamente 4 μm de diámetro, aproximadamente 1 μm y aproximadamente 3.5 μm de diámetro, aproximadamente 1 μm y aproximadamente 3 μm de diámetro, aproximadamente 1 μm y aproximadamente 2.5 μm de diámetro, aproximadamente 1 μm y aproximadamente 2 μm de diámetro, aproximadamente 1.5 μm y aproximadamente 5.5 μm de diámetro, aproximadamente 1.5 μm y aproximadamente 5 μm de diámetro, aproximadamente 1.5 μm y aproximadamente 4.5 μm de diámetro, aproximadamente 1.5 μm y aproximadamente 4 μm de diámetro, aproximadamente 1.5 μm y aproximadamente 3.5 μm de diámetro, aproximadamente 1.5 μm y aproximadamente 3 μm de diámetro, aproximadamente 1.5 μm y aproximadamente 2.5 μm de diámetro, aproximadamente 1.5 μm y aproximadamente 2 μm de diámetro, aproximadamente 2 μm y aproximadamente 5.5 μm de diámetro, aproximadamente 2 μm y aproximadamente 5 μm de diámetro, aproximadamente 2 μm y aproximadamente 4.5 μm de diámetro, aproximadamente 2 μm y aproximadamente 4 μm de diámetro, aproximadamente 2 μm y aproximadamente 3.5 μm de diámetro, aproximadamente 2 μm y aproximadamente 3 μm de diámetro, y aproximadamente 2 μm y aproximadamente 2.5 μm de diámetro. Un instrumento adecuado para medir el diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) y la desviación estándar geométrica (GSD) de las gotas de aerosol es un muestreador de aerosol de siete etapas tal como el impactador en cascada estilo Mercer.

En otra faceta, las partículas de taxano pueden tener un área superficial específica (SSA) de al menos 14 m^2/g , 16 m^2/g , 18 m^2/g , 20 m^2/g , 25 m^2/g , 30 m^2/g , 32 m^2/g , 34 m^2/g , o 35 m^2/g . Más específicamente, el SSA es según las reivindicaciones.

En diversas facetas, las partículas de taxano se fabrican mediante métodos de "precipitación con antisolventes comprimidos" (PCA) como se divulga en las Patentes de los Estados Unidos US 5874029, US 5833891, US 6113795, US 7744923, US 8778181, US 9233348; publicaciones de los Estados Unidos US 2015/0375153, US 2016/0354336, US 2016/0374953; y las publicaciones de las solicitudes de las patentes internacionales WO 2016/197091, WO 2016/197100, y WO 2016/197101.

En los métodos de reducción de tamaño de partículas de PCA que utilizan dióxido de carbono supercrítico, se emplean dióxido de carbono supercrítico (antisolvente) y disolvente, por ejemplo, acetona o etanol, para generar partículas de taxano sin recubrimiento tan pequeñas como 0.1 a 5 micrómetros dentro de una distribución de tamaño de partícula bien caracterizada. El dióxido de carbono y el disolvente se eliminan durante el procesamiento (puede quedar hasta un 0.5 % de disolvente residual), dejando las partículas de taxano en forma de polvo. Los estudios de estabilidad muestran que el polvo de partículas de paclitaxel es estable en forma de dosis de vial cuando se almacena a temperatura ambiente hasta por 59 meses y en condiciones aceleradas (40 °C/75 % de humedad relativa) hasta por seis meses.

Las partículas de taxano producidas por diversos métodos de reducción de tamaño de partículas de dióxido de carbono supercrítico pueden tener características físicas únicas en comparación con las partículas de taxano producidas por métodos convencionales de reducción de tamaño de partículas que utilizan impacto físico o molienda, por ejemplo, molienda húmeda o seca, micronización, desintegración, trituración, microfluidización o pulverización. Como se divulga en US publication 2016/0374953, tales características únicas incluyen una densidad aparente (la masa de la totalidad de partículas en la composición dividida por el volumen total que ocupan cuando se vierten en un cilindro graduado, sin golpear el cilindro graduado, con el volumen total incluyendo el volumen de partículas, el volumen de vacío entre partículas y el volumen de poros internos) entre 0.05 g/cm^3 y 0.12 g/cm^3 y una superficie específica (SSA) de al menos 18 m^2/g de partículas de taxano (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), que se producen mediante los métodos de reducción de tamaño de partículas de dióxido de carbono supercrítico descritos en US publication 2016/0374953 y como se describe a continuación. Este intervalo de densidad aparente es generalmente más bajo que la densidad aparente de partículas de taxano producidas por medios convencionales, y el SSA es generalmente más alto que el SSA de partículas de taxano producidas por medios convencionales. Estas características únicas dan como resultado aumentos significativos en las tasas de disolución en medios de agua/metanol en comparación con los taxanos producidos por medios convencionales. Como se usa en el presente documento, el "área superficial específica" (SSA) es el área superficial total de la partícula de taxano por unidad de masa de taxano medida mediante la isoterma de Brunauer-Emmett-Teller ("BET") mediante el siguiente método: se agrega una masa conocida entre 200 y 300 mg del analito a un tubo de muestra de 30 mL. A continuación, el tubo cargado se monta en un SORPTOMETER® de Porous Materials Inc., modelo BET-202A. A continuación se lleva a cabo la prueba automatizada utilizando el paquete de software BETWIN® y posteriormente se calcula el área de superficie de cada muestra. Como comprenderán los expertos en la técnica, las "partículas de taxano" pueden incluir tanto partículas de taxano aglomeradas como partículas de taxano no aglomeradas; dado que el SSA se determina sobre una base por gramo, tiene en cuenta tanto las partículas de taxano aglomeradas como las no aglomeradas en la composición. El procedimiento de prueba de área de superficie específica BET es un método compendial incluido tanto en the United States Pharmacopoeia como en the European Pharmacopoeia. La medición de la densidad aparente se puede realizar vertiendo las partículas de taxano en un cilindro graduado sin golpearlo a temperatura ambiente, midiendo la masa y el volumen y calculando la densidad aparente.

Como se divulga en US publication 2016/0374953, los estudios mostraron un SSA de 15.0 m²/g y una densidad aparente de 0.31 g/cm³ para partículas de paclitaxel producidas moliendo paclitaxel en un molino de bolas Deco-PBM-V-0.41 utilizando un tamaño de bola de 5 mm, a 600 RPM durante 60 minutos a temperatura ambiente. También se divulga en US publication 2016/0374953, un lote de partículas de paclitaxel tenía un SSA de 37.7 m²/g y una densidad aparente de 0.085 g/cm³ cuando se produce mediante un método de dióxido de carbono supercrítico utilizando el siguiente método: se preparó una solución de 65 mg/mL de paclitaxel en acetona. Una boquilla de niebla MicroWhirl de BETE® (BETE Fog Nozzle, Inc.) y una sonda sónica (Qsonica, modelo número Q700) se colocaron en la cámara de cristalización a una distancia de aproximadamente 8 mm. Se colocó un filtro de malla de acero inoxidable con orificios de aproximadamente 100 nm en la cámara de cristalización para recolectar las partículas de paclitaxel precipitadas. El dióxido de carbono supercrítico se colocó en la cámara de cristalización del equipo de fabricación y se llevó a aproximadamente 8273.7 kPa (1200 psi) a aproximadamente 38 °C y un caudal de 24 kg/hora. La sonda sónica se ajustó al 60 % de la potencia de salida total a una frecuencia de 20 kHz. La solución de acetona que contenía paclitaxel se bombeó a través de la boquilla a un caudal de 4.5 mL/minuto durante aproximadamente 36 horas. Lotes adicionales de partículas de paclitaxel producidas mediante el método de dióxido de carbono supercrítico descrito anteriormente tuvieron valores de SSA de: 22.27 m²/g, 23.90 m²/g, 26.19 m²/g, 30.02 m²/g, 31.16 m²/g, 31.70 m²/g, 32.59 m²/g, 33.82 m²/g, 35.90 m²/g, 38.22 m²/g, y 38.52 m²/g.

Como se divulga en US publication 2016/0374953, los estudios mostraron un SSA de 15.2 m²/g y una densidad aparente de 0.44 g/cm³ para partículas de docetaxel producidas moliendo docetaxel en un molino de bolas Deco-PBM-V-0.41 utilizando un tamaño de bola de 5 mm, a 600 RPM durante 60 minutos a temperatura ambiente. También se divulga en US publication 2016/0374953, partículas de docetaxel tenían un SSA de 44.2 m²/g y una densidad aparente de 0.079 g/cm³ cuando se produce mediante un método de dióxido de carbono supercrítico utilizando el siguiente método: Se preparó una solución de 79.32 mg/mL de docetaxel en etanol. La boquilla y una sonda sónica se colocaron en la cámara presurizable a una distancia de aproximadamente 9 mm. Se conectó a la cámara presurizable un filtro de malla de acero inoxidable con orificios de aproximadamente 100 nm para recolectar las partículas de docetaxel precipitadas. El dióxido de carbono supercrítico se colocó en la cámara presurizable del equipo de fabricación y se llevó a aproximadamente 8273.7 kPa (1200 psi) a aproximadamente 38 °C y un caudal de 68 slpm. La sonda sónica se ajustó al 60 % de la potencia de salida total a una frecuencia de 20 kHz. La solución de etanol que contenía docetaxel se bombeó a través de la boquilla a un caudal de 2 mL/minuto durante aproximadamente 95 minutos.

Luego, los aglomerados y partículas de docetaxel precipitados se recogieron del dióxido de carbono supercrítico mientras la mezcla se bombeaba a través del filtro de malla de acero inoxidable. Se abrió el filtro que contenía las partículas de docetaxel y se recogió el producto resultante del filtro.

Como se divulga en US publication 2016/0374953, los estudios de disolución mostraron una mayor tasa de disolución en medios de metanol/agua de partículas de paclitaxel y docetaxel elaboradas mediante los métodos de dióxido de carbono supercrítico descritos en US publication 2016/0374953 en comparación con las partículas de paclitaxel y docetaxel obtenidas moliendo paclitaxel y docetaxel con un molino de bolas Deco-PBM-V-0.41 que utiliza un tamaño de bola de 5 mm, a 600 RPM durante 60 minutos a temperatura ambiente. Los procedimientos usados para determinar las tasas de disolución son los siguientes. Para el paclitaxel, se recubrieron aproximadamente 50 mg de material sobre aproximadamente 1.5 gramos de perlas de vidrio de 1 mm haciendo girar el material y las perlas en un vial durante aproximadamente 1 hora. Las perlas se transfirieron a un recipiente de malla de acero inoxidable y se colocaron en un baño de disolución que contenía medio metanol/agua 50/50 (v/v) a 37 °C, pH 7 y un aparato USP II (paleta), que funcionaba a 75 rpm. A los 10, 20, 30, 60 y 90 minutos, se extrajo una alícuota de 5 mL, se filtró a través de un filtro de 0.22 µm y se analizó en un espectrofotómetro UV/VIS a 227 nm. Los valores de absorbancia de las muestras se compararon con los de soluciones estándar preparadas en medios de disolución para determinar la cantidad de material disuelto. Para docetaxel, se colocaron aproximadamente 50 mg de material directamente en el baño de disolución que contenía medio metanol/agua 15/85 (v/v) a 37 °C, pH 7 y un aparato USP II (paleta), que funcionaba a 75 rpm. A los 5, 15, 30, 60, 120 y 225 minutos, se tomó una alícuota de 5 mL, se filtró a través de un filtro de 0.22 µm y se analizó en un espectrofotómetro UV/VIS a 232 nm. Los valores de absorbancia de las muestras se compararon con los de soluciones estándar preparadas en medios de disolución para determinar la cantidad de material disuelto. En el caso del paclitaxel, la tasa de disolución fue del 47 % disuelto en 30 minutos para las partículas obtenidas mediante el método de dióxido de carbono supercrítico frente al 32 % disuelto en 30 minutos para las partículas obtenidas mediante molienda. En el caso del docetaxel, la tasa de disolución fue del 27 % disuelto en 30 minutos para las partículas obtenidas mediante el método de dióxido de carbono supercrítico frente al 9 % disuelto en 30 minutos para las partículas obtenidas mediante molienda.

En algunas facetas, las partículas de taxano tienen un SSA de al menos 14, al menos 16, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30, al menos 31, al menos 32, al menos 33, al menos 34 o al menos 35 m²/g. Más concretamente, el SSA es según las reivindicaciones. En una faceta, las partículas antineoplásicas tienen un SSA de entre 12 m²/g y aproximadamente 50 m²/g. Las partículas antineoplásicas tienen una densidad aparente (no compactada) de entre 0.05 ± 0.0025 g/cm³ y 0.12 ± 0.006 g/cm³.

En facetas adicionales, las partículas antineoplásicas tienen un SSA de:

- (a) entre 16 m²/g y 31 m²/g o entre 32 m²/g y 40 m²/g;
- (b) entre 16 m²/g y 30 m²/g o entre 32 m²/g y 40 m²/g;
- (c) entre 16 m²/g y 29 m²/g o entre 32 m²/g y 40 m²/g;
- 5 (d) entre 17 m²/g y 31 m²/g o entre 32 m²/g y 40 m²/g;
- (e) entre 17 m²/g y 30 m²/g o entre 32 m²/g y 40 m²/g;
- (f) entre 17 m²/g y 29 m²/g, o entre 32 m²/g y 40 m²/g;
- (g) entre 16 m²/g y 31 m²/g o entre 33 m²/g y 40 m²/g;
- (h) entre 16 m²/g y 30 m²/g o entre 33 m²/g y 40 m²/g;
- 10 (i) entre 16 m²/g y 29 m²/g o entre 33 m²/g y 40 m²/g;
- (j) entre 17 m²/g y 31 m²/g o entre 33 m²/g y 40 m²/g;
- (k) entre 17 m²/g y 30 m²/g o entre 33 m²/g y 40 m²/g;
- (l) entre 17 m²/g y 29 m²/g, o entre 33 m²/g y 40 m²/g;
- (m) entre 16 m²/g y 31 m²/g, o ≥ 32 m²/g;
- 15 (h) entre 17 m²/g y 31 m²/g, o ≥ 32 m²/g;
- (i) entre 16 m²/g y 30 m²/g, o ≥ 32 m²/g;
- (j) entre 17 m²/g y 30 m²/g, o ≥ 32 m²/g;
- (k) entre 16 m²/g y 29 m²/g, o ≥ 32 m²/g;
- (l) entre 17 m²/g y 29 m²/g, o ≥ 32 m²/g;
- 20 (m) entre 16 m²/g y 31 m²/g, o ≥ 33 m²/g;
- (n) entre 17 m²/g y 31 m²/g, o ≥ 33 m²/g;
- (o) entre 16 m²/g y 30 m²/g, o ≥ 33 m²/g;
- (p) entre 17 m²/g y 30 m²/g, o ≥ 33 m²/g;
- (q) entre 16 m²/g y 29 m²/g, o ≥ 33 m²/g; o
- 25 (r) entre 17 m²/g y 29 m²/g, o ≥ 33 m²/g.

En algunas facetas, las partículas de taxano son partículas de paclitaxel y tienen un SSA de al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30, al menos 31, al menos 32, al menos 33, al menos 34 o al menos 35 m²/g. En otras facetas, las partículas de paclitaxel tienen un SSA de 18 $\mu\text{m}^2/\text{g}$ a 50 m²/g, o 20 m²/g a 50 m²/g, o 22 m²/g a 50 m²/g, o 25 m²/g a 50 m²/g, o 26 m²/g a 50 m²/g, o 30 m²/g a 50 m²/g, o 35 m²/g a 50 m²/g, o 18 m²/g a 45 m²/g, o 20 m²/g a 45 m²/g, o 22 m²/g a 45 m²/g, o 25 m²/g a 45 m²/g, o 26 m²/g a 45 m²/g o 30 m²/g a 45 m²/g, o 35 m²/g a 45 m²/g, o 18 m²/g a 40 m²/g, o 20 m²/g a 40 m²/g, o 22 m²/g a 40 m²/g, o 25 m²/g a 40 m²/g, o 26 m²/g a 40 m²/g, o 30 m²/g a 40 m²/g, o 35 m²/g a 40 m²/g. Más concretamente, el SSA es según las reivindicaciones.

- 35 En algunas facetas, las partículas de paclitaxel tienen una densidad aparente (no compactada) de 0.05 g/cm³ hasta 0.12 g/cm³.

En algunas facetas, las partículas de paclitaxel tienen una tasa de disolución de al menos 40 % p/p disueltas en 30 minutos o menos en una solución de 50 % de metanol/50 % de agua (v/v) en un aparato de paletas USP II que funciona a 75 RPM, a 37 °C y a un pH de 7.

- 40 En otra faceta, las partículas de paclitaxel tienen una o más de las siguientes características:

(a) una densidad aparente media (no compactada) de entre aproximadamente 0.060 g/cm³ y aproximadamente 0.11 g/cm³;

(b) un SSA de al menos 15 m²/g, 18 m²/g, 20 m²/g, 25 m²/g, 30 m²/g, 32 m²/g, 34 m²/g, o 35 m²/g;

(c) un SSA de entre aproximadamente 22 m²/g y aproximadamente 40 m²/g, 25 m²/g y aproximadamente 40 m²/g, 30 m²/g y aproximadamente 40 m²/g, o entre aproximadamente 35 m²/g y aproximadamente 40 m²/g; y/o

- 5 (d) en el que al menos el 40 % (p/p) del paclitaxel se disuelve en 30 minutos o menos en una solución de 50 % de metanol/50 % de agua (v/v) a 37 °C y pH 7.0 en un aparato de paletas USP II que funciona a 75 RPM.

En una faceta, las partículas de paclitaxel tienen una densidad aparente media (no compactada) de entre 0.05 ± 0.0025 g/cm³ y 12 ± 0.006 g/cm³ y un SSA de al menos 30 m²/g. En otra faceta, las partículas de paclitaxel tienen una densidad aparente media (no compactada) de entre 0.05 ± 0.0025 g/cm³ y 0.12 ± 0.006 g/cm³ y un SSA de al menos 35 m²/g. En una faceta, las partículas de paclitaxel tienen una densidad aparente media (no compactada) de entre 0.05 ± 0.0025 g/cm³ y 0.12 ± 0.006 g/cm³ y un SSA de entre aproximadamente 30 m²/g y aproximadamente 40 m²/g. En otra faceta, las partículas de paclitaxel tienen una densidad aparente media (no compactada) de entre aproximadamente 0.060 g/cm³ y aproximadamente 0.11 g/cm³ y un SSA de entre aproximadamente 30 m²/g y aproximadamente 40 m²/g. En otra faceta, las partículas de paclitaxel tienen una densidad aparente media (no compactada) de entre aproximadamente 0.060 g/cm³ y aproximadamente 0.11 g/cm³ y un SSA de al menos 30 m²/g. En una faceta adicional, las partículas de paclitaxel tienen una densidad aparente media (no compactada) de entre aproximadamente 0.060 g/cm³ y aproximadamente 0.11 g/cm³ y un SSA de al menos 35 m²/g. Más concretamente, el SSA es según las reivindicaciones.

- 20 En otra faceta, al menos el 40 % (p/p) del paclitaxel en las partículas de paclitaxel de la composición se disuelve en 30 minutos o menos en una solución de 50 % de metanol/50 % de agua (v/v) en un aparato de paletas USP II que funciona a 75 RPM. Se utilizó un pH de 7 y la solubilidad de los taxanos no se ve afectada por el pH. En otra faceta, los estudios de disolución se realizan a 37 °C.

- 25 En algunas facetas, las partículas de taxano son partículas de docetaxel y tienen un SSA de al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30, al menos 31, al menos 32, al menos 33, al menos 34, al menos 35, al menos 36, al menos 37, al menos 38, al menos 39, al menos 40, al menos 41 o al menos 42 m²/g. En otras facetas, las partículas de docetaxel tienen un SSA de 18 m²/g a 60 m²/g, o 22 m²/g a 60 m²/g, o 25 m²/g a 60 m²/g, o 30 m²/g a 60 m²/g, o 40 m²/g a 60 m²/g, o 18 m²/g a 50 m²/g, o 22 m²/g a 50 m²/g, o 25 m²/g a 50 m²/g, o 26 m²/g a 50 m²/g, o 30 m²/g a 50 m²/g, o 35 m²/g a 50 m²/g, o 40 m²/g a 50 m²/g. Más concretamente, el SSA es según las reivindicaciones.

En algunas facetas, las partículas de docetaxel tienen una densidad aparente (no compactada) de 0.05 g/cm³ hasta 0.12 g/cm³.

- 35 En algunas facetas, las partículas de docetaxel tienen una tasa de disolución de al menos 20 % p/p disueltas en 30 minutos o menos en una solución de 15 % metanol/85 % agua (v/v) en un aparato de paletas USP II que funciona a 75 RPM, a 37 °C y a un pH de 7.

En otra faceta, las partículas de docetaxel tienen una o más de las siguientes características:

(a) una densidad aparente media (no compactada) de entre aproximadamente 0.06 g/cm³ y aproximadamente 0.1 g/cm³;

(b) un SSA de al menos 15 m²/g, 18 m²/g, 20 m²/g, 25 m²/g, 30 m²/g, 35 m²/g, 40 m²/g, o 42 m²/g;

- 40 (c) un SSA de entre aproximadamente 20 m²/g y aproximadamente 50 m²/g, o entre aproximadamente 35 m²/g y aproximadamente 46 m²/g; y/o

(d) en el que al menos el 20 % (p/p) del docetaxel se disuelve en 30 minutos o menos en una solución de 15 % de metanol/85 % de agua (v/v) a 37 °C y pH 7.0 en un aparato de paletas USP II que funciona a 75 RPM.

- 45 En una faceta, las partículas de docetaxel tienen una densidad aparente media (no compactada) entre 0.05 ± 0.0025 g/cm³ y 0.12 ± 0.006 g/cm³ y un SSA de al menos 30 m²/g. En otra faceta, las partículas de docetaxel tienen una densidad aparente media (no compactada) entre 0.05 ± 0.0025 g/cm³ y 0.12 ± 0.006 g/cm³ y un SSA de al menos 35 m²/g. En una faceta adicional, las partículas de docetaxel tienen una densidad aparente media (no compactada) entre 0.05 ± 0.0025 g/cm³ y 0.12 ± 0.006 g/cm³ y un SSA de al menos 40 m²/g. En una faceta, las partículas de docetaxel tienen una densidad aparente media (no compactada) entre 0.05 ± 0.0025 g/cm³ y 0.12 ± 0.006 g/cm³ y un SSA de entre aproximadamente 20 m²/g y aproximadamente 50 m²/g. En otra faceta, la densidad aparente media (no compactada) de las partículas de docetaxel está entre aproximadamente 0.06 g/cm³ y aproximadamente 0.1 g/cm³ y el SSA está entre aproximadamente 30 m²/g y aproximadamente 50 m²/g. En otra faceta, la densidad aparente media (no compactada) de las partículas de docetaxel está entre aproximadamente 0.06 g/cm³ y aproximadamente 0.1 g/cm³ y el SSA está entre aproximadamente 35 m²/g y aproximadamente 50 m²/g. En otra faceta, la densidad aparente media (no

compactada) de las partículas de docetaxel está entre aproximadamente 0.06 g/cm³ y aproximadamente 0.1 g/cm³ y el SSA está entre aproximadamente 35 m²/g y aproximadamente 45 m²/g. Más concretamente, el SSA es según las reivindicaciones.

En otra faceta, al menos el 20 % (p/p) del docetaxel se disuelve en 30 minutos o menos en una solución de 15 % de metanol/85 % de agua (v/v) en un aparato de paletas USP II que funciona a 75 RPM. Se utilizó un pH neutro donde la solubilidad de los taxanos no se ve afectada por el pH. En otra faceta, los estudios de disolución se llevan a cabo a 37 °C.

En cualquiera de estas diversas facetas, las partículas de taxano pueden incluir al menos 4.16×10^{-13} gramo de taxano, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo por partícula de taxano. En algunas facetas, las partículas de taxano son partículas individuales no aglomeradas y no son grupos de múltiples partículas de taxano.

15 En diversas facetas de la presente enseñanza, las partículas de taxano son partículas individuales sin recubrimiento (puras); las partículas de taxano no están unidas ni conjugadas con ninguna sustancia; ninguna sustancia es absorbida o adsorbida sobre la superficie de las partículas de taxano; las partículas de taxano no están encapsuladas en ninguna sustancia; las partículas de taxano no están recubiertas con ninguna sustancia; las partículas de taxano no son microemulsiones, nanoemulsiones, microesferas o liposomas de un taxano; y/o las partículas de taxano no están unidas, adheridas a, encapsuladas en o recubiertas con un monómero, un polímero (o polímero biocompatible), una proteína, un surfactante o albúmina. En algunas facetas, un monómero, un polímero (o polímero biocompatible), un copolímero, una proteína, un surfactante o albúmina no se absorbe ni se adsorbe en la superficie de las partículas de taxano. En algunas facetas, las composiciones están libres de/no incluyen o contienen un polímero/copolímero o polímero/copolímero biocompatible. En algunas facetas, las composiciones están libres de/no incluyen o contienen una proteína. En algunos aspectos de la enseñanza, las composiciones están libres de/no incluyen o contienen albúmina. En algunos aspectos de la enseñanza, las composiciones están libres de/no incluyen o contienen ácido hialurónico. En algunos aspectos de la enseñanza, las composiciones están libres de/no incluyen o contienen un conjugado de ácido hialurónico y un taxano. En algunos aspectos de la enseñanza, las composiciones están libres de/no incluyen o contienen un conjugado de ácido hialurónico y paclitaxel. En algunos aspectos de la enseñanza, las composiciones están libres de/no incluyen o contienen poloxámeros, polianiones, policationes, polianiones modificados, policationes modificados, quitosano, derivados de quitosano, iones metálicos, nanovectores, ácido poli-gamma-glutámico (PGA), ácido poliacrílico (PAA), ácido algínico (ALG), vitamina E-TPGS, dimetil isosorbida (DMI), metoxi PEG 350, ácido cítrico, anticuerpo anti-VEGF, etilcelulosa, poliestireno, polianhídridos, ácidos polihidroxilados, polifosfacenos, poliortoésteres, poliésteres, poliamidas, polisacáridos, poliproteínas, estireno-isobutileno-estireno (SIBS), un copolímero de polianhídrido, policaprolactona, polietilenglicol (PEG), ácido poli(bis(P-carboxifenoxi)propano-sebácico, ácido poli(d,l-láctico) (PLA), poli(ácido d,l-láctico-ácido co-glicólico) (PLAGA), y/o poli(ácido D, L láctico-co-glicólico (PLGA). En algunas facetas, las partículas de taxano están en forma cristalina. En otras facetas, las partículas de taxano están en forma amorfa, o una combinación de forma cristalina y amorfa.

En una faceta, las partículas de taxano para administración comprenden una forma de dosificación de taxano en suspensión (es decir: con un portador farmacéuticamente aceptable y en una formulación de aerosol) de entre aproximadamente 0.1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml de taxano. En diversas facetas adicionales, la forma de dosificación puede estar entre aproximadamente 0.5 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 0.1 mg/ml y aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 0.5 mg/ml y aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml y aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 0.1 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 0.5 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 0.1 mg/ml y aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 0.5 mg/ml y aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 0.1 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 0.5 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 0.1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 0.5 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml.

mg/ml, aproximadamente 0.1 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 0.5 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 0.1 mg/ml y aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 0.5 mg/ml y aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 0.1 mg/ml y aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 0.5 mg/ml y aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 0.1 mg/ml y aproximadamente 0.5 mg/ml, aproximadamente 0.1 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 0.5 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml y aproximadamente 8 mg/ml, o aproximadamente 4 mg/ml y aproximadamente 6 mg/ml de taxano, o al menos aproximadamente 0.1, 0.5, 1, 10, 20, 25, 50, 75 o 100 mg/ml de taxano.

En una faceta, las partículas de taxano están presentes en un portador líquido antes de la aerosolización. Se puede utilizar cualquier portador líquido adecuado, tal como un portador líquido acuoso. Se puede utilizar cualquier portador líquido acuoso adecuado, incluyendo, pero no limitando a, solución salina al 0.9 % (solución salina normal), tal como cloruro de sodio al 0.9 % para inyección USP. En otra faceta, las partículas de taxano están presentes en una suspensión antes de la aerosolización. En algunas facetas, la suspensión incluye un portador acuoso. El portador puede comprender un agente regulador, una sal osmótica y/o un surfactante en agua y otros agentes para ajustar el pH, la isotonicidad y la viscosidad. En una faceta en la que se emplea un portador acuoso, la concentración de surfactante es menor que 1 % en términos p/p o p/v; en otras facetas, menor que 0.5 %, menor que 0.25 % o aproximadamente el 0.1 %. En otras facetas, el portador acuoso puede excluir los surfactantes GELUCIRE® (glicéridos de polietilenglicol compuestos de mono-, di- y triglicéridos y mono- y diésteres de polietilenglicol) y/o CREMOPHOR® (aceite de ricino polietoxilado). En algunas facetas, la suspensión excluye polímeros, proteínas (tales como albúmina), aceite de ricino polietoxilado y/o glicéridos de polietilenglicol compuestos de mono-, di- y triglicéridos y mono- y diésteres de polietilenglicol.

En algunas facetas, la suspensión puede comprender agua y opcionalmente uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en agente regulador, agente de ajuste de tonicidad, conservante, demulcente, modificador de viscosidad, agente osmótico, surfactante, antioxidante, agente alcalinizante, agente acidificante, agente antiespumante y colorante. Por ejemplo, la suspensión puede comprender partículas de taxano, agua, agente regulador y sal. Opcionalmente comprende además un surfactante. En algunas facetas, la suspensión consiste esencialmente o consiste en agua, partículas de paclitaxel suspendidas en el agua y el agente regulador. La suspensión puede contener además una sal osmótica.

La suspensión puede comprender uno o más surfactantes. Los surfactantes adecuados incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, polisorbatos, lauril sulfatos, monoglicéridos acetilados, monoglicéridos diacetilados y poloxámeros. Los polisorbatos son ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán que son una serie de ésteres de ácidos grasos parciales de sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con aproximadamente 20, 5 o 4 moles de óxido de etileno por cada mol de sorbitol y sus anhídridos. Ejemplos de polisorbatos son polisorbato 20, polisorbato 21, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 61, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81, polisorbato 85 y polisorbato 120. Los polisorbatos que contienen aproximadamente 20 moles de óxido de etileno son surfactantes no iónicos hidrofílicos. Los ejemplos de polisorbatos que contienen aproximadamente 20 moles de óxido de etileno incluyen polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 85 y polisorbato 120. Los polisorbatos están disponibles comercialmente en Croda bajo el nombre comercial TWEEN™. La designación numérica del polisorbato corresponde a la designación numérica del TWEEN, por ejemplo, el polisorbato 20 es TWEEN 20, el polisorbato 40 es TWEEN 40, el polisorbato 60 es TWEEN 60, el polisorbato 80 es TWEEN 80, etc. Los grados USP/NF de polisorbato incluyen polisorbato 20 NF, polisorbato 40 NF, polisorbato 60 NF y polisorbato 80 NF. Los polisorbatos también están disponibles en grados PhEur (European Pharmacopoeia), grados BP y grados JP. El término "polisorbato" es una denominación común. El nombre químico del polisorbato 20 es monolaurato de polioxietileno 20 sorbitán. El nombre químico del polisorbato 40 es monopalmitato de polioxietileno 20 sorbitán. El nombre químico del polisorbato 60 es monoestearato de polioxietileno 20 sorbitán. El nombre químico del polisorbato 80 es monooleato de polioxietileno 20 sorbitán. En algunas facetas, la suspensión puede comprender mezclas de polisorbatos. En algunas facetas, la suspensión comprende polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 85 y/o polisorbato 120. En otras facetas, la suspensión comprende polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y/o polisorbato 80. En una faceta, la suspensión comprende polisorbato 80.

La suspensión puede comprender uno o más agentes de ajuste de la tonicidad. Los agentes de ajuste de tonicidad adecuados incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, una o más sales inorgánicas, electrolitos, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, sulfatos de sodio y potasio, bicarbonatos de sodio y potasio y sales de metales alcalinotérreos, tales como sales inorgánicas de metales alcalinotérreos, por ejemplo, sales de calcio y sales de magnesio, manitol, dextrosa, glicerina, propilenglicol y mezclas de los mismos.

La suspensión puede comprender uno o más agentes reguladores. Los agentes reguladores adecuados incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, ácido

cítrico, citrato de sodio, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, tris(hidroximetil)aminometano, bis(2-hidroxietil)iminotris-(hidroximetil)metano e hidrógenocarbonato de sodio y otros conocidos por aquellos con conocimientos ordinarios en la técnica. Los agentes reguladores se usan comúnmente para ajustar el pH a un intervalo deseable para su uso intraperitoneal. Generalmente se desea un pH de alrededor de 5 a 9, 5 a 8, 6 a 7.4, 6.5 a 7.5 o 6.9 a 7.4.

La suspensión puede comprender uno o más demulcentes. Un demulcente es un agente que forma una película calmante sobre una membrana mucosa, tal como las membranas que revisten el peritoneo y los órganos que lo contienen. Un demulcente puede aliviar dolores e inflamaciones menores y a veces se lo denomina agente mucoprotector. Los demulcentes adecuados incluyen derivados de celulosa que varían desde aproximadamente 0.2 a aproximadamente 2.5 %, tales como carboximetilcelulosa sódica, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y metilcelulosa; gelatina a aproximadamente 0.01 %; polioles en aproximadamente 0.05 a aproximadamente 1 %, incluyendo también aproximadamente 0.05 a aproximadamente 1 %, tal como glicerina, polietilenglicol 300, polietilenglicol 400 y propilenglicol; alcohol polivinílico desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 4 %; povidona desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 %; y dextrano 70 desde aproximadamente 0.1 % cuando se usa con otro demulcente polimérico descrito en el presente documento.

La suspensión puede comprender uno o más agentes alcalinizantes para ajustar el pH. Como se usa en el presente documento, el término "agente alcalinizante" pretende significar un compuesto usado para proporcionar un medio alcalino. Tales compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, solución de amoníaco, carbonato de amonio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio e hidróxido de sodio y otros conocidos para aquellos expertos en la técnica.

La suspensión puede comprender uno o más agentes acidificantes para ajustar el pH. Como se usa en el presente documento, el término "agente acidificante" pretende significar un compuesto usado para proporcionar un medio ácido. Tales compuestos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, ácido acético, aminoácido, ácido cítrico, ácido nítrico, ácido fumárico y otros alfa-hidroxiácidos, ácido clorhídrico, ácido ascórbico y ácido nítrico y otros conocidos para aquellos expertos en la técnica.

La suspensión puede comprender uno o más agentes antiespumantes. Como se usa en el presente documento, el término "agente antiespumante" pretende significar un compuesto o compuestos que previenen o reducen la cantidad de espuma que se forma en la superficie de la composición de relleno. Los agentes antiespumantes adecuados incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, dimeticona, SIMETICONA, octoxinol y otros conocidos por aquellos expertos en la técnica.

La suspensión puede comprender uno o más modificadores de viscosidad que aumentan o disminuyen la viscosidad de la suspensión. Los modificadores de viscosidad adecuados incluyen metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, manitol y polivinilpirrolidona.

En algunas facetas, la partícula de taxano está presente en una suspensión que comprende además un polisorbato. En una faceta específica, la partícula de taxano está presente en una suspensión que comprende además un polisorbato, en la que el polisorbato es polisorbato 80. En otras facetas, el polisorbato o polisorbato 80 está presente en la suspensión en una concentración de entre aproximadamente 0.01 % v/v y aproximadamente 1.5 % v/v. Los inventores han descubierto sorprendentemente que las cantidades muy pequeñas de polisorbato 80 mencionadas reducen la tensión superficial en la interfase de las partículas de taxano y el portador acuoso en la suspensión (tal como la solución salina). En algunas facetas, las partículas pueden estar recubiertas con el polisorbato o polisorbato 80, en otras facetas las partículas no están recubiertas con el polisorbato o polisorbato 80. En varias otras facetas, el polisorbato o polisorbato 80 está presente en la suspensión en una concentración de entre aproximadamente 0.01 % v/v y aproximadamente 1 % v/v, aproximadamente 0.01 % v/v y aproximadamente 0.5 % v/v, aproximadamente 0.01 % v/v y aproximadamente 0.4 % v/v, aproximadamente 0.01 % v/v y aproximadamente 0.25 % v/v, aproximadamente 0.05 % v/v y aproximadamente 0.5 % v/v, aproximadamente 0.05 % v/v y aproximadamente 0.25 % v/v, aproximadamente 0.1 % v/v y aproximadamente 0.5 % v/v, aproximadamente 0.1 % v/v y aproximadamente 0.25 % v/v, aproximadamente 0.1 % v/v, aproximadamente 0.16 v/v o aproximadamente 0.25 % v/v. En facetas adicionales, el taxano, tales como el paclitaxel, está presente en la suspensión en una concentración entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 40 mg/ml, o aproximadamente 6 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml. En diversas facetas adicionales, el taxano está presente en la suspensión en una concentración entre aproximadamente 6 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, entre aproximadamente 6 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, o aproximadamente 15 mg/ml. En diversas facetas adicionales, el portador acuoso en la composición puede ser solución salina, tal como aproximadamente cloruro de sodio al 0.9 %.

Ejemplo 1 Partículas de paclitaxel (es decir: partículas de paclitaxel como se divulga en el presente documento, aproximadamente 98 % en peso de paclitaxel con un tamaño de partícula medio (número) de 0.83 micrómetros, un SSA de 27.9 m²/g, y una densidad aparente (no compactada) de 0.0805 g/cm³ usado en los ejemplos 1, 2,

3 y 4) en suspensión - Programa de desarrollo de seguridad y eficacia - Estudio farmacocinético piloto en ratas Sprague Dawley

Número de estudio: FY17-008A

Sumario ejecutivo

- 5 El objetivo de este estudio piloto fue definir los puntos temporales de muestreo para un estudio farmacocinético (PK) completo con la formulación de suspensión de partículas de paclitaxel. Debido al potencial de que la formulación de partículas de paclitaxel resulte en una mayor retención en los pulmones, se evaluaron nueve puntos temporales desde 0.5 a 168 horas para determinar la estrategia de muestreo adecuada para un estudio farmacocinético completo.
- 10 Dieciséis (16) ratas Sprague Dawley fueron expuestas a la formulación de partículas de paclitaxel (dosis diana de 0.37 mg/kg) solo por inhalación nasal en una sola ocasión. Dos animales (n=2) fueron sacrificados en el punto temporal designado de 0.5, 6, 12, 24, 48, 72, 120 y 168 horas después de la exposición. Se recogieron muestras de sangre (plasma) y tejido pulmonar.
- 15 El día de la exposición, la formulación de partículas de paclitaxel (6 mg/mL) se preparó según las instrucciones proporcionadas por el patrocinador.
- 20 El tiempo total de exposición al aerosol fue de 63 minutos para todos los animales. La concentración de aerosol se controló durante los 63 minutos de exposición al aerosol de la formulación de partículas de paclitaxel midiendo la cantidad de formulación acumulada en filtros GF/A de 47 mm ubicados en la zona de respiración en una cámara de exposición solo para la nariz. El tamaño de las partículas de aerosol (tamaño de gota) se midió utilizando un impactador en cascada estilo Mercer desde la zona de respiración del animal en la cámara de exposición.
- 25 Se aerosolizó una formulación de suspensión de partículas de paclitaxel utilizando dos nebulizadores de chorro de aire comprimido Hospitak (concentración promedio de aerosol de paclitaxel: diana 82.65 µg/L). La concentración promedio general de aerosol medida a partir de los filtros GF/A fue de 0.24 mg/L y la concentración promedio de aerosol de paclitaxel fue de 73.5 µg/mL. La distribución del tamaño de partícula medida fue de 2.0 µm MMAD con una GSD de 2.2. La concentración promedio medida de aerosol de paclitaxel de 73.5 µg/L fue ~ 11 % menor que la concentración promedio diana de aerosol de paclitaxel de 82.65 µg/L (dentro de los criterios de precisión/rendimiento de recuperación del ensayo analítico de ± 15 %). Se controlaron el oxígeno y la temperatura durante la exposición a los aerosoles de la formulación de partículas de paclitaxel.
- 30 Los intervalos de oxígeno y temperatura registrados fueron 19.7 %-20.9 % y 20.4 °C-20.8 °C, respectivamente.
- 35 La dosis depositada de paclitaxel en el pulmón se calculó con base en la concentración promedio de aerosol de paclitaxel de 73.5 µg/L, el peso corporal promedio de los roedores de 326 g, una fracción de depósito asumida del 10 % y una duración de exposición de 63 minutos. Se determinó que la dosis promedio depositada por roedores fue de 0.33 mg/kg. La dosis depositada promedio alcanzada fue ~ 11 % menor en comparación con la dosis depositada diana de 0.37 mg/kg, pero estuvo dentro de la variabilidad esperada (± 15 % respecto a la diana) para exposiciones nebulizadas.
- 40 Todos los animales sobrevivieron hasta el punto temporal designado para la necropsia. Durante la necropsia, varios animales presentaban mínimas coloraciones rojas en los pulmones. No se observaron otras observaciones macroscópicas anormales durante la necropsia. A partir de los pesos corporales y pulmonares obtenidos durante la necropsia, el peso corporal terminal promedio entre los animales en todos los puntos temporales (desviación estándar) fue de 346.26 g (24.01); y el peso pulmonar promedio (desviación estándar) fue de 1.60 g (0.13).
- 45 Se analizó sangre sistémica (en forma de plasma de K₂EDTA) mediante ensayo de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS) y se analizó el tejido pulmonar como se describe brevemente en la sección 4.6 (Análisis bioanalítico) para cuantificar la cantidad de paclitaxel en función del tiempo. El análisis del tejido pulmonar mostró exposición pulmonar con cantidades detectables de paclitaxel hasta 168 horas. La sangre sistémica no mostró paclitaxel detectable (menos de 1 ng/mL) después de 24 horas. Con base en estos datos se sugieren los siguientes puntos temporales de muestreo para el estudio PK: 0.5 (±10 minutos), 6 (±10 minutos), 12 (±10 minutos), 24 (±30 minutos), 48 (±30 minutos), 72 (±30 minutos), 120 (±30 minutos), 168 (±30 minutos), 240 (±30 minutos) y 336 (±30 minutos) después de la exposición por inhalación.
- 50
- Objetivos
- 55 El objetivo de este estudio piloto fue definir los puntos temporales de muestreo para un estudio farmacocinético (PK) completo con la formulación de partículas de paclitaxel. Los datos preliminares con la formulación de partículas de paclitaxel dosificada mediante inyección intraperitoneal (IP) indican un tiempo de retención significativo en la cavidad intraperitoneal. Debido al potencial de que la formulación de partículas de paclitaxel

resulte en una mayor retención en los pulmones, se evaluaron puntos temporales de hasta 168 horas para determinar la estrategia de muestreo adecuada para un estudio farmacocinético completo.

Materiales y métodos

Sistema de prueba

Especie/cepa:	Ratas Sprague Dawley
Edad de los animales al inicio del estudio:	8-10 semanas
Intervalo de peso corporal al inicio del estudio:	308-353 gramos
Número en estudio/Sexo:	18 machos (16 animales de estudio y 2 de repuesto)
Fuente:	Laboratorios Charles River (Kingston, NY)
Identificación:	Marcado permanente de la cola del fabricante

5

Formulación y administración de artículos de prueba y control

Se preparó una formulación de suspensión de partículas de paclitaxel (6 mg/mL) según las instrucciones proporcionadas por el patrocinador. Brevemente, se agregaron 5.0 mL de polisorbato 80 al 1 % al vial que contenía partículas de paclitaxel (306 mg). El vial de suspensión de partículas de paclitaxel se agitó vigorosamente y se invirtió para asegurar la humectación de todas las partículas presentes en el vial. Inmediatamente después de agitar, se agregaron 46 mL de cloruro de sodio al 0.9 % al vial y éste se agitó durante al menos 1 minuto para asegurar una mezcla suficiente y una dispersión adecuada de la suspensión. La formulación resultante se dejó reposar durante al menos 5 minutos para reducir el aire o la espuma en el vial antes de colocarlo en el nebulizador para el trabajo de aerosolización. La formulación final se mantuvo a temperatura ambiente y se utilizó dentro de las 3 horas siguientes a su reconstitución.

Diseño experimental

Dieciséis (16) ratas Sprague Dawley fueron expuestas a la formulación de suspensión de partículas de paclitaxel (dosis diana de 0.37 mg/kg) solo por inhalación nasal en una sola ocasión. Se sacrificaron dos animales (n=2) a 0.5 (± 10 minutos), 6 (± 10 minutos), 12 (± 10 minutos), 24 (± 30 minutos), 48 (± 30 minutos), 72 (± 30 minutos), 120 (± 30 minutos) y 168 (± 30 minutos) horas después de la exposición para recolecciones de sangre (plasma) y tejido pulmonar. No se realizó ningún modelo PK específico; más bien, los datos definirán la duración de las cantidades detectables de paclitaxel después de la exposición para el estudio PK.

Cría, cuarentena y asignación de estudio

Se obtuvieron ratas Sprague Dawley macho (de 6 a 8 semanas) de Charles River Laboratories (Kingston, NY) y se pusieron en cuarentena durante 14 días. Al final de la cuarentena, los animales fueron pesados y luego asignados aleatoriamente por peso para su asignación al estudio. Los animales fueron identificados mediante la marcación de la cola y una tarjeta de jaula. El control del agua, la iluminación, la humedad y la temperatura se mantuvieron y controlaron utilizando técnicas estándar. Las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar para roedores ad libitum durante las horas sin exposición.

Pesos corporales y observaciones diarias

Los pesos corporales se recogieron al azar, diariamente durante todo el estudio y en el punto temporal de la eutanasia. Cada animal del estudio fue observado dos veces al día por el personal de Comparative Medicine Animal Resources (CMAR) para detectar cualquier signo clínico de anormalidad, mortandad o muerte.

Exposiciones a aerosoles únicamente por la nariz

Acondicionamiento

Los animales fueron condicionados a tubos de exposición únicamente por la nariz durante hasta 70 minutos utilizando técnicas estándar. Antes de la exposición se realizaron tres sesiones de acondicionamiento durante tres días: la primera sesión duró 30 minutos, la segunda 60 minutos y la tercera 70 minutos. Fueron controlados de cerca durante los períodos de condicionamiento y durante las exposiciones para asegurar que no experimentaran más que una angustia momentánea.

Sistema de exposición

El sistema de exposición por inhalación constaba de dos nebulizadores de chorro de aire comprimido (Hospitak) y una cámara de exposición por inhalación para roedores únicamente por la nariz. Los niveles de oxígeno expuesto (%) se controlaron durante toda la exposición. Se generó un aerosol de formulación de suspensión de partículas de paclitaxel con un conjunto de dos nebulizadores de chorro de aire comprimido (usados durante hasta 40 (±1) minutos, luego reemplazados con un segundo conjunto de dos nebulizadores de chorro de aire comprimido durante el resto de la exposición) con una presión de entrada de 137.895 kPa (20 psi).

El aerosol se dirigió a través de una línea de suministro de aerosol de acero inoxidable de 60.96 cm (24 pulgadas) (con un diámetro de 1.53 cm) hacia una cámara de exposición ubicada únicamente en la nariz.

Control de la concentración

El control de la concentración de aerosoles se realizó mediante la recolección de aerosoles en filtros GF/A de 47 mm previamente pesados. Se tomaron muestras de los filtros de las zonas de respiración de los roedores de la cámara de exposición únicamente por la nariz durante toda la exposición a los roedores. El caudal de muestreo de aerosol a través de los filtros GF/A se mantuvo en 1.0 ± 0.5 L/minuto. Se recogieron un total de seis filtros GF/A, uno cada 10 minutos durante la duración de la exposición, con excepción del último filtro que se recogió después de 13 minutos. Después de la recolección de muestras, se pesaron los filtros para determinar la concentración total de aerosol en el sistema de exposición. Los filtros se extrajeron y analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para cuantificar la cantidad de paclitaxel recogida en cada filtro. La concentración total de aerosoles y las concentraciones de aerosoles de paclitaxel se calcularon para cada filtro dividiendo la cantidad total de aerosoles y aerosoles de paclitaxel recolectados por el flujo de aire total a través del filtro. La concentración promedio de aerosol de paclitaxel se utilizó para calcular la dosis promedio depositada de paclitaxel en los pulmones de los roedores utilizando la ecuación 1 como se muestra a continuación.

Determinación del tamaño de partículas

La distribución del tamaño de partículas de aerosoles se midió desde la zona de respiración de los roedores de la cámara de exposición únicamente por la nariz mediante un impactador en cascada de siete etapas estilo Mercer (Intox Products, Inc., Albuquerque, NM). La distribución del tamaño de partícula se determinó en términos de diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) y desviación estándar geométrica (GSD). La muestra del impactador en cascada se recogió a un caudal de 2.0 ± 0.1 L/min.

Determinación de la dosis

La dosis depositada se calculó utilizando la ecuación 1. En este cálculo se utilizó la concentración promedio de aerosol medida a partir de las exposiciones junto con los pesos corporales promedio del grupo de ratas. De esta manera se calculó la cantidad estimada de paclitaxel que se depositó en los pulmones de la rata utilizando la concentración de aerosol de paclitaxel medida.

$$DD(\mu\text{g/kg}) = \frac{AC(\mu\text{g/L}) \times RMV(\text{L/min.}) \times DF \times T(\text{min.})}{BW(\text{kg})} \quad \text{Ecu. 1}$$

Dónde:

Dosis de depósito = (DD) $\mu\text{g/kg}$

²Volumen minuto respiratorio (RMV) = $0.608 \times BW^{0.852}$

Concentración de exposición al aerosol (AC) = Concentración de aerosol de paclitaxel ($\mu\text{g/L}$)

Fracción de deposición (DF) = fracción de deposición supuesta del 10 %

BW = peso corporal promedio (en el momento de la aleatorización; día 1) de los animales en el estudio (kg)

Eutanasia y necropsia

Los animales fueron sacrificados en sus respectivos puntos temporales mediante una inyección IP de solución de eutanasia. Durante la necropsia, se recogió sangre (para plasma) mediante punción cardíaca en un tubo con K_2EDTA , se pesaron los pulmones, se recolectaron muestras de tejido pulmonar y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido para realizar análisis bioanalíticos. Además, personal calificado para necropsias realizó un examen macroscópico completo. Se examinaron las superficies externas del cuerpo, los orificios y el contenido de las cavidades craneal, torácica y abdominal. Las lesiones se describieron y registraron utilizando un conjunto de términos de glosario para morfología, cantidad, forma, color, consistencia y gravedad.

Análisis bioanalíticos

- Se analizaron sangre sistémica (en forma de plasma de K₂EDTA y tejido pulmonar mediante el ensayo de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS) para cuantificar la cantidad de paclitaxel en función del tiempo. En resumen, el ensayo utiliza un ensayo de cromatografía líquida de ultra rendimiento-espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) para cuantificar el paclitaxel. Las muestras de plasma se extraen mediante un método de precipitación de proteínas y la separación se logra mediante cromatografía de fase inversa. Las muestras de pulmón se homogeneizaron con agua en una proporción de 4:1 (agua:tejido pulmonar). Luego, el homogeneizado se sometió a un método de precipitación de proteínas similar antes del análisis por LCMS. La cuantificación se realizó con una curva de calibración basada en matriz.
- No se realizó ningún modelo farmacocinético sobre estos datos; sin embargo, la concentración a la cual el paclitaxel cae por debajo de los límites de sensibilidad del ensayo (1 ng/mL) se utilizó para definir los puntos temporales de muestreo para el estudio PK.

Resultados

Observaciones clínicas y supervivencia

- Todos los animales sobrevivieron hasta el punto temporal designado para la necropsia y aumentaron de peso. No se observaron observaciones clínicas anormales durante la duración del estudio.

Exposición a partículas de paclitaxel

Concentración de aerosol

- La tabla 1 muestra las concentraciones totales de aerosol y de aerosol de paclitaxel medidas mediante el muestreo de cada filtro GF/A durante las exposiciones. La concentración promedio de aerosol de paclitaxel por exposición a inhalación de 73.5 µg/L fue ~ 11 % menor que la concentración promedio diana de aerosol de paclitaxel de 82.65 µg/L. La concentración promedio de aerosol expuesto estuvo dentro del ± 15 % de la concentración de aerosol diana que se esperaba para las exposiciones por inhalación nebulizada.

Tabla 1. Concentraciones de aerosoles durante la exposición por inhalación de FY17-008A.

ID del filtro	Conc. total de aerosol. (mg/L)	Conc. de aerosol de paclitaxel (µg/L)
FS-1	0.230	68.97
FS-2	0.236	71.82
FS-3	0.240	77.58
FS-4	0.268	87.11

Tabla 1. Concentraciones de aerosoles durante la exposición por inhalación de FY17-008A.

ID del filtro	Conc. total de aerosol. (mg/L)	Conc. de aerosol de paclitaxel (µg/L)
FS-5	0.205	62.11
FS-6	0.237	73.12
Promedio	0.24	73.5
SD	0.02	8.4
% RSD	8.55	11.5

Oxígeno y temperatura

ES 3 015 106 T3

Los intervalos de oxígeno y temperatura registrados fueron 19.7 %-20.9 % y 20.4 °C-20.8 °C, respectivamente.

Tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula se determinó en términos de MMAD (GSD) para aerosoles de formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL utilizando un impactador en cascada y fue de 2.0 (2.2) μm .

Dosis depositada

Con base en una concentración promedio de aerosol de paclitaxel de 73.5 $\mu\text{g/L}$, un peso corporal promedio de los roedores el día 1 (aleatorización) de 326 g, una fracción de deposición asumida del 10 % y una duración de exposición de 63 minutos, se determinó que la dosis promedio depositada por roedores alcanzada fue de 0.33 mg/kg. La dosis depositada promedio alcanzada fue ~ 11 % menor en comparación con la dosis depositada diana de 0.37 mg/kg debido a la variabilidad esperada (± 15 % respecto a la diana) en la concentración promedio de aerosol expuesta.

Necropsia

Todos los animales sobrevivieron hasta el punto temporal designado para la necropsia. Durante la necropsia, varios animales presentaron mínimas coloraciones rojas en los pulmones. No se observaron otras observaciones macroscópicas anormales durante la necropsia. Se determinaron los pesos pulmonares individuales y promedio, los pesos corporales y las proporciones. El peso corporal terminal promedio (desviación estándar) fue de 346.26 g (24.01). El peso promedio del pulmón (desviación estándar) fue de 1.60 g (0.13). El peso de los órganos y los pulmones y la proporción entre el peso de los pulmones y el peso corporal son parámetros comunes que se usan para evaluar las posibles respuestas toxicológicas a los materiales inhalados. En general, los datos coinciden con los datos históricos e indican que no hubo respuesta con ninguno de estos puntos finales.

Bioanalítica

Los resultados se resumen a continuación en la tabla 2 y la Figura 1. La concentración promedio de paclitaxel en plasma fue de 16.705 ng/mL 0.5 horas después de la exposición, luego disminuyó gradualmente a lo largo de las 24 horas y estuvo por debajo del límite inferior de cuantificación (1 ng/mL) para todos los puntos temporales posteriores. La concentración promedio de paclitaxel en el tejido pulmonar fue de 21940 ng/g 0.5 horas después de la exposición y disminuyó gradualmente a 419.6 ng/g en el punto temporal de las 168 horas. Esto indica una retención significativa de partículas de paclitaxel en el pulmón con una exposición sistémica mínima.

Tabla 2. Resultados de tejido pulmonar y plasma

Número de animales	Punto temporal (h)	Concentración plasmática (ng/mL)	Concentración en tejido pulmonar (ng/g)	Concentración plasmática media (ng/mL) por punto temporal	Concentración promedio en tejido pulmonar (ng/g) por punto temporal
1001 1002	0.5	8.81 24.6	16680 27200	16.705	21940
1003 1004	6	4.46 4.93	7800 6520	4.695	7160
1005 1006	12	3.72 <LLOQ	8240 4400	3.720	6320
1007 1008	24	<LLOQ 3.14	3144 5760	3.140	4452
1009 1010	48	<LLOQ <LLOQ	2300 3004	<LLOQ	2652
1011	72	<LLOQ	1760	<LLOQ	2028

ES 3 015 106 T3

1012		<LLOQ	2296		
1013	120	<LLOQ	608	<LLOQ	486.8
1014		<LLOQ	366		
1015	168	<LLOQ	572	<LLOQ	419.6
1016		<LLOQ	267		

Conclusiones

Dieciséis (16) ratas Sprague Dawley macho fueron expuestas a aerosoles de formulación de partículas de paclitaxel (dosis diana de 0.37 mg/kg) únicamente por inhalación nasal en una sola ocasión. Se sacrificaron dos animales (n=2) a las 0.5, 6, 12, 24, 48, 72, 120 y 168 horas posteriores a la exposición para obtener muestras de sangre (plasma) y tejido pulmonar.

La concentración promedio de aerosol de paclitaxel de 73.5 µg/L durante la exposición por inhalación de 63 minutos fue ~ 11 % menor que la concentración promedio de aerosol de paclitaxel diana de 82.65 µg/L. La concentración promedio de aerosol expuesto estuvo dentro del ± 15 % de la concentración de aerosol diana que se esperaba para las exposiciones por inhalación nebulizada. La distribución del tamaño de partícula se determinó en términos de MMAD (GSD) para aerosoles de formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL utilizando un impactador en cascada como 2.0 (2.2) µm. Los intervalos de oxígeno y temperatura registrados fueron 19.7 %-20.9 % y 20.4 °C-20.8 °C, respectivamente.

La dosis depositada de paclitaxel se calculó en base a una concentración promedio de aerosol de paclitaxel de 73.5 µg/L, un peso corporal promedio de roedores de 326 g, una fracción de deposición asumida del 10 % y una duración de exposición de 63 minutos. Se determinó que la dosis promedio depositada por roedores fue de 0.33 mg/kg. La dosis depositada promedio alcanzada fue ~ 11 % menor en comparación con la dosis depositada diana de 0.37 mg/kg debido a la variabilidad esperada (± 15 % respecto a la diana).

Todos los animales sobrevivieron hasta el punto temporal planificado de la necropsia. Durante la necropsia, varios animales presentaban mínimas coloraciones rojas en los pulmones. No se observaron otras observaciones macroscópicas anormales durante la necropsia. De los pesos corporales y pulmonares obtenidos durante la necropsia, el peso corporal terminal promedio (desviación estándar) fue de 346.26 g (24.01); y el peso pulmonar promedio (desviación estándar) fue de 1.60 g (0.13). El peso de los órganos pulmonares y la proporción entre el peso de los pulmones y el peso corporal son parámetros comunes que se usan para evaluar las posibles respuestas toxicológicas a los materiales inhalados. En general, los datos indican que no hubo respuesta con ninguno de estos puntos finales.

La concentración promedio de paclitaxel en plasma fue de 16.705 ng/mL 0.5 horas después de la exposición, luego disminuyó gradualmente a lo largo de las 24 horas y estuvo por debajo del límite inferior de cuantificación en todos los puntos temporales después de 24 horas. La concentración promedio de paclitaxel en el tejido pulmonar fue de 21940 ng/g 0.5 horas después de la exposición y disminuyó gradualmente a 419.6 ng/g a las 168 horas. Esto indica una retención significativa de partículas de paclitaxel en el pulmón con una exposición sistémica mínima. Se sugieren los siguientes puntos temporales de muestreo para el estudio farmacocinético: 0.5 (±10 minutos), 6 (±10 minutos), 12 (±10 minutos), 24 (±30 minutos), 48 (±30 minutos), 72 (±30 minutos), 120 (±30 minutos), 168 (±30 minutos), 240 (±30 minutos) y 336 (±30 minutos) horas después de la exposición.

Ejemplo 2: Estudio FY17-008B - Estudio de exposición por inhalación de partículas de aerosol de paclitaxel Sumario ejecutivo

El objetivo general de este trabajo fue realizar una exposición por inhalación únicamente por la nariz a ratas macho con formulaciones de suspensión de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL y 20.0 mg/mL. Las exposiciones por inhalación en ratas se llevaron a cabo durante 65 minutos cada una.

Se prepararon formulaciones de suspensión de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL y 20.0 mg/mL según las instrucciones proporcionadas por el patrocinador. Se utilizaron simultáneamente dos nebulizadores de chorro de aire comprimido Hospitak a 137.895 kPa (20 psi) para la aerosolización de la formulación de partículas de paclitaxel en la cámara de exposición por inhalación en roedores. Durante cada exposición, se midió la concentración de aerosol en la zona de respiración del animal mediante muestreo en filtros GF/A de 47 mm a un caudal de 1.0 ± 0.5 L/minuto. El tamaño de partícula se determinó tomando muestras de aerosoles de la zona de respiración de los animales utilizando un impactador en cascada estilo Mercer a un caudal de 2.0 ± 0.1 L/minuto. Los filtros se analizaron gravimétricamente para determinar la concentración total de partículas de paclitaxel en aerosol y mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para determinar la

concentración de aerosol de paclitaxel para cada exposición. Se controlaron y registraron el oxígeno y la temperatura durante las exposiciones a la inhalación.

Se determinó que la concentración promedio total de partículas de paclitaxel en aerosol y la concentración de paclitaxel en aerosol fueron 0.25 mg/L con una RSD del 7.43 % y 85.64 µg/L con una RSD del 10.23 %, respectivamente, para exposiciones por inhalación realizadas con una formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL. El diámetro aerodinámico medio de masa promedio medido (desviación estándar geométrica) utilizando un impactador en cascada fue de 1.8 (2.0) µm para aerosoles de formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL. Se determinó que la concentración promedio total de partículas de paclitaxel en aerosol y la concentración de paclitaxel en aerosol fueron 0.46 mg/L con una RSD del 10.95 % y 262.27 µg/L con una RSD del 11.99 %, respectivamente, para exposiciones por inhalación realizadas con una formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/mL. El diámetro aerodinámico medio de masa promedio medido (desviación estándar geométrica) utilizando un impactador en cascada fue de 2.3 (1.9) µm para aerosoles de formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/mL.

La dosis promedio depositada de paclitaxel de 0.38 mg/kg y 1.18 mg/kg se calculó utilizando la ecuación 1 para una exposición de 65 minutos para una formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL y 20.0 mg/mL, respectivamente.

Formulación y exposición por inhalación

Preparación de la formulación

Materiales

Artículo de prueba

El artículo de prueba usado para la exposición por inhalación se muestra a continuación.

Partículas de paclitaxel

Identidad:	Partículas de paclitaxel (estériles)
Descripción:	Nueva formulación de paclitaxel en polvo seco, administrada en dosis de 306 mg/vial
Proveedor:	US Biotest
Fabricante:	CritiTech
Condiciones de almacenamiento:	de Ambiente
Vehículo	

Los vehículos usados para la preparación de formulaciones de partículas de paclitaxel se muestran a continuación.

Polisorbato 80

Identidad:	Polisorbato 80 estéril al 1 % en cloruro de sodio al 0.9 % para inyección
Descripción:	Líquido transparente
Proveedor:	US Biotest
Fabricante:	CritiTech
Condiciones de almacenamiento:	Ambiente
Solución salina normal	

Identidad:	Cloruro de sodio al 0.9 % estéril para inyección, USP
Descripción:	Líquido transparente
Fabricante:	Hospira, Inc., IL
Condiciones de almacenamiento:	Ambiente

Formulación y exposición por inhalación

Preparación de la formulación

- 5 La formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL se preparó de la siguiente manera: Brevemente, se agregaron 5.0 mL de polisorbato 80 al 1 % al vial que contenía partículas de paclitaxel (306 mg). El vial se agitó vigorosamente y se invirtió para asegurar la humectación de todas las partículas presentes en el vial. Inmediatamente después de agitar, se agregaron 46 mL de solución de cloruro de sodio al 0.9 % al vial y se agitó el vial durante al menos 1 minuto para asegurar una mezcla suficiente y una dispersión adecuada de la suspensión.
- 10 Se utilizó el procedimiento de formulación de partículas de paclitaxel descrito anteriormente para la formulación de 6.0 mg/mL para preparar la formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/mL con la excepción de que se agregaron 10.3 mL de solución de cloruro de sodio al 0.9 % al vial en lugar de los 46 mL usados para la formulación de 6.0 mg/mL.
- 15 Las formulaciones resultantes se dejaron reposar durante al menos 5 minutos para reducir el aire o la espuma en el vial antes de colocarlo en el nebulizador para el trabajo de aerosolización. La formulación final de 6.0 mg/mL se mantuvo a temperatura ambiente y se nebulizó dentro de las 2 horas siguientes a la reconstitución. La formulación final de 20.0 mg/mL se mantuvo a temperatura ambiente y se nebulizó dentro de los 30 minutos posteriores a la reconstitución.

Diseño experimental

- 20 Treinta (30) ratas Sprague Dawley fueron expuestas a una única dosis de "referencia clínica" de ABRAXANE® intravenoso (paclitaxel: dosis diana 5.0 mg/kg), treinta (30) ratas Sprague Dawley fueron expuestas a las formulaciones de partículas de paclitaxel divulgadas en el presente documento (dosis diana de 0.37 mg/kg) y treinta (30) ratas Sprague Dawley fueron expuestas a las formulaciones de partículas de paclitaxel (dosis diana de 1.0 mg/kg) únicamente por inhalación nasal en una sola ocasión. Se sacrificaron tres animales (n=3) a 0.5
- 25 (± 10 minutos), 6 (± 10 minutos), 12 (± 10 minutos), 24 (± 30 minutos), 48 (± 30 minutos), 72 (± 30 minutos), 120 (± 30 minutos), 168 (± 30 minutos), 240 (± 30 minutos) y 336 (± 30 minutos) horas después de la exposición a las recolecciones de sangre (plasma) y tejido pulmonar. Se realizaron análisis no compartimentales en plasma y tejido pulmonar para identificar la duración de cantidades detectables de paclitaxel después de la exposición para cada grupo de dosis.

- 30 Configuración del sistema de exposición/generación de aerosol: Como en el ejemplo 1

Control de concentración de aerosoles: Como en el ejemplo 1

Distribución del tamaño de partículas: Como en el ejemplo 1

Cálculo de dosis depositada: Como en el ejemplo 1

Resultados

- 35 Resultados de la exposición

Concentración de aerosoles y tamaño de partículas

- 40 La concentración de aerosol se controló durante la exposición a cada aerosol de formulación de partículas de paclitaxel utilizando filtros GF/A de 47 mm desde la zona de respiración de los animales en una cámara de exposición únicamente por la nariz. Se muestrearon siete filtros GF/A de 47 mm durante cada exposición. Los filtros FS-1 a FS-6 se muestrearon durante 10 minutos cada uno y el filtro FS-7 se muestreó durante 5 minutos durante cada grupo de dosis baja y alta. El tamaño de las partículas se midió utilizando un impactador en cascada estilo Mercer desde la zona de respiración del animal en la cámara de exposición. Las tablas 3 y 4 muestran las concentraciones totales y de aerosol de paclitaxel medidas mediante muestreo de filtros GF/A durante exposiciones a dosis bajas y dosis altas, respectivamente.

ES 3 015 106 T3

Tabla 3. Concentraciones de aerosoles durante la exposición por inhalación de dosis bajas de FY17-008B.

ID del filtro	Conc. total de aerosol. (mg/L)	Conc. de aerosol de paclitaxel (µg/L)
FS-1-L	0.247	80.05
FS-2-L	0.242	81.79
FS-3-L	0.252	87.09
FS-4-L	0.296	104.38
FS-5-L	0.247	78.47

Tabla 3. Concentraciones de aerosoles durante la exposición por inhalación de dosis bajas de FY17-008B.

ID del filtro	Conc. total de aerosol. (mg/L)	Conc. de aerosol de paclitaxel (µg/L)
FS-6-L	0.249	82.50
FS-7-L	0.244	85.19
Promedio	0.25	85.64
SD	0.02	8.76
% RSD	7.43	10.23

5 Tabla 4. Concentraciones de aerosoles durante la exposición por inhalación de dosis altas de FY17-008B.

ID del filtro	Conc. total de aerosol. (mg/L)	Conc. de aerosol de paclitaxel (µg/L)
FS-1-H	0.383	212.53
FS-2-H	0.412	239.28
FS-3-H	0.494	291.44
FS-4-H	0.516	296.56
FS-5-H	0.456	254.67
FS-6-H	0.501	289.50
FS-7-H	0.431	251.88
Promedio	0.46	262.27
SD	0.05	31.45
% RSD	10.95	11.99

La distribución del tamaño de partícula (tamaño de gota de aerosol) se determinó en términos de MMAD (mediana de la distribución de la masa de partículas en el aire con respecto al diámetro aerodinámico) (GSD;

acompaña la medición de MMAD para caracterizar la variabilidad de la distribución del tamaño de partícula) para cada aerosol de formulación de partículas de paclitaxel utilizando un impactador en cascada. Para aerosoles de formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL y 20.0 mg/mL, se determinó que el MMAD (GSD) era 1.8 (2.0) μm y 2.3 (1.9) μm , respectivamente. Las figuras 2 y 3 muestran la distribución del tamaño de partículas para aerosoles de formulaciones de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL y 20.0 mg/mL, respectivamente.

Dosis depositada

La dosis depositada de paclitaxel se calculó en base a la concentración promedio de aerosol de paclitaxel, el peso corporal promedio de la rata, la fracción de deposición asumida del 10 % y la duración de exposición de 65 minutos para cada exposición a la formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja y dosis alta utilizando la ecuación 1. La tabla 5 muestra la concentración promedio de aerosol de paclitaxel, el peso corporal promedio de la rata, el tiempo de exposición y la dosis depositada para cada exposición. Se determinó que la dosis promedio depositada por roedores fue de 0.38 mg/kg y 1.18 mg/kg para exposiciones a formulaciones de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL y 20.0 mg/mL, respectivamente.

Tabla 5. Dosis depositada de paclitaxel para exposiciones por inhalación de formulaciones de partículas de paclitaxel en dosis bajas y altas.

Nivel de dosis	Conc. de formulación de partículas de paclitaxel (mg/ml)	Conc. promedio de aerosol de paclitaxel ($\mu\text{g/L}$)	Peso promedio de la rata (g)	Tiempo de exposición (min.)	Dosis depositada (mg/kg)
Bajo	6.0	85.64	420.4	65	0.38
Alto	20.0	262.27	420.5	65	1.18

Oxígeno y temperatura

Se controlaron el oxígeno y la temperatura durante las exposiciones a aerosoles de la formulación de partículas de paclitaxel. Los intervalos de oxígeno y temperatura registrados fueron 19.8 % - 20.9 % y 20.7 °C - 20.8 °C, respectivamente, para la exposición a la formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL. Para la exposición a la formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/mL, el valor de oxígeno registrado fue del 19.8 % durante toda la exposición y el intervalo de temperatura fue de 20.7 °C a 20.8 °C.

Los datos preliminares se muestran en las figuras 4-6.

Ejemplo 3 Evaluación de la eficacia de formulaciones de partículas de paclitaxel inhaladas en el modelo de cáncer de pulmón ortotópico en ratas desnudas -Estudio FY17-095

Sumario ejecutivo

Ciento veintisiete (127) ratas desnudas NIH-rnu fueron irradiadas con rayos X para inducir inmunosupresión el día -1. El día 0, a los animales se les administraron células tumorales Calu3 mediante instilación intratraqueal (IT). Los animales pasaron por un período de crecimiento de tres semanas. Durante la tercera semana, los animales fueron asignados aleatoriamente por estratificación de peso corporal en 5 grupos de estudio. A partir de la semana 4, los animales del grupo 2 recibieron una dosis semanal de ABRAXANE® mediante dosificación intravenosa (IV) (5 mg/kg) los días 22, 29 y 36. Los animales de los grupos 3 y 4 recibieron una dosis de inhalación (INH) de partículas de paclitaxel una vez por semana (Lunes) en dosis diana bajas (0.5 mg/kg) y altas (1.0 mg/kg), respectivamente. Los animales de los grupos 5 y 6 recibieron una dosis de inhalación diana dos veces por semana (Lunes y jueves) de formulaciones de partículas de paclitaxel en dosis bajas (0.50 mg/kg) y altas (hasta 1.0 mg/kg) respectivamente. Los animales del grupo 1 se dejaron sin tratamiento como control del crecimiento normal de las células tumorales. A todos los animales se les practicó la necropsia durante la semana 8.

Todos los animales sobrevivieron hasta el punto temporal designado para la necropsia. Las observaciones clínicas relacionadas con el modelo incluyeron erupción cutánea y dificultad para respirar. Todos los grupos aumentaron de peso aproximadamente al mismo ritmo a lo largo del estudio.

La concentración promedio de aerosol de paclitaxel expuesto a la inhalación para los grupos de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja una vez por semana y de dosis baja dos veces por semana fue de 270.51 $\mu\text{g/L}$ y 263.56 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. La concentración promedio de aerosol de paclitaxel expuesto a la inhalación para los grupos de formulación de partículas de paclitaxel en dosis alta una vez por semana y en dosis alta dos veces por semana fue de 244.82 $\mu\text{g/L}$ y 245.76 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Las dosis se basaron en la concentración promedio de paclitaxel en aerosol, el peso corporal promedio más reciente del grupo, la fracción de deposición asumida del 10 % y una duración de exposición de 33 (dosis baja) o 65 (dosis alta) minutos. Durante cuatro semanas de tratamiento, la dosis depositada promedio alcanzada por roedores para el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja una vez por semana y el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja dos veces por semana fue de 0.655 mg/kg y 0.640 mg/kg (1.28 mg/kg/semana), respectivamente. La dosis depositada promedio alcanzada por roedores para el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis alta una vez por semana y el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis alta dos veces por semana fue de 1.166 mg/kg y 1.176 mg/kg (2.352 mg/kg/semana), respectivamente. Para el grupo que recibió inyecciones IV de ABRAXANE®, la dosis promedio en los días 22, 29 y 36 fue de 4.94, 4.64 y 4.46 mg/kg respectivamente.

En la necropsia programada, la mayoría de los animales de cada grupo tenían nódulos de color marrón claro en los pulmones y/o decoloraciones irregulares de color rojo o marrón claro en los pulmones. Otras observaciones esporádicas incluyeron una hernia abdominal en un animal y un nódulo en el pericardio en otro animal. No se observaron otras observaciones macroscópicas anormales durante la necropsia.

En los animales tratados con ABRAXANE® los pesos pulmonares, las proporciones entre pulmón BW y las proporciones en peso de pulmón y cerebro fueron significativamente inferiores en comparación con los controles no tratados. El grupo de dosis alta de formulación de partículas de paclitaxel una vez por semana tuvo pesos similares a los del grupo ABRAXANE® y pesos pulmonares significativamente inferiores y proporciones pulmón y cerebro inferiores en comparación con los controles no tratados.

Histológicamente, los pulmones de la mayoría de los animales de todos los grupos contenían alguna evidencia de formación de tumores. La formación de tumores se caracterizó por la presencia de pequeñas masas expansivas de tamaño variable dispersas aleatoriamente dentro del parénquima pulmonar y masas más grandes expandidas y coalescentes que borran hasta el 75 % del parénquima pulmonar, las vías respiratorias más pequeñas y los vasos sanguíneos. Las masas más grandes se distribuyeron principalmente en las regiones hiliares o yuxtapuestas a la vía aérea axial y las masas más pequeñas generalmente se ubicaron periféricamente.

Las características celulares morfológicas primarias de las masas tumorales pulmonares variaron desde la presencia de un patrón indiferenciado hasta un patrón bastante bien diferenciado de adenocarcinoma de pulmón. El tipo de célula tumoral predominante mostró una morfología de adenocarcinoma indiferenciado; las células eran pleomórficas, grandes, anaplásicas, con tinción anfófila pálida y con vacuolas intracitoplasmáticas finas que se asemejaban a vesículas mucoides, presentaban anisocariosis moderada a marcada y se observó que estaban individualizadas o crecían en láminas y carecían de características claras hacia la diferenciación al adenocarcinoma. Sin embargo, las características morfológicas celulares que se observaron dentro de otras masas o que crecían dentro de las masas indiferenciadas descritas anteriormente estaban más organizadas y eran consistentes con un adenocarcinoma de pulmón bien diferenciado que demostraba una clara diferenciación de las glándulas acinares. Estas células tumorales con tinción anfófila estaban dispuestas principalmente en nidos o patrones glandulares que se observó que estaban unidos por tabiques alveolares. En esta población de células tumorales rara vez se observaron figuras mitóticas. Con menor frecuencia se observaron dentro de estas masas áreas focales de células tumorales primitivas relativamente pequeñas de aspecto primitivo con cantidades pequeñas a moderadas de citoplasma de tinción basófila pálida, núcleos ovoides y variablemente vesiculares y anisocariosis moderada. Se observó que estas células tumorales primitivas crecían aleatoriamente y en láminas. En esta población de células tumorales primitivas basófilas se observó con mayor frecuencia un mayor número de figuras mitóticas y cuerpos apoptóticos. Se observó comúnmente inflamación, caracterizada por infiltración mixta de células inflamatorias (predominantemente eosinófilos, linfocitos, macrófagos espumosos y ocasionalmente células gigantes) acompañada de fibrosis intersticial. La necrosis parenquimatosa significativa fue poco común o inexistente.

El patólogo consideró como evidencia de regresión tumoral la presencia de festoneado en los bordes de las masas tumorales individuales, caracterizado por pérdida gradual de células tumorales, hasta pérdida completa de células tumorales con fibrosis residual del tejido conectivo del parénquima pulmonar y acompañado por invasión de macrófagos espumosos.

En comparación con el control positivo Grp. 1 y el ABRAXANE® tratado comparativo Grp. 2, hubo una disminución en la carga tumoral pulmonar general en los grupos tratados con la formulación de partículas de paclitaxel (Grp. 3-6) caracterizado por una disminución en la severidad de las masas tumorales de adenocarcinoma y de la población de células tumorales primitivas, así como evidencia de regresión tumoral. No se observaron otras lesiones o hallazgos relacionados con el tratamiento. Se observó una extensa infiltración de células mononucleares en los pulmones de los animales que recibieron la formulación de partículas de paclitaxel por inhalación. Como el modelo usado es deficiente en células T, es probable que las células sean células B o células NK. Se plantea la hipótesis de que la exposición localizada, probablemente a una concentración más alta, del tumor a las partículas de paclitaxel afectó a los tumores, lo que provocó una alteración en el entorno para atraer el infiltrado de células mononucleares al pulmón.

Objetivos

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de la formulación de partículas de paclitaxel inhaladas en comparación con una dosis de referencia clínica de ABRAXANE® administrada por vía intravenosa en la reducción de la carga tumoral en un modelo ortotópico de cáncer de pulmón.

5 Materiales y métodos

Sistema de prueba

Especie/cepa:	Ratas desnudas NIH-rnu
Edad de los animales al inicio del estudio:	3-5 semanas
Intervalo de peso corporal al inicio del estudio:	Aproximadamente 150-200 g
Número de estudio/Sexo:	127 machos (120 animales de estudio y 7 de repuesto)
Fuente:	Envigo
Identificación:	Marcado permanente de la cola del fabricante

Formulación ABRAXANE®

El material de referencia clínica usado para la formulación IV fue el medicamento ABRAXANE®. El medicamento se reconstituyó a 5.0 mg/mL con solución salina el día de la dosificación y se almacenó según las instrucciones del fabricante.

Formulación de partículas de paclitaxel

Las formulaciones de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/ml para exposiciones se prepararon según las recomendaciones del patrocinador. En concreto, las partículas de paclitaxel se reconstituyeron con polisorbato 80 al 1 %. El vial se agitó a mano hasta que todas las partículas se humedecieron. Se agregó cloruro de sodio adicional al 0.9 % para inyección (hasta la concentración deseada) y se agitó el vial con la mano durante otro minuto. Se continuó agitando hasta que no se vieron grumos grandes y la suspensión se dispersó adecuadamente.

Las formulaciones resultantes se dejaron reposar durante al menos 5 minutos para reducir el aire/espuma en el vial antes de colocarlo en un nebulizador para el trabajo de aerosolización. La formulación final se mantuvo a temperatura ambiente y se nebulizó dentro de las 2 horas posteriores a la reconstitución. Los 20.0 mg/mL finales se mantuvieron a temperatura ambiente y se nebulizaron dentro de los 30 (+5) minutos posteriores a la reconstitución.

Diseño experimental

Se utilizaron ciento veintisiete (127) animales para el estudio. Antes de la irradiación con rayos X y la dosificación de las células tumorales, 7 animales fueron designados como repuestos (los animales de repuesto no recibieron irradiaciones ni instilaciones de líneas celulares). El día -1 todos los animales del estudio fueron irradiados con rayos X para inducir la inmunosupresión. El día 0, a los animales se les administraron células tumorales Calu3 mediante instilación intratraqueal (IT). Los animales pasaron por un período de crecimiento de tres semanas. Durante la tercera semana, los animales fueron asignados aleatoriamente según estratificación de peso corporal a los grupos que se describen en la tabla 6 a continuación. A partir de la semana 4, los animales del grupo 2 recibieron una dosis diana semanal de ABRAXANE® mediante dosificación intravenosa (IV) (5 mg/kg). Los animales de los grupos 3 y 4 recibieron una dosis diana de inhalación (INH) de partículas de paclitaxel una vez por semana (Lunes) en dosis bajas (0.5 mg/kg) y altas (1.0 mg/kg), respectivamente. Los animales de los grupos 5 y 6 recibieron una dosis diana de inhalación de formulaciones de partículas de paclitaxel dos veces por semana (Lunes y Jueves) en dosis baja (0.50 mg/kg) y alta (1.0 mg/kg) respectivamente. Los animales del grupo 1 se dejaron sin tratamiento como control del crecimiento normal de las células tumorales. A todos los animales se les practicó la necropsia durante la semana 8.

Tabla 6. Diseño experimental

ES 3 015 106 T3

Descripción del grupo	N =	Irradiación	Línea celular	Ruta	Dosis objetivo y frecuencia *	Formulación del tratamiento	Duración de la exposición	Necropsia *
1 Control	20	Día -1	Calu 3, II institución Día 0	N/A	N/A	N/A	N/A	Semana 8
2 ABRAXANE® IV	20			IV	hasta 5 mg/kg**	ABRAXANE® (5 mg/ml)	N/A	
3 Formulación de partículas de paclitaxel Baja Una vez por semana (1x)	20			INH	0.5 mg/kg, una vez por semana	Formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/mL	33 min	
4 Formulación de partículas de paclitaxel Alta Una vez por semana (1x)	20			INH	1.0 mg/kg, una vez por semana	Formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/mL	65 min	
5 Formulación de partículas de paclitaxel, Baja- Dos veces por semana (2x)	20			INH	0.5 mg/kg, dos veces por semana	Formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/ml	33 min	
6 Formulación de partículas de paclitaxel Alta Dos veces por semana (2x)	20			INH	1.0 mg/kg, dos veces por semana	Formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/ml	65 min	

*El tratamiento se realizó durante la semana 4-8. La necropsia se realizó durante la semana 8.

** Dosis diana de ABRAXANE®: 5.0 mg/kg en base al peso corporal; volumen de dosis diana: no debe superar los 250 µL, frecuencia: Día 1, 8 y 15 de cada ciclo de 21 días que comienza durante la semana 4.

Cría, cuarentena y asignación de estudios

Después de la cuarentena, todos los animales fueron pesados y asignados aleatoriamente para eliminar los 7 repuestos en función de sus pesos corporales. Desde la semana 1 hasta la semana 3, los animales fueron identificados mediante tarjetas de jaula (números LC) y marcas en la cola.

Durante la semana 3, antes de comenzar el tratamiento, los animales fueron pesados y asignados aleatoriamente a los grupos enumerados anteriormente según la estratificación del peso corporal y se les asignó un ID de estudio. A partir de ese momento, los animales fueron identificados mediante tarjetas de jaula y marcación con marcador permanente en la cola.

10 Inmunosupresión e irradiación

El día -1, los animales fueron sometidos a exposición de cuerpo entero a rayos X con ~500 rad (Unidad de terapia de rayos X Phillips RT 250, Phillips Medical Systems, Shelton, CT) ajustados a 250 kVp, 15 mA y una distancia de fuente a objeto de 100 cm. Los animales fueron colocados en una unidad de cámara de pastel, 2-3 animales por porción de pastel. El procedimiento de irradiación tardó entre 10 y 15 minutos.

Implantación de células tumorales

El día 0, los animales recibieron células tumorales (Calu3) administradas por vía IT. Brevemente, después de ser anestesiado con isoflurano al 3-5 % en una cámara de inducción, el animal fue colocado con los incisivos superiores enganchados en una plataforma de instilación colgante inclinada. Se aseguró suavemente la lengua del animal mientras se insertaba el estilete justo más allá de la laringe y dentro de la tráquea. Un volumen de células en suspensión de EDTA (volumen de dosis diana: 500 µL; concentración: aproximadamente 20×10^6 por 0.5 mL) se administró a los pulmones mediante instilación intratraqueal. Después de la instilación, se monitoreó cuidadosamente la respiración y el movimiento de los animales. Después de la implantación de células tumorales, los animales se sometieron a un período de crecimiento tumoral de aproximadamente 3 semanas antes del tratamiento para permitir el injerto de células tumorales y el desarrollo del cáncer de pulmón.

Crecimiento y preparación de Calu3

Las células Calu3 se cultivaron a 37 °C con 5 % de CO₂ en matraces de cultivo celular. Se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 con 10 % de suero bovino fetal (FBS) hasta una confluencia del 80 %. Las células se mantuvieron hasta el día de la instilación. Antes de la instilación se recolectaron lavándolos con PBS, luego se agregó tripsina para eliminar las células del matraz. Las células se neutralizaron con medio RPMI 1640 que contenía 10 % FBS. Luego se centrifugaron a 100xg durante 5 minutos; se retiró el medio y las células se volvieron a suspender a una concentración de 20 millones de células en 450 µL de RPMI libre de suero. Antes de la instilación, se agregaron 50 µL de 70 µM de EDTA a la suspensión celular para un volumen de dosis IT total de 500 µL por rata.

Pesos corporales y observaciones diarias

Los pesos corporales se recopilaron para la aleatorización, semanalmente hasta la semana 3, dos veces por semana a partir de la semana 4 hasta el final del estudio y en la necropsia.

Cada animal del estudio fue observado dos veces al día para detectar cualquier signo clínico de anormalidad, morbilidad o muerte. Los técnicos observaron a los animales durante las sesiones de dosificación y de control de peso corporal.

Administración IV de ABRAXANE® - Inyecciones en la vena de la cola

ABRAXANE® (5 mg/mL, volumen de dosis máxima de 250 µL) se administró a los animales del Grupo 2 mediante inyección IV en la vena de la cola los días 22, 29 y 36.

Administración de la formulación de partículas de paclitaxel - Acondicionamiento de exposición a aerosoles únicamente por la nariz

Los animales fueron condicionados a tubos de exposición únicamente por la nariz durante hasta 70 minutos. Antes de la exposición se realizaron tres sesiones de acondicionamiento durante tres días: la primera sesión duró 30 minutos, la segunda 60 minutos y la tercera 70 minutos. Fueron controlados de cerca durante los períodos de condicionamiento y durante las exposiciones para asegurar que no experimentaran más que una angustia momentánea.

Sistema de exposición

Los aerosoles se generaron con dos nebulizadores Hospitak de chorro de aire comprimido como se muestra en la figura 7 a una presión de nebulizador de 137.895 kPa (20 psi). Se utilizó una formulación de suspensión de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/mL para exposiciones a dosis bajas y dosis altas. Los aerosoles se dirigieron a través de una línea de suministro a una cámara de exposición únicamente con la nariz y 32 puertos. Las exposiciones a la inhalación de roedores se llevaron a cabo durante 33 o 65 minutos. Se generó un aerosol de suspensión de partículas de paclitaxel con un conjunto de dos nebulizadores de chorro de aire comprimido Hospitak (usados durante hasta 40 (± 1) minutos), luego se reemplazó con un segundo conjunto de dos nebulizadores Hospitak durante la duración de exposición restante. Se controlaron y registraron el oxígeno y la temperatura durante cada exposición a la inhalación.

Control de la concentración

El control de la concentración de aerosoles se realizó mediante la recolección de aerosoles en filtros GF/A de 47 mm previamente pesados. Los filtros se muestrearon de las zonas de respiración de los animales de la cámara de exposición únicamente por la nariz durante cada exposición a la inhalación. El caudal de muestreo de aerosol a través de los filtros GF/A se mantuvo en 1.0 ± 0.5 L/minuto. Los filtros se recogieron a lo largo de cada duración de exposición cada 10 minutos, excepto el último filtro. Con exposiciones de dosis bajas (grupos 3 y 5) que duraron 33 minutos, el filtro final se recogió después de 13 minutos y con exposiciones de dosis altas (grupos 4 y 6) que duraron 65 minutos, el filtro final se recogió después de 15 minutos. Después de la

recolección de muestras, se pesaron los filtros para determinar la concentración total de aerosol en el sistema de exposición.

Después del pesaje, cada filtro se colocó en un vial de vidrio de 7 mL. Los filtros en viales de vidrio se extrajeron y analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para cuantificar la cantidad de paclitaxel recolectada en los filtros. La concentración total de aerosoles y las concentraciones de aerosoles de paclitaxel se calcularon para cada filtro dividiendo la cantidad total de aerosoles y aerosoles de paclitaxel recolectados por el flujo de aire total a través del filtro. La concentración promedio de aerosol de paclitaxel se utilizó para calcular la dosis promedio depositada de paclitaxel en los pulmones de los roedores utilizando la ecuación 1, como se muestra en la sección determinación de la dosis a continuación.

10 Determinación de la dosis

La dosis depositada se calculó utilizando la ecuación 1. En este cálculo se utilizó la concentración promedio de aerosol medida a partir de las exposiciones junto con los pesos corporales promedio del grupo de ratas. De esta manera se calculó la cantidad estimada de paclitaxel depositada en los pulmones de la rata utilizando la concentración de aerosol de paclitaxel medida.

$$DD(\mu\text{g/kg}) = \frac{AC(\mu\text{g/L}) \times RMV(\text{L/min}) \times DF \times T(\text{min.})}{BW(\text{kg})}$$

Ecuación 1

15

Donde:

Dosis de depósito = (DD) $\mu\text{g/kg}$

²Volumen minuto respiratorio (RMV) = $0.608 \times BW^{0.852}$

Concentración de exposición al aerosol (AC) = concentración de aerosol de paclitaxel ($\mu\text{g/L}$)

20 Fracción de deposición (DF) = fracción de deposición supuesta del 10 %

BW = peso corporal promedio (en el momento de la aleatorización; día -1) de los animales en el estudio (kg)

Eutanasia y necropsia

En la necropsia programada, los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal de una sobredosis de un sedante a base de barbitúricos.

25 Recolección de sangre y tejidos

En todas las necropsias se registró el peso corporal terminal y el peso del cerebro. Para la eutanasia programada se extrajo sangre (para plasma) mediante punción cardíaca en un tubo con K₂EDTA. Se extrajeron los pulmones y se pesaron. Una sección de tejido pulmonar que contenía un tumor, un ganglio linfático traqueobronquial, se congeló en nitrógeno líquido para un posible análisis futuro. El pulmón restante fue fijado para una posible histopatología.

30

Histopatología

Los lóbulos pulmonares izquierdos fijos se recortaron en forma de "pan de molde" y se colocaron secciones alternas en 2 casetes para obtener 2 portaobjetos, cada uno con 3 secciones representativas del pulmón izquierdo. Los tejidos se procesaron de forma rutinaria, se incluyeron en parafina, se cortaron a ~4 μm , se montaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para su examen microscópico. Los resultados se calificaron de forma subjetiva y semicuantitativa.

35

Secciones de pulmón (1-4/animal) obtenidas de 60 de las 120 ratas desnudas tratadas en el estudio, recortadas longitudinalmente, se procesaron en portaobjetos de vidrio teñidos con H&E para su evaluación con microscopio óptico.

40 Durante esta revisión, se registraron los hallazgos microscópicos y luego se transfirieron a un sistema electrónico de informe de patología (PDS-Ascentos-1.2.0, V.1.2), que resumió la incidencia y la gravedad de los datos de las características de la carga pulmonar, tabuló los resultados y generó los datos de cada animal. Se examinaron histológicamente los pulmones de las 60 ratas desnudas: Grupo 1 [1001-1010], Grupo 2 [2001-2010], Grupo 3 [3001-3010], Grupo 4 [4001-4010], Grupo 5 [5001-5010] y Grupo 6 [6001-6010]. Para evaluar el nivel de carga tumoral en estos pulmones, se evaluaron y calificaron los pulmones durante el examen histopatológico. Para cada diagnóstico característico de carga pulmonar acumulada: 1) Adenocarcinoma (indiferenciado y diferenciado), 2) Células tumorales primitivas (células pleomórficas pobremente diferenciadas) y 3) Regresión tumoral, los pulmones se calificaron de forma semicuantitativa utilizando una escala de

45

calificación de 4 puntos que indica el porcentaje de afectación del tejido pulmonar general, que se proporciona de la siguiente manera: 0 = sin evidencia, 1 = mínimo (~ 1 - 25 % del área total de secciones de pulmón afectadas), 2 = leve (~ 25 - 50 % del área total de secciones de pulmón afectadas), 3 = moderado (~ 50 - 75 % del área total de secciones de pulmón afectadas) y 4 = marcado (~ 75 - 100 % del área total de secciones de pulmón afectadas).

HistoMorfometría

Se realizaron análisis histomorfométricos utilizando lóbulos pulmonares izquierdos fijos de los primeros 10 animales de cada grupo. El tejido se recortó utilizando un recorte estilo morfometría ("rebanada de pan"). Brevemente, el recorte comenzó en un punto aleatorio entre 2 y 4 mm del extremo craneal del pulmón. Cada sección de pulmón se cortó con un espesor de aproximadamente 4 mm. Las secciones con números impares se colocaron con el lado caudal hacia abajo en el casete 1, mientras que las secciones con números pares se colocaron en el casete 2. Luego se procesaron secciones de tejido, se incluyeron en parafina y se cortaron a 4 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) para su examen. Se utilizaron ambos cortes (cortes pares e impares) para determinar una fracción de tumor promedio por animal.

Lovelace Biomedical realizó un análisis morfométrico del tejido pulmonar teñido con hematoxilina y eosina (HE) de los animales designados. Se exploraron cortes completos (2 por animal que contenían secciones transversales de todo el pulmón izquierdo) utilizando un Nanozoomer Hamamatsu. Las exploraciones se analizaron con el software Visiopharm Integrator System (VIS, versión 2017.2.5.3857). El análisis estadístico de la fracción del área tumoral se realizó en GraphPad Prism 5 (versión 5.04).

Se realizó una cuantificación de imágenes computarizada diseñada para cuantificar la cantidad de área de tumor presente en cada corte en todo el tejido del pulmón izquierdo utilizando exploraciones de cortes completos. Se utilizó la aplicación Visiopharm para cuantificar el área de metástasis pulmonares para diferenciar las células tumorales del tejido pulmonar normal según la densidad celular, la intensidad de la tinción y el tamaño y la intensidad de la tinción. Se observa que esta cuantificación basada en la tinción simple H&E no será perfecta (es decir, no es capaz de discriminar completamente entre tipos de tejido tumoral, tejido tumoral necrótico y viable, y algunas estructuras normales pueden incluirse como tumor). El valor de la aplicación de este procedimiento a las secciones de H&E es que es un enfoque imparcial para la cuantificación de tumores. Se determina el área de todo el trozo de pulmón y luego se expresa el área ocupada por las estructuras identificadas como metástasis como porcentaje del área total. Se puede realizar manualmente un pequeño ajuste del área a analizar para garantizar que se excluyan las estructuras extrapulmonares y se incluya todo el pulmón. Se evitan otras manipulaciones manuales para garantizar la coherencia entre todos los grupos y eliminar la posibilidad de introducción de sesgos. Si es posible, el desarrollo de tinciones inmunohistoquímicas específicas para identificar únicamente tejido tumoral aumentaría la especificidad de este análisis.

Recolección y procesamiento de sangre

La sangre recolectada durante la necropsia se procesó en plasma mediante centrifugación a un mínimo de 1300 g a 4 °C durante 10 minutos. Las muestras de plasma se almacenaron entre -70 y -90 °C hasta su análisis o envío al patrocinador.

Resultados

Observación clínica, supervivencia y pesos corporales

Todos los animales sobrevivieron hasta el punto temporal designado para la necropsia. Las observaciones clínicas relacionadas con el modelo incluyeron erupción cutánea y dificultad para respirar. Se observó que un animal tenía una hernia abdominal superior. Por recomendación del veterinario, el animal fue cambiado a un Grupo 1 (Control sin tratamiento) que no estaría expuesto a exposiciones por inhalación, por lo tanto, no sería necesaria ninguna restricción del tubo de exposición.

La figura 8 muestra los pesos corporales promedio a lo largo de la duración del estudio. La figura 9 muestra el cambio porcentual en el peso corporal promedio desde el día 0. Todos los grupos aumentaron de peso aproximadamente al mismo ritmo a lo largo del estudio.

Inyecciones IV de ABRAXANE® en la vena de la cola

Para el grupo que recibió inyecciones IV de ABRAXANE®, la dosis promedio en los días 22, 29 y 36 fue de 4.94, 4.64 y 4.46 mg/kg respectivamente.

Exposición a partículas de paclitaxel

Concentraciones de aerosoles y dosis depositadas

Las concentraciones totales de aerosol y de paclitaxel se midieron mediante muestreo de filtros GF/A durante cada exposición. La concentración promedio de aerosol de paclitaxel expuesto a la inhalación para los grupos

de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja una vez por semana y de dosis baja dos veces por semana fue de 270.51 µg/L y 263.56 µg/L, respectivamente. La concentración promedio de aerosol de paclitaxel expuesto a la inhalación para los grupos de formulación de partículas de paclitaxel de dosis alta una vez por semana y de dosis alta dos veces por semana fue de 244.82 µg/L y 245.76 µg/L, respectivamente. Se controlaron los niveles de oxígeno y temperatura durante cada exposición.

Las dosis se basaron en la concentración promedio de paclitaxel en aerosol, el peso corporal promedio más reciente del grupo, la fracción de deposición asumida del 10 % y una duración de exposición de 33 o 65 minutos. Durante cuatro semanas de tratamiento, la dosis depositada promedio alcanzada por roedores para el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja una vez por semana y el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja dos veces por semana fue de 0.655 mg/kg y 0.640 mg/kg (1.28 mg/kg/semana), respectivamente.

La dosis depositada promedio alcanzada por roedores para el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis alta una vez por semana y el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis alta dos veces por semana fue de 1.166 mg/kg y 1.176 mg/kg (2.352 mg/kg/semana), respectivamente.

Tamaño de partícula (MMAD y GSD)

La distribución del tamaño de partícula se determinó en términos de diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) y desviación estándar geométrica (GSD) para cada formulación de partículas de paclitaxel en aerosol utilizando un impactador en cascada. Para los aerosoles de formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/mL, se determinó que el MMAD promedio era 2.01 µm y una GSD de 1.87.

Observaciones de la necropsia y pesos de los órganos

Todos los animales sobrevivieron hasta el punto temporal designado para la necropsia. En la necropsia, los animales de cada grupo presentaban nódulos de color marrón claro en los pulmones y/o decoloraciones irregulares de color rojo o marrón claro en los pulmones. Otras observaciones esporádicas incluyeron una hernia abdominal en un animal y un nódulo en el pericardio en otro animal. No se observaron otras observaciones macroscópicas anormales durante la necropsia. Un animal no tenía ningún tumor visible (nódulos) en el momento de la necropsia.

Los datos de peso de los órganos animales individuales se muestran gráficamente en la figura 10, figura 11 y figura 12. En los animales tratados con ABRAXANE®, los pesos de los pulmones, las proporciones entre el pulmón y BW y las proporciones entre el peso del pulmón y el cerebro fueron significativamente inferiores en comparación con los controles no tratados. El grupo de dosis alta de formulación de partículas de paclitaxel una vez por semana tuvo pesos similares a los del grupo con ABRAXANE® y pesos pulmonares significativamente menores y proporciones pulmón a cerebro menores en comparación con los controles no tratados. Los grupos de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja una vez por semana, formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja dos veces por semana y formulación de partículas de paclitaxel de dosis alta dos veces por semana generalmente tuvieron pesos y proporciones pulmonares promedio similares.

Morfometría

Todos los grupos de tratamiento mostraron una disminución en la fracción promedio de tumor pulmonar en comparación con el grupo de control; sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Tampoco hubo diferencia estadísticamente significativa entre ABRAXANE IV® tratamiento y cualquiera de los regímenes de tratamiento de formulación de partículas de paclitaxel con respecto a la fracción del área del tumor examinada en portaobjetos transversales de pulmón. Como es típico de este modelo, existe una amplia variabilidad entre los animales dentro de todos los grupos en la fracción tumoral. Estos datos deben considerarse en combinación con otros indicadores de la carga tumoral pulmonar en este modelo, incluidas las proporciones en peso entre el pulmón y el cerebro y la histopatología estándar para la interpretación final. Es importante señalar que el análisis morfométrico y el examen histopatológico se realizaron en tejido pulmonar fijado del lóbulo izquierdo, mientras que otros análisis de tejido pulmonar pueden realizarse en tejido congelado de los lóbulos del pulmón derecho. El área promedio del tumor se muestra en la figura 13 y la figura 14.

Resultados de patología

Como resultado del examen de los cortes de las poblaciones identificadas de células neoplásicas, el patólogo determinó: (1) Hubo una ligera disminución en la gravedad de la carga tumoral pulmonar general de adenocarcinoma (células indiferenciadas y diferenciadas) en todos los grupos tratados (Grp. 2 (1.7), Grp. 3 (1.8), Grp. 4 (1.7), Grp. 5 (1.6) y Grp. 6 (1.6) en comparación con el grupo de control no tratado Grp. 1 (2.1). (2) Hubo una reducción en la población de células tumorales primitivas evidente por una disminución en la gravedad del Grp. 3 (0.3), Grp. 4 (0.3), Grp. 5 (0.2) y Grp. 6 (0.2) en comparación con los controles correspondientes Grp. 1 (0.9) y Grp. 2 (1.0), y 3) Hubo regresión tumoral presente en Grp. 3 (0.6), Grp. 4 (1.0), Grp. 5 (0.8) y Grp. 6 (1.0) en comparación con los controles correspondientes Grp. 1 (0.0) y Grp. 2 (0.1). La

ES 3 015 106 T3

incidencia y la gravedad de los datos de las características de la carga pulmonar se resumen en la tabla 7 y en la figura 15. En las figuras 16 a 50 se muestran fotomicrografías de las diapositivas.

Tabla 7. Tabla de incidencias y gravedades de la carga pulmonar acumulada

GRUPOS	1 Control	2 Abraxane IV	3 Bajo 1×	4 Alto 1×	5 Bajo 2×	6 Alto 2×
Nos. de animales	1001-1010	2001-2010	3001-3010	4001-4010	5001-5010	6001-6010
PULMÓN (NO. EJ)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Adenocarcinoma	10	10	10	9	10	10
Mínimo	2 ^a	4	5	3	5	5
Leve	5	5	2	4	4	3
Moderado	3	1	3	2	1	2
Marcado	0 ^b	0	0	0	0	0
Grado de gravedad promedio	2.1	1.7	1.8	1.7	1.6	1.7
Células tumorales primitivas	9	10	2	3	2	2
Mínimo	9	10	1	3	2	2
Leve	0	0	1	0	0	0
Moderado	0	0	0	0	0	0
Marcado	0	0	0	0	0	0
Grado de gravedad promedio	0.9	1.0	0.3	0.3	0.2	0.2
Regresión tumoral	0	1	6	5	6	5
Mínimo	0	1	6	3	5	2
Leve	0	0	0	0	0	2
Moderado	0	0	0	1	1	0
Marcado	0	0	0	1	0	1
Grado de gravedad promedio	0	0.1	0.6	1.0	0.8	1.0
^a Grado de gravedad basado en una escala de calificación de 4 puntos del 1 al 4: 1 = mínimo, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = marcado.						
^b La presencia de un (0) indica que no hay evidencia histopatológica de la lesión en cuestión.						

5 Reseña histológica de las fotomicrografías en las figuras 16 a 50 Observaciones generales:

Control: Amplios niveles de tumor viable con células proliferantes y poca o ninguna infiltración de células inmunes.

ABRAXANE® IV: Muchas masas tumorales de apariencia viable con cierta respuesta linfocítica junto con cierta regresión tumoral.

10 Formulación de partículas de paclitaxel 1x por semana, alta: Eliminación del tumor del pulmón con pocas células tumorales viables restantes. Las masas restantes parecen ser infiltrado de células inmunes y fibrosis.

Formulación de partículas de paclitaxel 2x por semana, baja: Algunos nódulos tumorales restantes están rodeados por un infiltrado de células inmunes, incluidos macrófagos y células mononucleares.

Formulación de partículas de paclitaxel 2 × por semana, alta: Pocos nódulos tumorales con infiltrado inmune y fibrosis estromal que reemplaza al tumor.

- 5 Se observó una extensa infiltración de células tumorales mononucleares en los pulmones de animales que recibieron la formulación de partículas de paclitaxel por inhalación. Como el modelo usado es deficiente en células T, es probable que las células sean células B o células NK, o ambas. Las células B son responsables de la producción de anticuerpos y pueden participar en la eliminación de células tumorales a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (los anticuerpos se unen a las células que expresan receptores Fc y potencian la capacidad de eliminación de estas células). Las células NK son células linfoides innatas que son cruciales en la eliminación de células tumorales. En pacientes con tumores, la actividad de las células NK se reduce permitiendo el crecimiento del tumor. Junto con las células T, las células NK son el objetivo de algunos inhibidores de puntos de control para aumentar su actividad.

- 15 Mediante el uso de una amplia gama de receptores de superficie capaces de enviar señales desencadenantes o inhibidoras, las células NK pueden controlar las células dentro de su entorno para determinar si la célula es anormal (tumor o está infectada por un virus) y debe eliminarse mediante citotoxicidad.

- 20 La citotoxicidad y la quimiotaxis de las células NK pueden verse modificadas por muchos procedimientos patológicos, incluidas las células tumorales y sus subproductos. En respuesta a determinadas señales sus funciones se potencian o mejoran. En respuesta a varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) mediante el uso de diferentes receptores tipo Toll (TLR); las células NK pueden aumentar la producción de citocinas y/o la actividad citolítica. Las citocinas, incluidas IL-2, IL-15, IL-12, IL-18 y los IFN α/β , también pueden modificar la actividad de las células NK. Las células NK no son células simples que únicamente son efectores citolíticos capaces de matar diferentes dianas de células tumorales; más bien, representan una población heterogénea que puede ajustar finamente su actividad en contextos ambientales variables.

- 25 La carga tumoral parece reducirse significativamente en los pulmones de los animales tratados con la formulación de partículas de paclitaxel y es menor que la de ABRAXANE® IV. Por lo tanto, la administración localizada de paclitaxel en forma de formulación de partículas de paclitaxel proporciona potencia adicional. Es probable que esto se deba tanto a la exposición más prolongada a la quimioterapia como a la vigorosa infiltración celular en el sitio del tumor. Esta última respuesta pareció depender de la densidad de la dosis (dosis real y frecuencia de la dosis).

Observaciones de fotomicrografías específicas:

- 35 La figura 16: Sujeto 1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Aumento de baja potencia (2x) que muestra la distribución general de células tumorales anaplásicas, grandes, pleomórficas e indiferenciadas dentro de los espacios alveolares o revistiendo los tabiques alveolares. La mayoría de las células no tienen características de adenocarcinoma y aparecen en láminas de tumor contiguas. Muchas células tienen citoplasma con tinción basófila, mientras que otras son grandes, anaplásicas y contienen tinción anfófila pálida. Obsérvese la presencia de una población residente preexistente de macrófagos alveolares y la ausencia de regresión tumoral.

- 40 La figura 30: Sujeto 2003 (ABRAXANE® IV) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1. Aumento de baja potencia (4x) que muestra la distribución general de masas tumorales predominantemente en la periferia, así como múltiples masas tumorales expansivas más pequeñas que llenan los espacios alveolares. Las células tumorales son pleomórficas, grandes, anaplásicas y tienen tinción anfófila pálida, variando desde patrones indiferenciados a patrones diferenciados de adenocarcinoma. La evidencia de regresión del tumor está presente aproximadamente la periferia de la masa y se caracteriza principalmente por la infiltración de macrófagos.

- 50 La figura 36: Sujeto 2010 (ABRAXANE® IV) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Aumento de baja potencia (2x) que muestra la distribución general de una gran masa tumoral expansiva que llena la mayoría de los espacios alveolares, así como células neoplásicas en la periferia. La mayoría de las células tumorales son predominantemente indiferenciadas, pleomórficas, grandes, anaplásicas con tinción anfófila pálida. Las células primitivas son más pequeñas, ovoides, tienen un citoplasma de tinción más basófila, con núcleos vesiculares variables y anisocariosis moderada a marcada. La infiltración de células inflamatorias son predominantemente neutrófilos y macrófagos. Esta imagen demuestra una ausencia de regresión tumoral.

- 55 La figura 39: Sujeto 4009 (formulación de partículas de paclitaxel IH 1×/semana alta) Adenocarcinoma-0, Primitivo-0, Regresión-4. La ampliación de baja potencia (2x) muestra la distribución general de masas tumorales previamente pobladas, la presencia de múltiples áreas pequeñas de tejido conectivo fibroso, estroma colágeno central y fibrocitos que se ven en los espacios alveolares periféricos, así como septos alveolares engrosados que respaldan la evidencia de regresión del tumor. Además, los espacios alveolares suelen estar llenos de infiltrados de macrófagos y linfocitos junto con evidencia adicional de regresión tumoral.

La figura 42: Sujeto 5010 (formulación de partículas de paclitaxel IH 2x/semana, baja) Adenocarcinoma-1, Primitivo-0, Regresión-3. Aumento de baja potencia (2x) que muestra la distribución general de masas tumorales previamente pobladas. Las masas en regresión son variablemente pequeñas y se distribuyen aleatoriamente. Se observa tejido conectivo fibroso llenando/reemplazando los espacios alveolares y sugiere focos de adenocarcinoma en regresión. La necrosis aguda, el andamiaje conectivo fibroso, la infiltración celular mixta de macrófagos, células gigantes y linfocitos en el epitelio así como alrededor del estroma son signos de regresión tumoral.

La figura 46: Sujeto 6005 (formulación de partículas de paclitaxel IH 2x/semana alta) Adenocarcinoma-1, Primitivo-0, Regresión-4. Aumento de bajo poder (2x) que muestra la distribución general de masas tumorales previamente pobladas en múltiples áreas pequeñas de tejido conectivo fibroso que llenan/reemplazan los espacios alveolares, lo que sugiere focos de infiltrados previos de células de adenocarcinoma. La regresión del tumor se evidencia por la fibrosis de masas tumorales previamente pobladas, núcleo estromal colágeno central y tejido conectivo fibroso en la periferia que llenan/reemplazan los espacios alveolares, engrosamiento de los septos así como la presencia de fibrocitos que llenan el espacio alveolar infiltrado por linfocitos y macrófagos.

Conclusiones

Ciento veintisiete (127) ratas desnudas NIH-rnu fueron irradiadas con rayos X para inducir inmunosupresión el día -1. El día 0, a los animales se les administraron células tumorales Calu3 mediante instilación intratraqueal (IT). Los animales pasaron por un período de crecimiento de tres semanas. Durante la tercera semana, los animales fueron asignados aleatoriamente a los grupos según estratificación de peso corporal. A partir de la semana 4, los animales del grupo 2 recibieron una dosis semanal de ABRAXANE® mediante dosificación intravenosa (IV) (5 mg/kg) los días 22, 29 y 36. Los animales de los grupos 3 y 4 recibieron una dosis de inhalación (INH) de partículas de paclitaxel una vez por semana (Lunes) en dosis diana bajas (0.5 mg/kg) y altas (1.0 mg/kg), respectivamente. Los animales de los grupos 5 y 6 recibieron una dosis de inhalación diana de formulación de partículas de paclitaxel dos veces por semana (Lunes y Jueves) en dosis bajas (0.50 mg/kg) y altas (1.0 mg/kg) respectivamente. Los animales del grupo 1 se dejaron sin tratamiento como control del crecimiento normal de células tumorales. A todos los animales se les practicó la necropsia durante la semana 8.

Todos los animales sobrevivieron hasta el punto temporal designado para la necropsia. Las observaciones clínicas relacionadas con el modelo incluyeron erupción cutánea y dificultad para respirar. Todos los grupos aumentaron de peso aproximadamente al mismo ritmo a lo largo del estudio.

La concentración promedio de aerosol de paclitaxel expuesto a la inhalación para los grupos de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja una vez por semana y de dosis baja dos veces por semana fue de 270.51 µg/L y 263.56 µg/L, respectivamente. La concentración promedio de aerosol de paclitaxel expuesto a la inhalación para los grupos de formulación de partículas de paclitaxel en dosis alta una vez por semana y en dosis alta dos veces por semana fue de 244.82 µg/L y 245.76 µg/L, respectivamente.

Las dosis se basaron en la concentración promedio de paclitaxel en aerosol, el peso corporal promedio más reciente del grupo, una fracción de deposición asumida del 10 % y una duración de exposición de 33 o 65 minutos. Durante cuatro semanas de tratamiento, la dosis depositada promedio alcanzada por roedores para el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja una vez por semana y el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja dos veces por semana fue de 0.655 mg/kg y 0.640 mg/kg (1.28 mg/kg/semana), respectivamente. La dosis depositada promedio alcanzada por roedores para el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis alta una vez por semana y el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis alta dos veces por semana fue de 1.166 mg/kg y 1.176 mg/kg (2.352 mg/kg/semana), respectivamente. Para el grupo que recibió inyecciones intravenosas de ABRAXANE®, La dosis promedio en los días 22, 29 y 36 fue de 4.94, 4.64 y 4.46 mg/kg respectivamente.

En la necropsia programada, la mayoría de los animales de cada grupo tenían nódulos de color marrón claro en los pulmones y/o decoloraciones irregulares de color rojo o marrón claro en los pulmones. Otras observaciones esporádicas incluyeron una hernia abdominal en un animal y un nódulo en el pericardio de otro animal. No se observaron otras observaciones macroscópicas anormales durante la necropsia.

En los animales tratados con ABRAXANE®, el peso de los pulmones, la proporción entre el peso corporal y el peso pulmonar y la proporción entre el peso del pulmón y el cerebro fueron significativamente inferiores en comparación con los controles no tratados. El grupo de dosis alta de formulación de partículas de paclitaxel una vez por semana tuvo pesos similares a los del grupo ABRAXANE® y pesos pulmonares y proporciones pulmón a cerebro significativamente inferiores en comparación con los controles no tratados.

En comparación con el control positivo Grp. 1 y el ABRAXANE® tratado comparativo Grp. 2, hubo un efecto terapéutico medido por una menor proporción en peso pulmón/cerebro y una menor carga tumoral pulmonar general sin eventos adversos aparentes. El análisis histológico de la carga tumoral pulmonar tratada con la formulación de partículas de paclitaxel inhaladas mostró una disminución de la masa tumoral, una disminución

de la población de células tumorales primitivas y un aumento de la regresión tumoral. Se observó una extensa infiltración de células mononucleares en los pulmones de los animales que recibieron la formulación de partículas de paclitaxel por inhalación. Como el modelo usado es deficiente en células T, es probable que las células sean células B o células NK. Se plantea la hipótesis de que la exposición localizada, probablemente a una concentración más alta, del tumor a las partículas de paclitaxel afectó a los tumores, lo que provocó una alteración del entorno que atrajo el infiltrado de células mononucleares hacia el pulmón.

Ejemplo 4: Estudio FY 17-008B - Estudio farmacocinético de partículas de paclitaxel

Sumario ejecutivo

Noventa (90) ratas Sprague Dawley macho fueron expuestas a una dosis de "referencia clínica" de paclitaxel, ABRAXANE® (partículas unidas a proteínas de paclitaxel para suspensión inyectable, también conocido como nab-paclitaxel), mediante inyección intravenosa en bolo (IV) o formulación de partículas de paclitaxel (dosis diana de 0.37 o 1.0 mg/kg) por inhalación nasal únicamente en una sola ocasión. Se sacrificaron tres animales (n=3) en diez (10) puntos temporales entre 0.5 y 336 horas después de la exposición para recolectar sangre (plasma) y tejido pulmonar. Se realizó un análisis no compartimental (NCA) en plasma y tejido pulmonar para identificar la duración de las cantidades detectables de paclitaxel después de la exposición para cada grupo de dosis. A los animales designados para el punto temporal de 336 horas de todos los grupos se les recolectaron los pulmones derechos para análisis por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS), mientras que los pulmones izquierdos fueron perfundidos con formalina regulada neutra (NBF) al 10 % y se conservaron para una posible histopatología. Para permitir la histopatología comparativa, tres animales de repuesto (controles sin tratamiento previo) fueron sacrificados en el punto temporal de 336 horas y las recolecciones de pulmones se realizaron de la misma manera. A los animales designados para todos los demás puntos temporales se les congelaron individualmente todos los pulmones para el análisis LCMS.

La concentración promedio de aerosol de paclitaxel expuesto a inhalación para los grupos de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja y dosis alta fue de 85.64 µg/L y 262.27 µg/L, respectivamente. La concentración promedio de aerosol expuesto estuvo dentro del ± 15 % de la concentración de aerosol diana que se esperaba para las exposiciones por inhalación nebulizada. La distribución del tamaño de partícula se determinó en términos de MMAD (GSD) para cada aerosol de formulación de partículas de paclitaxel utilizando un impactador en cascada. Para aerosoles de formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL y 20.0 mg/mL, se determinó que el MMAD (GSD) era 1.8 (2.0) µm y 2.3 (1.9) µm, respectivamente.

La dosis baja depositada de paclitaxel se calculó en base a una concentración promedio de aerosol de paclitaxel de 85.64 µg/L, un peso corporal promedio del grupo del día 0 de 420.4 g, una fracción de deposición asumida del 10 % y una duración de exposición de 65 minutos; se determinó que la dosis promedio depositada en roedores alcanzada fue de 0.38 mg/kg para el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja. Para el grupo de formulación de partículas de paclitaxel en dosis alta, la concentración promedio de aerosol de paclitaxel de 262.27 µg/L, el peso corporal promedio del grupo del día 0 de 420.5 g, la fracción de deposición asumida del 10 % y la duración de la exposición de 65 minutos; se determinó que la dosis promedio depositada por roedores alcanzada fue de 1.18 mg/kg. Los intervalos de oxígeno y temperatura registrados fueron 19.8 % - 20.9 % y 20.7 °C - 20.8 °C, respectivamente, para la exposición a la formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL. Para la exposición a la formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/mL, el valor de oxígeno registrado fue del 19.8 % durante toda la exposición y el intervalo de temperatura fue de 20.7 °C a 20.8 °C.

Para el grupo que recibió inyecciones IV de ABRAXANE®, los pesos corporales del día 1 variaron de 386.1 a 472.8 g, lo que dio como resultado dosis de ABRAXANE® de 2.6-3.2 mg/kg, siendo la dosis promedio del grupo de 2.9 mg/kg.

Todos los grupos aumentaron de peso a lo largo del estudio. No se observaron observaciones clínicas anormales durante la duración del estudio. Todos los animales sobrevivieron hasta el punto temporal designado para la necropsia. Todos los animales fueron sacrificados dentro del período previsto para cada punto temporal.

En la necropsia, aproximadamente la mitad de los animales de cada grupo presentaban decoloraciones de color marrón claro mínimas a leves en los pulmones. Tales observaciones suelen estar asociadas a exposiciones por inhalación. Otras observaciones transitorias incluyeron un corazón agrandado (animal # 2016) y ganglios linfáticos traqueobronquiales agrandados. No se observaron otras observaciones macroscópicas anormales durante la necropsia. La histopatología mostró que los pulmones y la tráquea de las ratas tratadas con el artículo de prueba y de referencia estaban dentro de los límites normales y eran indistinguibles de los de las ratas sin tratamiento previo en las condiciones de este estudio. En el sacrificio realizado 336 horas después de la dosificación, la acumulación de macrófagos, que es común en los estudios de inhalación como una respuesta fisiológicamente normal al material exógeno depositado en el pulmón, no fue evidente en las secciones pulmonares de los animales de tratamiento examinados para este estudio.

El NCA fue diseñado para cuantificar la exposición (área bajo la curva de concentración frente al tiempo [AUC]), tiempo hasta la concentración máxima ($T_{\text{máx}}$), concentración máxima ($C_{\text{máx}}$) y, cuando sea posible, la semivida terminal aparente ($T_{1/2}$).

- 5 La hipótesis para la nueva formulación de partículas de paclitaxel fue que la formulación daría como resultado una mayor retención de paclitaxel dentro del tejido pulmonar y reduciría la exposición sistémica. La semivida en el plasma sistémico no se modificó para la formulación/dosis probadas y la semivida dentro del tejido pulmonar aumentó con la formulación de partículas de paclitaxel administrada por inhalación. La exposición al tejido pulmonar (AUC normalizada de dosis) aumentó cuando se administró la formulación de partículas de paclitaxel por inhalación.
- 10 En conjunto, los datos indican una retención significativa de partículas de paclitaxel dentro del tejido pulmonar cuando se administra por inhalación, en comparación con la "referencia clínica" IV.

Objetivos

- 15 El objetivo de este estudio fue determinar la farmacocinética de la formulación de partículas de paclitaxel en comparación con una dosis de referencia clínica de paclitaxel. Los datos farmacocinéticos (PK) piloto del estudio FY 17-008A de Lovelace Biomedical (Ejemplo 1 arriba) con la formulación de partículas de paclitaxel dosificadas por inhalación indicaron un tiempo de retención superior a 168 horas en el tejido pulmonar. En este estudio, a los animales a los que se les administró una dosis única de una formulación de partículas de paclitaxel para inhalación por vía nasal, ya sea baja o alta, o una dosis única de referencia clínica de paclitaxel mediante inyección intravenosa (IV) en la cola, se les evaluó el plasma y el tejido pulmonar en puntos
- 20 temporales desde 0.5 a 336 horas.

Materiales y métodos

Sistema de prueba

Especie/cepa: Ratas de Sprague Dawley

Edad de los animales al inicio del estudio: 8 - 10 semanas

- 25 Intervalo de peso corporal al inicio del estudio: 345-447 gramos

Número de estudio/Sexo: 95 machos (90 animales de estudio y 5 de repuesto)

Fuente: Laboratorios Charles River (Kingston, NY)

Identificación: Marcado permanente de la cola del fabricante

Formulación de ABRAXANE®

- 30 El material de referencia clínica usado en la formulación IV fue el medicamento ABRAXANE® (Fabricante: Celgene Corporation, Summit, NJ; Lote: 6111880). El medicamento se reconstituyó a 5.0 mg/mL con solución salina (Fabricante: Baxter Healthcare, Deerfield, IL; Lote: P357889) el día de la dosificación y se almacenó según las instrucciones del fabricante.

Formulación de partículas de paclitaxel

- 35 La formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/ml para exposiciones del grupo de dosis baja y la formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/ml para exposiciones del grupo de dosis alta se prepararon según las recomendaciones del patrocinador. En concreto, las partículas de paclitaxel se reconstituyeron con polisorbato 80 al 1 %. El vial se agitó a mano hasta que todas las partículas se humedecieron. Se agregó cloruro de sodio adicional al 0.9 % para inyección (hasta la concentración deseada) y se agitó el vial a mano
- 40 durante otro minuto.

- Se continuó agitando hasta que no se vieron grumos grandes y la suspensión se dispersó adecuadamente. Las formulaciones resultantes se dejaron reposar durante al menos 5 minutos para reducir el aire/espuma en el vial antes de colocarlo en un nebulizador para el trabajo de aerosolización. La formulación final de 6.0 mg/mL se mantuvo a temperatura ambiente y se nebulizó dentro de las 2 horas siguientes a la reconstitución. La
- 45 formulación final de 20.0 mg/mL se mantuvo a temperatura ambiente y se nebulizó dentro de los 30 minutos posteriores a la reconstitución.

Diseño experimental

- Los animales del Grupo I que se muestran en la tabla 8 recibieron una única dosis de "referencia clínica" (concentración de formulación: 5 mg/mL, dosis diana: 5.0 mg/kg según el peso corporal; volumen de dosis
- 50 diana: no debe superar los 250 μ L) de ABRAXANE® (partículas unidas a proteína de paclitaxel para suspensión

inyectable) mediante inyección IV en la vena de la cola. Los animales de los grupos 2 y 3 de la tabla 9 estuvieron expuestos a aerosoles de formulación de partículas de paclitaxel (dosis diana de 0.37 o 1.0 mg/kg) únicamente por inhalación nasal (INH) en una sola ocasión según el diseño del estudio a continuación. Se sacrificaron tres animales (n=3) a las 0.5 (± 10 minutos), 6 (± 10 minutos), 12 (± 10 minutos), 24 (± 30 minutos), 48 (± 30 minutos), 72 (± 30 minutos), 120 (± 30 minutos), 168 (± 30 minutos), 240 (± 30 minutos) y 336 (± 30 minutos) horas después de la exposición para recolecciones de sangre (plasma) y tejido pulmonar. Se realizaron análisis no compartimentales en plasma y tejido pulmonar para identificar la duración de cantidades detectables de paclitaxel después de la exposición para cada grupo de dosis. Los animales designados para el punto temporal de 336 horas de todos los grupos tuvieron los pulmones derechos congelados individualmente para el análisis LCMS mientras que los pulmones izquierdos fueron perfundidos con formalina regulada neutra (NBF) al 10 % y conservados para una posible histopatología. Para permitir la histopatología comparativa, tres animales de repuesto (controles sin tratamiento previo) también fueron sacrificados junto con el punto temporal de 336 horas y se les realizaron recolecciones de pulmones de la misma manera.

Tabla 8. Diseño experimental

Grupo	N=	Dosis diana	Vía	Duración de la exposición diana	Puntos temporales de PK (horas posteriores a la exposición)
1 ABRAXANE® Dosis de “referencia clínica”	30	Hasta 5.0 mg/kg ^B	IV	n/a	N=3 de cada grupo a los 0.5, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168, 240 y 336 ^A horas después de la exposición
2 Formulación de partículas de paclitaxel en dosis baja	30	0.37 mg/kg	INH	hasta 65 min	
3 Formulación de partículas de paclitaxel en dosis alta	30	1.0 mg/kg	INH	hasta 65 min	

^A Los animales de estudio de cada grupo y tres repuestos tendrán colecciones de tejido para análisis LCMS, así como una posible histopatología a las 336 horas posteriores a la exposición.

^BABRAXANE® (concentración: Se administró a los animales del Grupo I una dosis diana de 5 mg/ml (hasta 5.0 mg/kg en función del peso corporal y con un volumen de dosis que no supere los 250 µL) mediante IV en la vena de la cola.

Cría, cuarentena y asignación de estudios

Se obtuvieron ratas Sprague Dawley macho (de 6 a 8 semanas) de Charles River Laboratories (Kingston, NY) y se pusieron en cuarentena durante 14 días. Al final de la cuarentena, los animales fueron pesados y luego asignados aleatoriamente por peso para su asignación al estudio. Los animales fueron identificados mediante la marcación de la cola y una tarjeta de jaula. El control del agua, la iluminación, la humedad y la temperatura se mantuvieron y controlaron según los SOP apropiados. Las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar para roedores ad libitum durante las horas sin exposición.

Pesos corporales y observaciones diarias

Los pesos corporales se recogieron al azar, diariamente durante todo el estudio y en el punto temporal de la eutanasia. Cada animal del estudio fue observado dos veces al día por el personal de Comparative Medicine Animal Resources (CMAR) para detectar cualquier signo clínico de anormalidad, mortandad o muerte.

Administración IV de ABRAXANE® - Inyecciones en la vena de la cola

ABRAXANE® (concentración: 5 mg/mL, dosis diana: se administró una dosis de 5.0 mg/kg según el peso corporal; volumen de dosis: no debe superar los 250 μ L) a los animales del Grupo 1 mediante inyección IV en la vena de la cola en una sola ocasión.

Administración de partículas de paclitaxel - Exposición a aerosoles únicamente por la nariz

Acondicionamiento

Los animales fueron condicionados a tubos de exposición únicamente por la nariz durante hasta 70 minutos. Antes de la exposición se realizaron tres sesiones de acondicionamiento durante tres días: la primera sesión duró 30 minutos, la segunda 60 minutos y la tercera 70 minutos. Fueron controlados de cerca durante los

períodos de condicionamiento y durante las exposiciones para asegurar que no experimentaran más que una angustia momentánea.

Sistema de exposición

- 5 Los aerosoles se generaron con dos nebulizadores Hospitak de chorro de aire comprimido como se muestra en la figura 7 arriba (véase el ejemplo 3) a una presión de nebulizador de 137.895 kPa (20 psi).

- 10 Se utilizaron formulaciones de suspensión de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL y 20.0 mg/mL para exposiciones a dosis bajas y dosis altas, respectivamente. Ambas formulaciones se aerosolizaron por separado y los aerosoles se dirigieron a través de una línea de suministro a una cámara de exposición de 32 puertos únicamente para la nariz. Las exposiciones a la inhalación de roedores se llevaron a cabo durante 65 minutos cada una. Se generó un aerosol de suspensión de partículas de paclitaxel con un conjunto de dos nebulizadores de aire comprimido Hospitak (usados durante hasta 40 ($\pm$ 1) minutos), luego se reemplazó con un segundo conjunto de dos nebulizadores Hospitak durante el resto de la exposición. Se controlaron y registraron el oxígeno y la temperatura durante cada exposición a la inhalación.

Control de la concentración

- 15 Igual que en el ejemplo 1

Determinación del tamaño de partículas

Igual que en el ejemplo 1

Determinación de la dosis

Igual que en el ejemplo 1

- 20 Eutanasia y necropsia

Los animales fueron sacrificados en los puntos temporales indicados en los diseños de estudio anteriores mediante una inyección intraperitoneal (IP) de solución de eutanasia.

- 25 Para el punto temporal de 336 horas (y animales de repuesto, $n = 3$): Durante la necropsia, se recogió sangre (para plasma) mediante punción cardíaca en un tubo con K₂EDTA. Se recogió un peso de pulmón entero, se ligó el pulmón izquierdo, se llenó con formalina regulada neutra y se guardó para una posible histopatología. Los lóbulos del pulmón derecho se pesaron individualmente y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a una temperatura de -70 a -90 °C para realizar análisis bioanalíticos. Además, personal calificado para necropsias realizó un examen macroscópico completo. Se examinaron las superficies externas del cuerpo, los orificios y el contenido de las cavidades craneal, torácica y abdominal. Las lesiones se describieron y registraron utilizando un conjunto de términos de glosario para morfología, cantidad, forma, color, consistencia y gravedad.

- 35 Para todos los demás puntos temporales: Durante la necropsia, se recogió sangre (para plasma) mediante punción cardíaca en un tubo con K₂EDTA. Se recogió el peso de todo el pulmón, se pesaron individualmente los lóbulos pulmonares y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a una temperatura de -70 a -90 °C para realizar análisis bioanalíticos. Además, personal calificado para necropsias realizó un examen macroscópico completo. Se examinaron las superficies externas del cuerpo, los orificios y el contenido de las cavidades craneal, torácica y abdominal. Las lesiones se describieron y registraron utilizando un conjunto de términos de glosario para morfología, cantidad, forma, color, consistencia y gravedad.

Histopatología

- 40 Se recortaron los tejidos fijados disponibles. Los lóbulos pulmonares izquierdos fijos se recortaron para obtener una sección típica de patología toxicológica con vías respiratorias. Los tejidos se procesaron de forma rutinaria, se incluyeron en parafina, se cortaron a ~4 μ m, se montaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para su examen microscópico. Los hallazgos fueron calificados subjetivamente y semicuantitativamente por un solo patólogo con experiencia en patología toxicológica en una escala de 1 a 5 (1 = mínimo, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = marcado, 5 = grave). Se utilizó un software informático/base de datos Provantis™(Instem LSS Ltd., Staffordshire, Inglaterra) para la adquisición, el informe y el análisis de datos de histopatología.

- 45 Recolección y procesamiento de sangre

- 50 La sangre recolectada durante la necropsia se procesó hasta obtener plasma mediante centrifugación a un mínimo de 1 300 g a 4 °C durante 10 minutos. Las muestras de plasma se almacenaron entre -70 y -90 °C hasta su análisis.

Análisis bioanalíticos

5 Se analizó la sangre sistémica (en forma de plasma de K₂EDTA) y el tejido pulmonar mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS) para cuantificar la cantidad de paclitaxel en función del tiempo. En resumen, el ensayo utiliza un ensayo de cromatografía líquida de ultra rendimiento y espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) para cuantificar el paclitaxel. Las muestras se extraen mediante un método de precipitación de proteínas y la separación se logra mediante cromatografía de fase inversa. La cuantificación se realizó con una curva de calibración basada en matriz.

Se realizaron análisis no compartimentales de datos de concentraciones plasmáticas y de tejido pulmonar. Se determinaron como mínimo la C_{máx}, T_{máx}, AUC y la semivida terminal aparente. Se pueden determinar otros parámetros en base a los datos.

10 Resultados

Observaciones clínicas, supervivencia y pesos corporal

Todos los animales sobrevivieron hasta el punto temporal designado para la necropsia. Todos los animales fueron sacrificados dentro del período previsto para cada punto temporal.

No se observaron observaciones clínicas anormales durante la duración del estudio.

15 La figura 51 y la figura 52 muestra los pesos corporales promedio durante la duración del estudio y como un cambio porcentual desde el día 1. Todos los grupos aumentaron de peso aproximadamente al mismo ritmo a lo largo del estudio.

Inyecciones IV de ABRAXANE® en la vena de la cola

20 Para el grupo que recibió inyecciones intravenosas de ABRAXANE®, el peso corporal del día 1 osciló entre 386.1 y 472.8 g, lo que dio como resultado una dosis de ABRAXANE® de 2.6-3.2 mg/kg. La dosis promedio (desviación estándar) fue de 2.9 (0.16) mg/kg. Las dosis de ABRAXANE® individual se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Dosis de ABRAXANE® individual

Nombre del sujeto	Día 1 Peso corporal (g)	ABRAXANE® administrado ^ (mg)	Dosis (mg/kg)
1001	442.1	1.25	2.8
1002	441.3	1.25	2.8
1003	425.1	1.25	2.9
1004	435.7	1.25	2.9
1005	446.3	1.25	2.8
1006	412.8	1.25	3.0
1007	472.8	1.25	2.6
1008	435.6	1.25	2.9
1009	400.4	1.25	3.1
1010	469.8	1.25	2.7
1011	412.9	1.25	3.0
1012	456.9	1.25	2.7
1013	390.7	1.25	3.2
1014	403.6	1.25	3.1
1015	414.1	1.25	3.0
1016	436.0	1.25	2.9
1017	404.5	1.25	3.1

ES 3 015 106 T3

1018	424.7	1.25	2.9
1019	386.1	1.25	3.2
1020	395.0	1.25	3.2
1021	414.8	1.25	3.0
1022	438.5	1.25	2.9
1023	458.7	1.25	2.7
1024	425.4	1.25	2.9
1025	467.3	1.25	2.7
1026	423.2	1.25	3.0
1027	414.8	1.25	3.0
1028	453.5	1.25	2.8
1029	441.1	1.25	2.8
1030	458.6	1.25	2.7
Promedio	430.1	1.3	2.9
Std. Dev.	24.14	0.00	0.16
^Los animales recibieron un volumen de dosis IV máximo de 250 µL de la formulación de 5 mg/mL ABRAXANE® (1.25 mg).			

Exposición a partículas de paclitaxel

Concentración de aerosoles y tamaño de partículas

Véase: Resultados - Concentración de aerosol y tamaño de partículas en el ejemplo 2.

5 Oxígeno y temperatura

Véase: Resultados - Oxígeno y temperatura en el ejemplo 2.

Dosis depositada

Véase: Resultados - Dosis depositada en el ejemplo 2.

Necropsia

- 10 Todos los animales sobrevivieron hasta el punto temporal designado para la necropsia. En la necropsia, los animales de cada grupo presentaron decoloraciones mínimas a leves de color marrón claro en los pulmones (Tabla 10). Tales observaciones suelen estar asociadas a exposiciones por inhalación. Otras observaciones esporádicas incluyeron un corazón agrandado (animal # 2016) y ganglios linfáticos traqueobronquiales agrandados. No se observaron otras observaciones macroscópicas anormales durante la necropsia.

15 Tabla 10. Sumario de las observaciones macroscópicas de la necropsia

	ABRAXANE® IV	Formulación de partículas de paclitaxel en dosis bajas	Partículas de paclitaxel en dosis altas IH	Control sin tratamiento previo
Número en estudio	30	30	30	3
No hay lesiones visibles	15	14	11	3

Pulmones - Decoloración; Color marrón claro; Todos; Parches

	ABRAXANE® IV	Formulación de partículas de paclitaxel en dosis bajas	Partículas de paclitaxel en dosis altas IH	Control sin tratamiento previo
Mínimo (1))	0	4	2	0
Leve (2)	14	12	15	0
Moderado (3))	1	0	2	0

Histopatología

5 No se observaron anomalías significativas en la tráquea ni en los pulmones izquierdos de los animales sacrificados 336 horas (~14 días) después de la dosificación examinados para este estudio. Los tejidos eran microscópicamente indistinguibles de los animales "de repuesto" que sirvieron como controles.

10 La acumulación de macrófagos no fue evidente en las secciones de pulmón de los animales de tratamiento examinados para este estudio. Es muy común que en los estudios de inhalación se observe cierto nivel de aumento de los macrófagos alveolares como respuesta fisiológicamente normal al material exógeno depositado en el pulmón (niveles menores también pueden ser una observación relativamente común en animales no tratados). La aparente ausencia en animales que recibieron dosis de inhalación en este estudio puede estar relacionada en parte con el punto temporal relativamente tardío (336 horas o ~14 días) posterior a la dosis examinado histológicamente.

Modelado bioanalítico y farmacocinético

15 Los resultados se resumen a continuación en las tablas 11, 12 y 13, y en la figura 53 y la figura 54. Los datos de concentración plasmática promedio de paclitaxel frente al tiempo y de concentración tisular pulmonar promedio de paclitaxel frente al tiempo se modelaron como se muestra arriba y los resultados se muestran en las tablas 14 y 15, respectivamente.

Tabla 11. Resultados bioanalíticos de pulmón y plasma - ABRAXANE® IV (nab-paclitaxel IV)

ID de animales	Punto temporal (h)	Plasma		Tejido pulmonar	
		Concentración (ng/mL)	Concentración media por punto temporal (ng/mL)	Concentración (ng/mL)	Concentración media por punto temporal (ng/mL)
1001	0.5	153	206	5850	5800
1002		205		5250	
1003		261		6300	
1004	6	70.5	62.2	2665	2730
1005		66.7		2880	
1006		49.3		2645	
1007	12	18.9	20.0	1045	1170
1008		20		1145	
1009		21.1		1320	
1010	24	9.46	15.3	386	647
1011		16.3		825	
1012		20.1		730	
1013	48	5.08	2.98	307	244

ES 3 015 106 T3

1014		1.56		190	
1015		2.3		237	
1016	72	BQL	1.05	101	145
1017		1.05		221	
1018		BQL		113	
1019	120	BQL	BQL	BQL	BQL
1020		BQL		BQL	
1021		BQL		BQL	
1022	168	BQL	BQL	BQL	BQL
1023		BQL		BQL	
1024		BQL		BQL	
1025	240	BQL	BQL	BQL	BQL
1026		BQL		BQL	
1027		BQL		BQL	
1028	336	BQL	BQL	BQL	BQL
1029		BQL		BQL	
1030		BQL		BQL	

Tabla 12. Resultados bioanalíticos de pulmón y plasma - Formulación de partículas de paclitaxel en dosis baja (0.38 mg/kg) IH

ID de animales	Punto temporal (h)	Plasma		Tejido pulmonar	
		Concentración (ng/mL)	Concentración media por punto temporal (ng/mL)	Concentración (ng/mL)	Concentración media por punto temporal (ng/mL)
2001	0.5	15.6	11.6	19450	21000
2002		12.1		17700	
2003		7.09		25850	
2004	6	3.44	2.87	6700	4990
2005		2.37		3945	
2006		2.81		4325	
2007	12	5.29	3.35	6200	5368
2008		2.08		5550	
2009		2.67		4355	
2010	24	BQL	1.26	2325	3008

ES 3 015 106 T3

2011		1.16		2045	
2012		1.36		4655	
2013	48	BQL	BQL	850	1247
2014		BQL		1530	
2015		BQL		1360	
2016	72	BQL	BQL	950	950
2017		BQL		1385	
2018		BQL		515	
2019	120	BQL	BQL	1500	1045
2020		BQL		890	
2021		BQL		745	
2022	168	BQL	BQL	309	377
2023		BQL		695	
2024		BQL		129	
2025	240	BQL	BQL	58	109
2026		BQL		151	
2027		BQL		117	
2028	336	BQL	BQL	BQL	55.5
2029		BQL		55.5	
2030		BQL		BQL	

Tabla 13. Resultados bioanalíticos de pulmón y plasma - Formulación de partículas de paclitaxel en dosis alta (1.18 mg/kg) IH

ID de animales	Punto temporal (h)	Plasma		Tejido pulmonar	
		Concentración (ng/mL)	Concentración media por punto temporal (ng/mL)	Concentración (ng/mL)	Concentración media por punto temporal (ng/mL)
3001	0.5	10.8	15.9	40400	41600
3002		21.3		43800	
3003		15.6		40600	
3004	6	6.56	5.69	15500	20800
3005		4.35		20400	
3006		6.15		26500	
3007	12	7.14	4.95	17050	14700
3008		3.47		13500	

3009		4.23		13550	
3010	24	1.47	1.96	10300	11433
3011		3.11		11700	
3012		1.31		12300	
3013	48	1.21	1.21	6000	6700
3014		BQL		7300	
3015		BQL		6800	
3016	72	BQL	1.06	4375	3953
3017		1.06		4735	
3018		BQL		2750	
3019	120	BQL	BQL	1570	1923
3020		BQL		1110	
3021		BQL		3090	
3022	168	BQL	BQL	3395	2143
3023		BQL		1410	
3024		BQL		1625	
3025	240	BQL	BQL	271	430
3026		BQL		448	
3027		BQL		570	
3028	336	BQL	BQL	233	272
3029		BQL		367	
3030		BQL		216	

Tabla 14. Resultados del modelado PK plasmático de paclitaxel

Grupo	Dosis (mg/kg)	C _{máx} (ng/mL)	T _{máx} (h)	T _{1/2} (h)	AUC _(último) (h*ng/mL)	AUC _{D(último)} (h*ng*mg/mL*kg)
IV	2.9	206	0.5	8.7	1517	528
Inhalación	0.38	11.6	0.5	7.9	101	264
Inhalación	1.18	15.9	0.5	8.6	228	193

Tabla 15. Resultados del modelado PK del tejido pulmonar con paclitaxel

Grupo	Dosis (mg/kg)	C _{máx} (ng/mL)	T _{máx} (h)	T _{1/2} (h)	AUC _(último) (h*ng/mL)	AUC _{D(último)} (h*ng*mg/mL*kg)
IV	2.9	5800	0.5	19.9	62,870	23,112
Inhalación	0.38	21,000	0.5	56.3	342,877	914,095
Inhalación	1.18	41,600	0.5	56.0	1,155,662	997,985

El modelado se realizó con WinNonlin basándose en las concentraciones promedio de plasma o tejido pulmonar en cada punto temporal. El NCA fue diseñado para cuantificar la exposición (área bajo la curva de concentración frente al tiempo [AUC]), tiempo hasta la concentración máxima (T_{max}), concentración máxima (C_{max}) y, cuando sea posible, la semivida terminal aparente ($T_{1/2}$).

5 La semivida en el plasma sistémico no se modificó para la formulación/dosis probadas y la semivida dentro del tejido pulmonar aumentó con la formulación de partículas de paclitaxel administrada por inhalación. La exposición al tejido pulmonar (AUC normalizada de dosis) aumentó cuando se administró la formulación de partículas de paclitaxel por inhalación.

10 En conjunto, los datos indican una retención significativa de partículas de paclitaxel dentro del tejido pulmonar cuando se administra por inhalación.

Conclusiones

15 Noventa (90) ratas Sprague Dawley macho fueron expuestas a una dosis de "referencia clínica" de paclitaxel, ABRAXANE® (partículas de paclitaxel unidas a proteína para suspensión inyectable), mediante inyección intravenosa en bolo (IV) o formulación de partículas de paclitaxel (dosis diana de 0.37 o 1.0 mg/kg) por inhalación nasal únicamente en una sola ocasión. Se sacrificaron tres animales (n=3) en diez (10) puntos temporales entre 0.5 y 336 horas después de la exposición para recolectar sangre (plasma) y tejido pulmonar. Se realizó un análisis no compartimental en plasma y tejido pulmonar para identificar la duración de las cantidades detectables de paclitaxel después de la exposición para cada grupo de dosis. A los animales designados para el punto temporal de 336 horas de todos los grupos se les recolectaron los pulmones derechos para análisis por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS), mientras que los pulmones izquierdos fueron perfundidos con formalina regulada neutra (NBF) al 10 % y se conservaron para una posible histopatología. Para permitir la histopatología comparativa, tres animales de repuesto (controles nativos) también fueron sacrificados en el punto temporal de 336 horas y se les realizaron recolecciones de pulmones de la misma manera. A los animales designados para todos los demás puntos temporales se les congelaron individualmente todos los pulmones para el análisis LCMS.

25 La concentración promedio de aerosol de paclitaxel expuesto a inhalación para los grupos de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja y dosis alta fue de 85.64 µg/L y 262.27 µg/L, respectivamente. La concentración promedio de aerosol expuesto estuvo dentro del ± 15 % de la concentración de aerosol diana que se esperaba para las exposiciones por inhalación nebulizada. La distribución del tamaño de partícula se determinó en términos de MMAD (GSD) para cada formulación de partículas de paclitaxel en aerosol utilizando un impactador en cascada. Para aerosoles de formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL y 20.0 mg/mL, se determinó que el MMAD (GSD) era de 1.8 (2.0) µm y 2.3 (1.9)

µm, respectivamente.

35 La dosis depositada de paclitaxel se calculó en base a la concentración promedio de aerosol de paclitaxel de 85.64 µg/L, el peso corporal promedio del grupo del día 0 de 420.4 g, la fracción de deposición asumida del 10 % y la duración de la exposición de 65 minutos; se determinó que la dosis promedio depositada en roedores alcanzada fue de 0.38 mg/kg para el grupo de formulación de partículas de paclitaxel de dosis baja. Para el grupo de formulación de partículas de paclitaxel en dosis alta, la concentración promedio de aerosol de paclitaxel de 262.27 µg/L, el peso corporal promedio del grupo del día 0 de 420.5 g, la fracción de deposición asumida del 10 % y la duración de la exposición de 65 minutos; se determinó que la dosis promedio depositada por roedores alcanzada fue de 1.18 mg/kg. Los intervalos de oxígeno y temperatura registrados fueron 19.8 % - 20.9 % y 20.7 °C - 20.8 °C, respectivamente, para la exposición a la formulación de partículas de paclitaxel de 6.0 mg/mL. Para la exposición a la formulación de partículas de paclitaxel de 20.0 mg/mL, el valor de oxígeno registrado fue del 19.8 % durante toda la exposición y el intervalo de temperatura fue de 20.7 °C a 20.8 °C.

45 Para el grupo que recibió inyecciones IV de ABRAXANE®, el peso corporal del día 1 osciló entre 386.1 y 472.8 g, lo que dio como resultado dosis de ABRAXANE® de 2.6-3.2 mg/kg, siendo la dosis promedio del grupo de 2.9 mg/kg.

50 Todos los grupos aumentaron de peso a lo largo del estudio. No se observaron observaciones clínicas anormales durante la duración del estudio. Todos los animales sobrevivieron hasta el punto temporal designado para la necropsia. Todos los animales fueron sacrificados dentro del período previsto para cada punto temporal.

55 En la necropsia, aproximadamente la mitad de los animales de cada grupo presentaban decoloraciones de color marrón claro mínimas a leves en los pulmones. Tales observaciones suelen estar asociadas a exposiciones por inhalación. Otras observaciones transitorias incluyeron un corazón agrandado (animal # 2016) y ganglios linfáticos traqueobronquiales agrandados. No se observaron otras observaciones macroscópicas anormales durante la necropsia. La histopatología mostró que los pulmones y la tráquea de las ratas tratadas con el artículo de prueba y de referencia estaban dentro de los límites normales y eran indistinguibles de los de las ratas sin tratamiento previo en las condiciones de este estudio.

El NCA fue diseñado para cuantificar la exposición (área bajo la curva de concentración frente al tiempo [AUC]), tiempo hasta la concentración máxima ($T_{\text{máx}}$), concentración máxima ($C_{\text{máx}}$) y, cuando sea posible, la semivida terminal aparente ($T_{1/2}$).

- 5 La hipótesis para la nueva formulación de partículas de paclitaxel fue que la formulación daría como resultado una mayor retención de paclitaxel dentro del tejido pulmonar y reduciría la exposición sistémica. La semivida en el plasma sistémico no se modificó para la formulación/dosis probadas y la semivida dentro del tejido pulmonar aumentó con la formulación de partículas de paclitaxel administrada por inhalación. La exposición al tejido pulmonar (AUC normalizada de dosis) aumentó cuando se administró la formulación de partículas de paclitaxel por inhalación.
- 10 En conjunto, los datos indican una retención significativa de partículas de paclitaxel dentro del tejido pulmonar cuando se administra por inhalación, en comparación con la "referencia clínica" IV.

REIVINDICACIONES

1. Una suspensión aerosolizada que comprende partículas de taxano que comprenden al menos el 95 % en peso del taxano, en la que las partículas de taxano tienen un tamaño de partícula medio (número) de entre 0.4 μm y 2 μm según lo determinado por oscurecimiento de luz o difracción láser, un área de superficie específica (SSA) de entre 12 m^2/g y $60 \pm 3 \text{ m}^2/\text{g}$ medido por la isoterma de Brunauer-Emmett-Teller y una densidad aparente media de entre $0.05 \pm 0.0025 \text{ g/cm}^3$ y $0.12 \pm 0.006 \text{ g/cm}^3$ como se mide vertiendo las partículas en un cilindro graduado, sin golpear, a temperatura ambiente, para su uso en el tratamiento de un tumor pulmonar, en el que la suspensión se administra por vía pulmonar mediante nebulización a un sujeto con un tumor pulmonar, y en el que el taxano comprende paclitaxel, docetaxel o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
2. La suspensión para su uso según la reivindicación 1, en la que las partículas de taxano tienen un tamaño de partícula medio (número) de entre 0.4 μm y $1.2 \pm 0.06 \mu\text{m}$.
3. La suspensión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que las partículas de taxano tienen un tamaño de partícula medio (número) de entre $0.6 \pm 0.03 \mu\text{m}$ y $1.0 \pm 0.05 \mu\text{m}$.
4. La suspensión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que las partículas de taxano tienen un SSA de al menos 18 m^2/g .
5. La suspensión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la suspensión comprende:
 - (a) las partículas de taxano;
 - (b) un portador farmacéuticamente aceptable; y
 - (c) un polisorbato, en la que el polisorbato está presente en la suspensión en una concentración de entre 0.01 $\pm 0.0005 \text{ \% v/v}$ y $1.5 \pm 0.075 \text{ \% v/v}$.
6. La suspensión para su uso según la reivindicación 5, en la que el portador farmacéuticamente aceptable es solución salina, tal como solución de cloruro de sodio al 0.9 %.
7. La suspensión para su uso según la reivindicación 5 o 6, en la que el polisorbato es polisorbato 80.
8. La suspensión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en la que el taxano está presente en la suspensión en una concentración entre $1 \pm 0.05 \text{ mg/ml}$ y $40 \pm 2 \text{ mg/ml}$.
9. La suspensión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que las partículas no están recubiertas y excluyen lípidos, polímeros, proteínas tales como albúmina, aceite de ricino polietoxilado y/o glicéridos de polietilenglicol compuestos de mono-, di- y triglicéridos y mono- y diésteres de polietilenglicol.
10. La suspensión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el taxano comprende paclitaxel o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
11. La suspensión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el taxano comprende docetaxel o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
12. La suspensión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que las partículas de taxano están en forma cristalina.
13. La suspensión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la aerosolización da como resultado gotitas de aerosol que tienen un diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) de entre $0.5 \pm 0.025 \mu\text{m}$ y $6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ de diámetro.
14. La suspensión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que la composición se administra en dos o más administraciones separadas.

Niveles de paclitaxel en plasma y pulmón

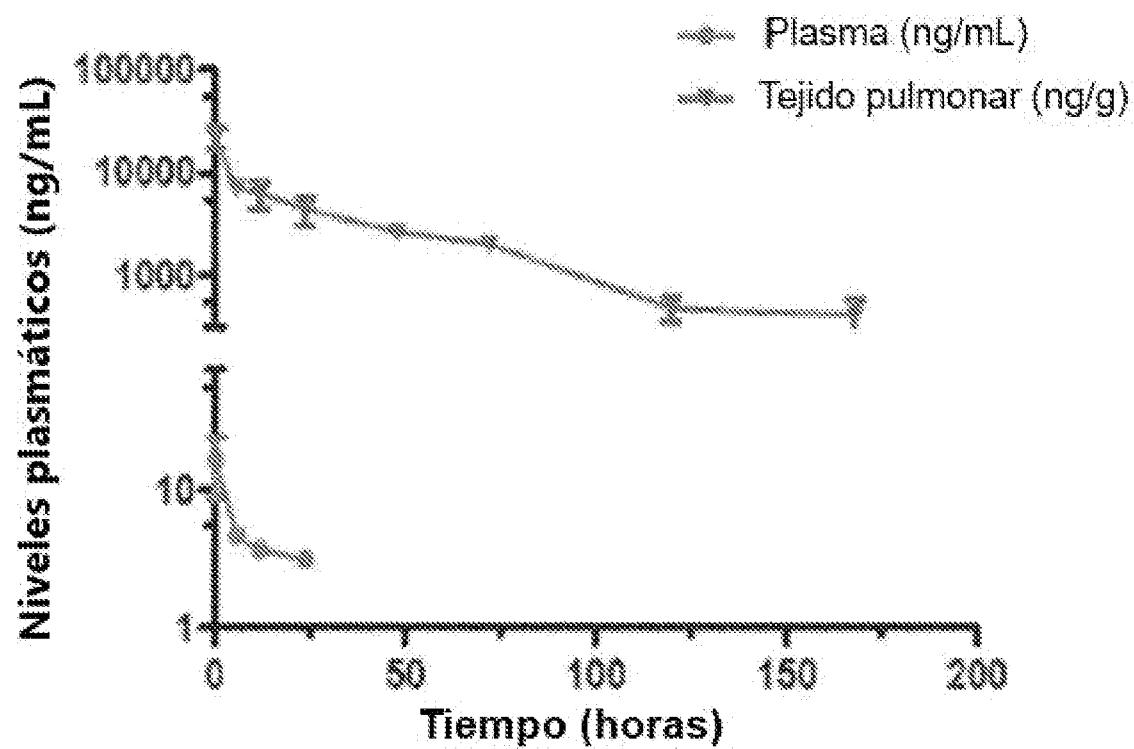


FIGURA 1

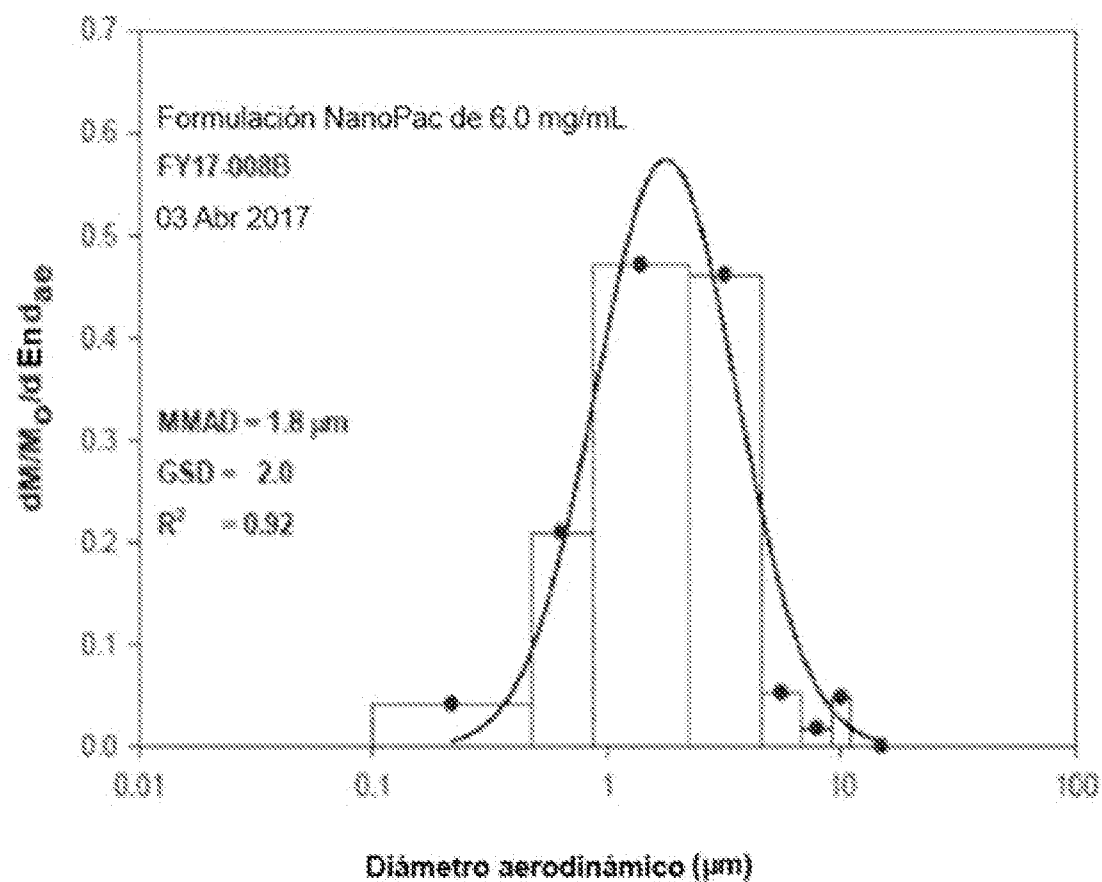


FIGURA 2

Distribución del tamaño de partículas de los aerosoles de la formulación NANOPAC[®] de 20.0 mg/mL medida mediante un impactador en cascada

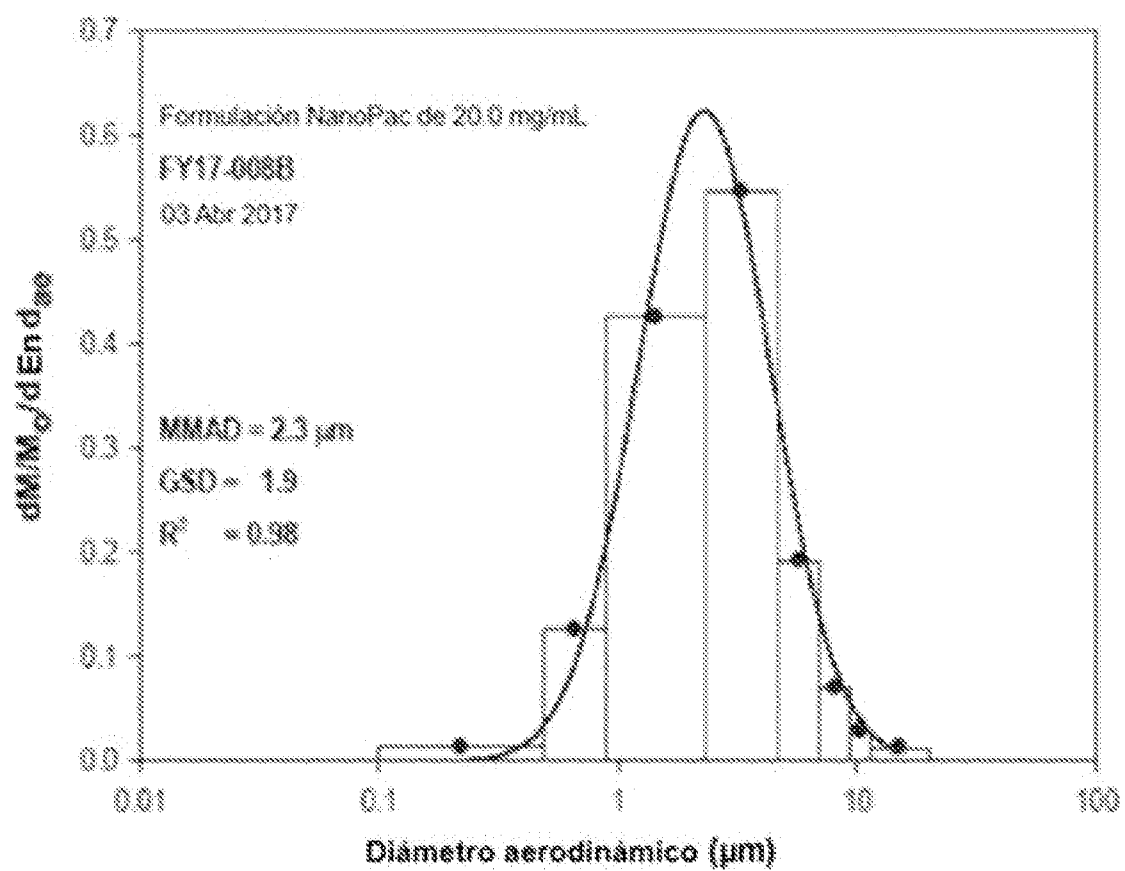


FIGURA 3

Datos del estudio PK FY17-008B que muestran la cantidad de paclitaxel en plasma a lo largo del tiempo

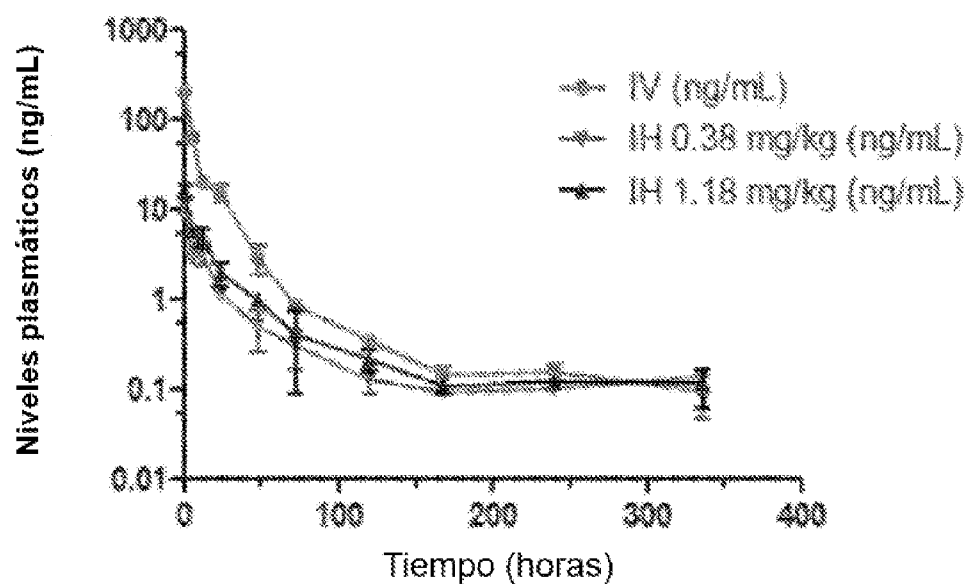


FIGURA 4

Datos del estudio PK FY17-008B que muestran la cantidad de paclitaxel en el tejido pulmonar a lo largo del tiempo

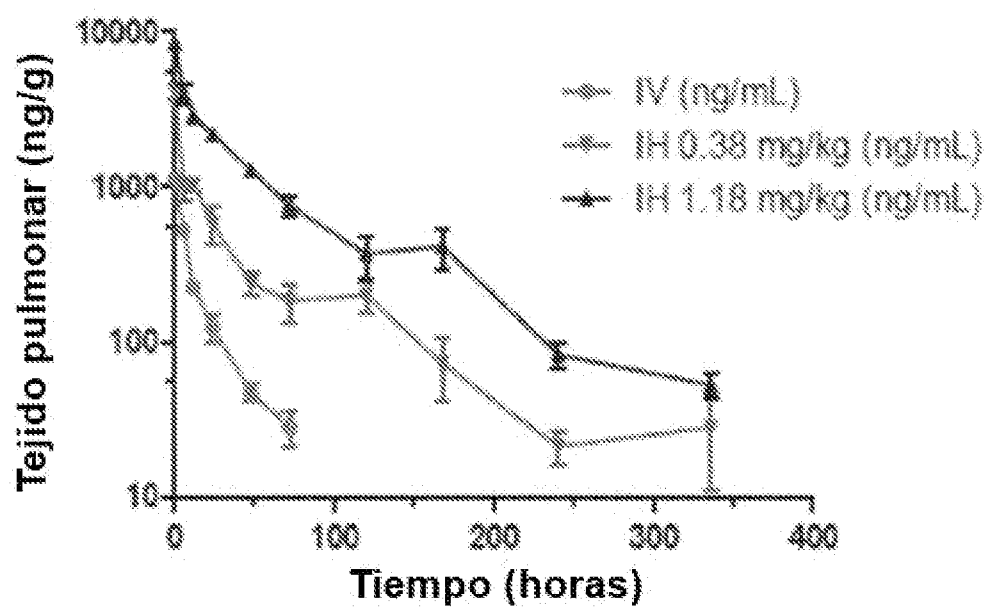


FIGURA 5

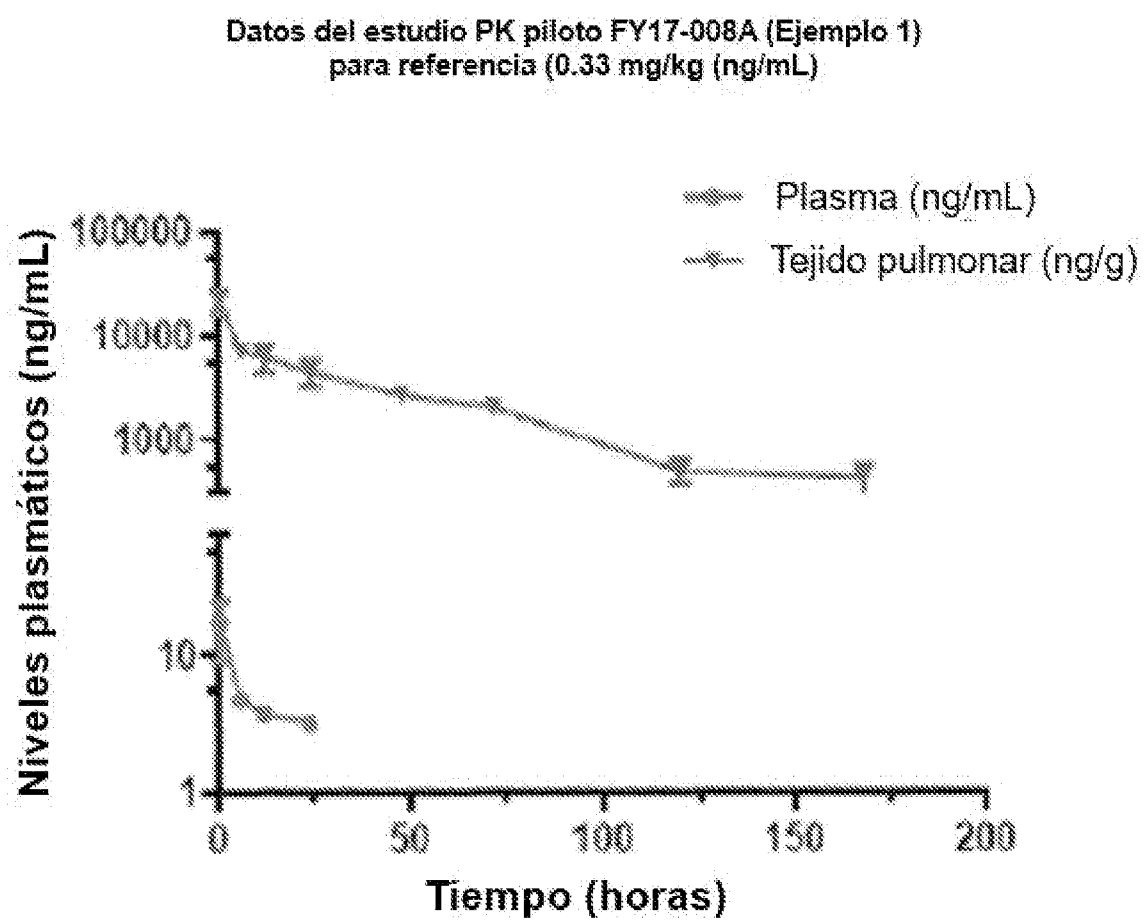


FIGURA 6

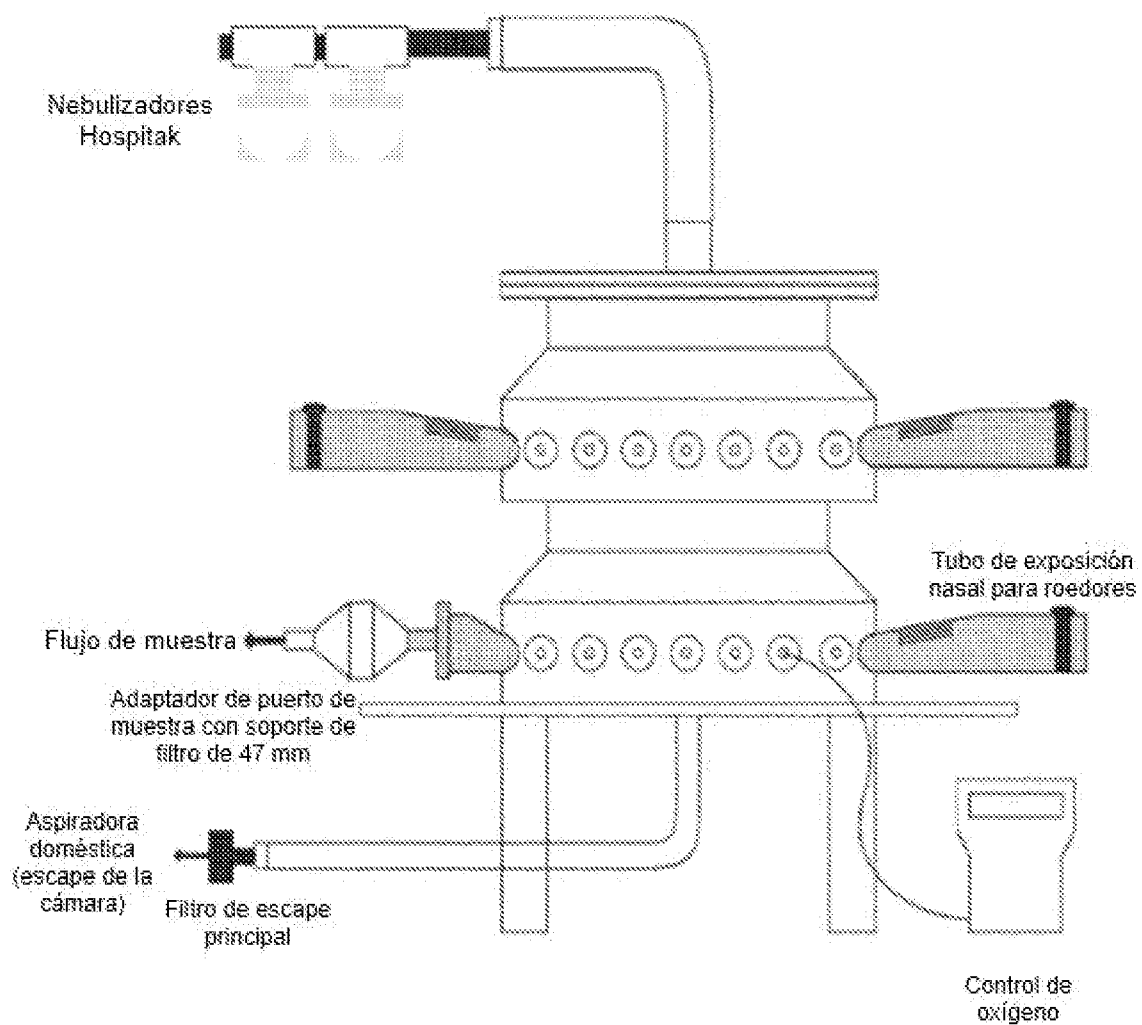


FIGURA 7

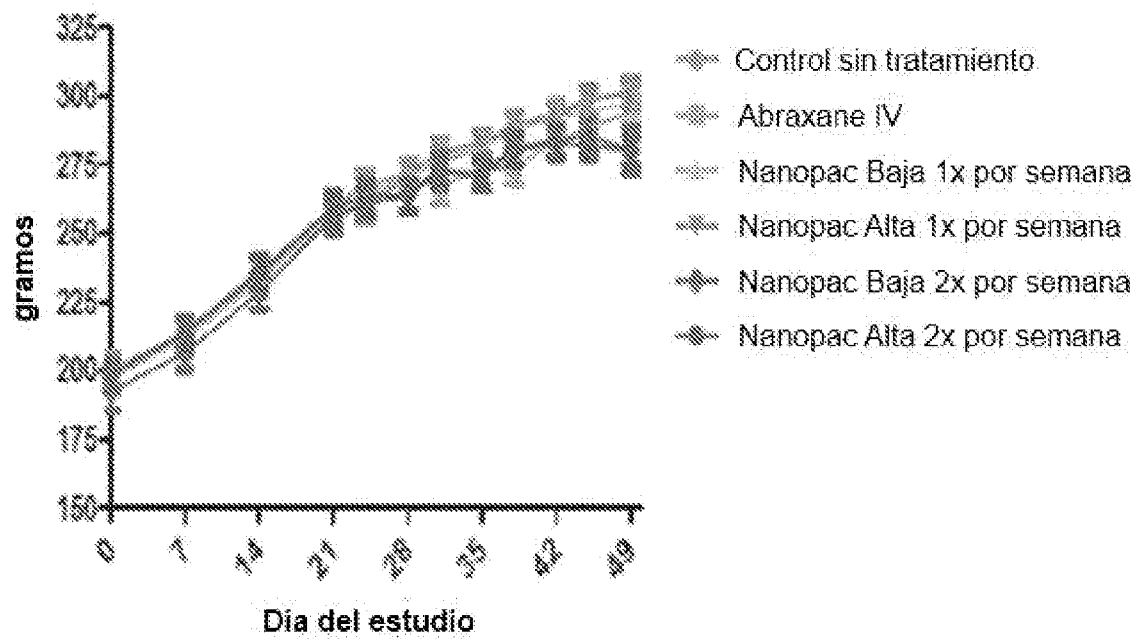


FIGURA 8

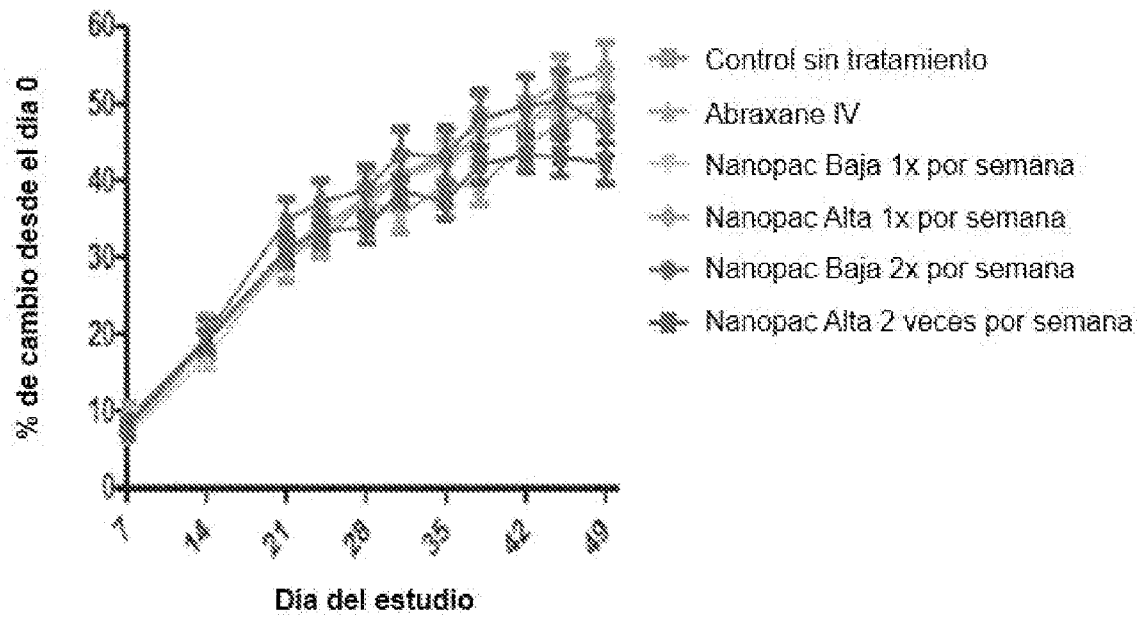


FIGURA 9

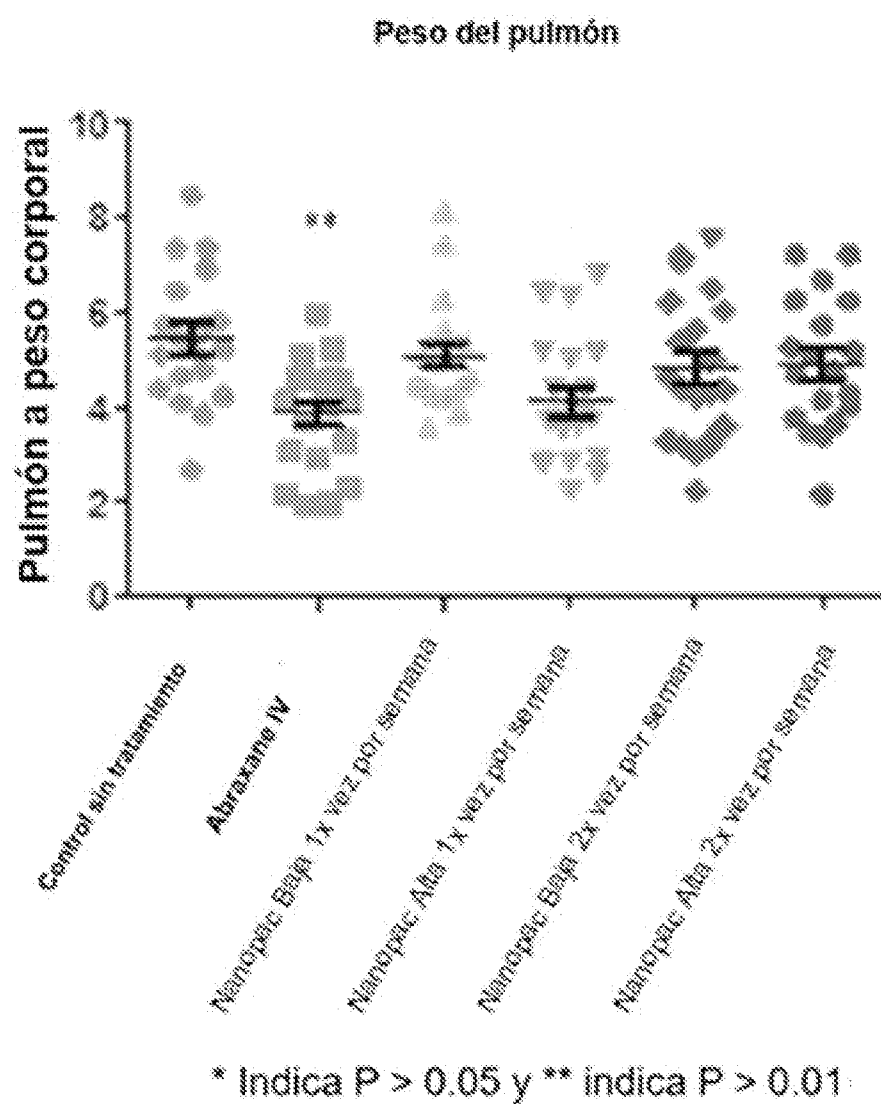
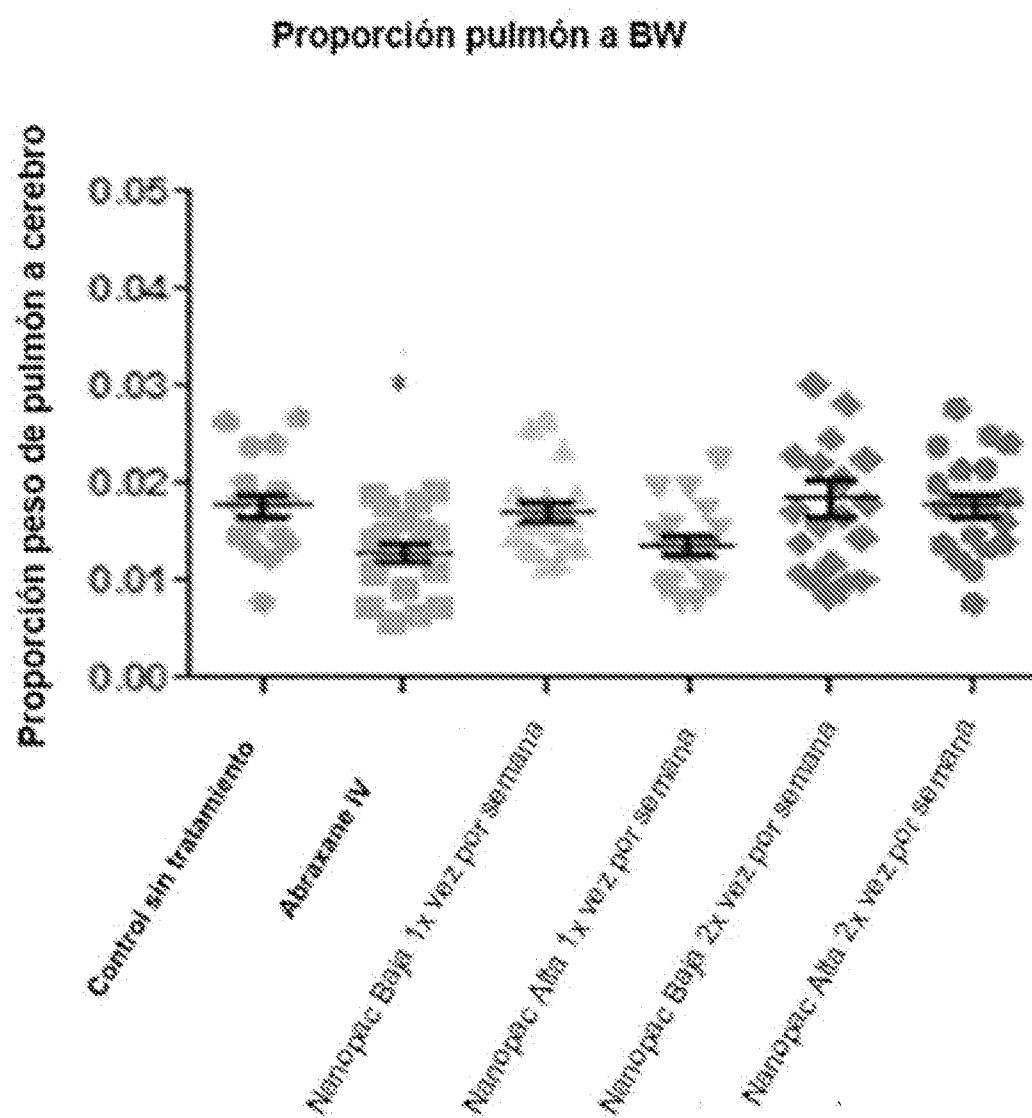


FIGURA 10



* Indica $P > 0.05$ y ** indica $P > 0.01$

FIGURA 11

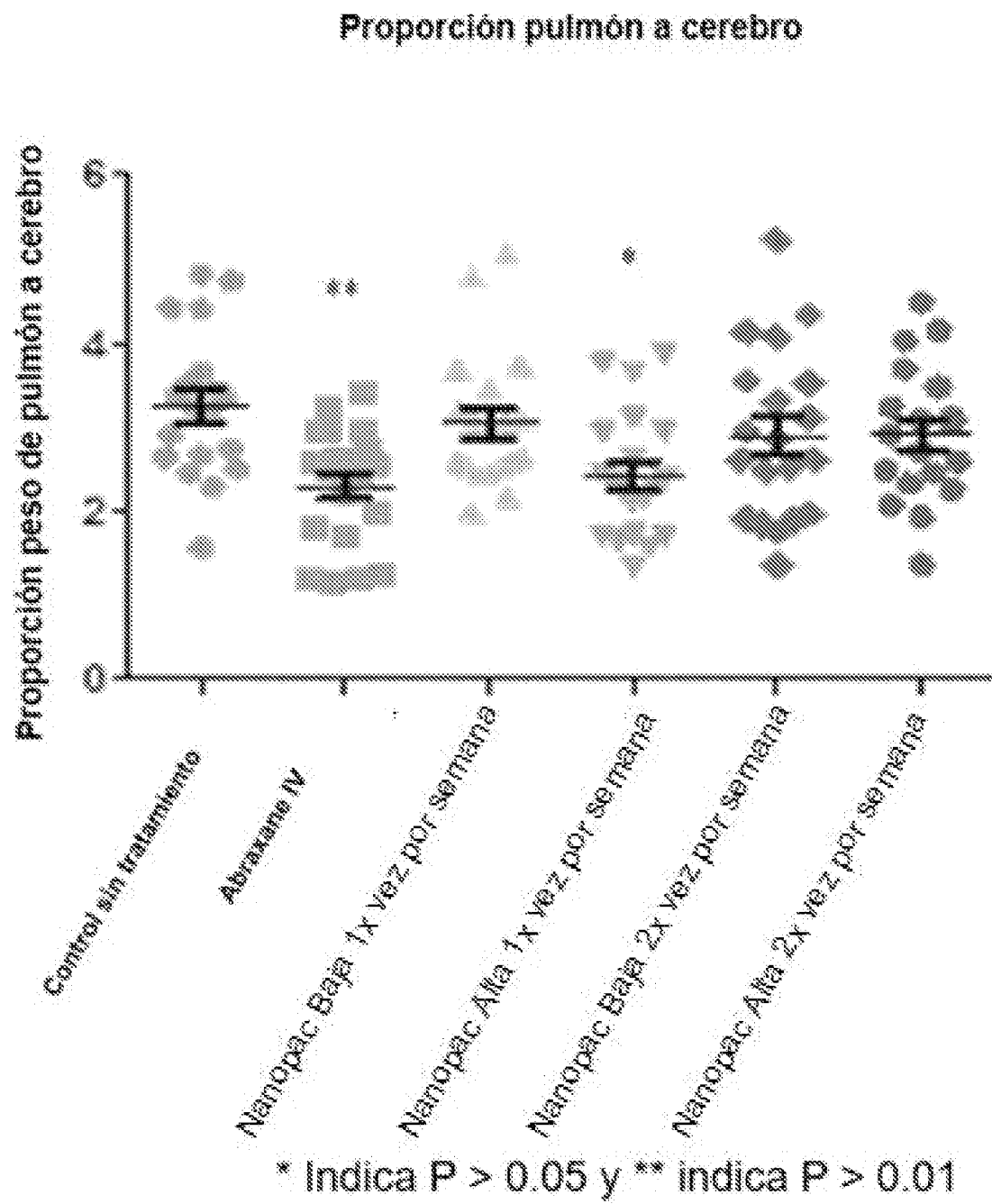


FIGURA 12

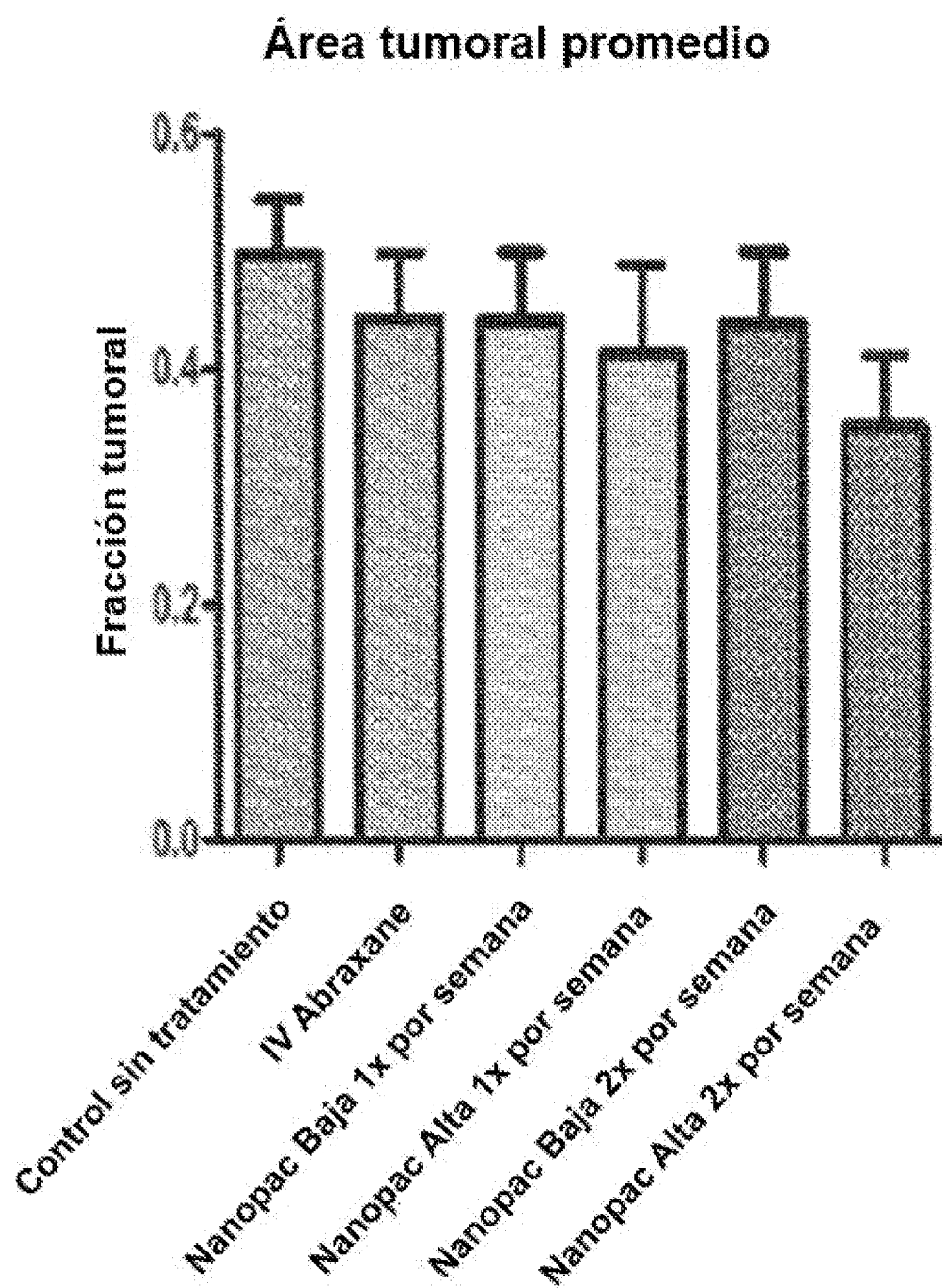


FIGURA 13

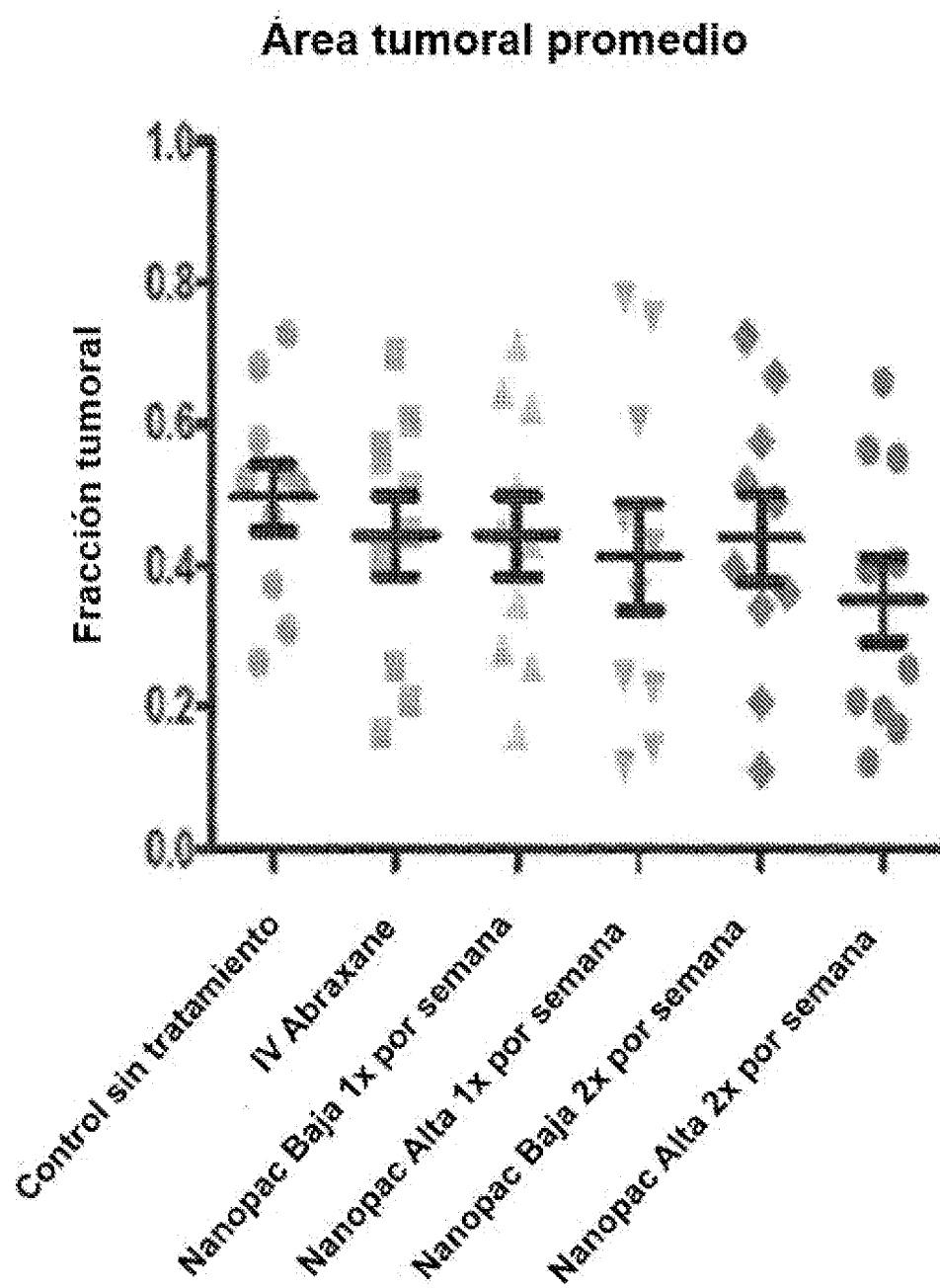


FIGURA 14

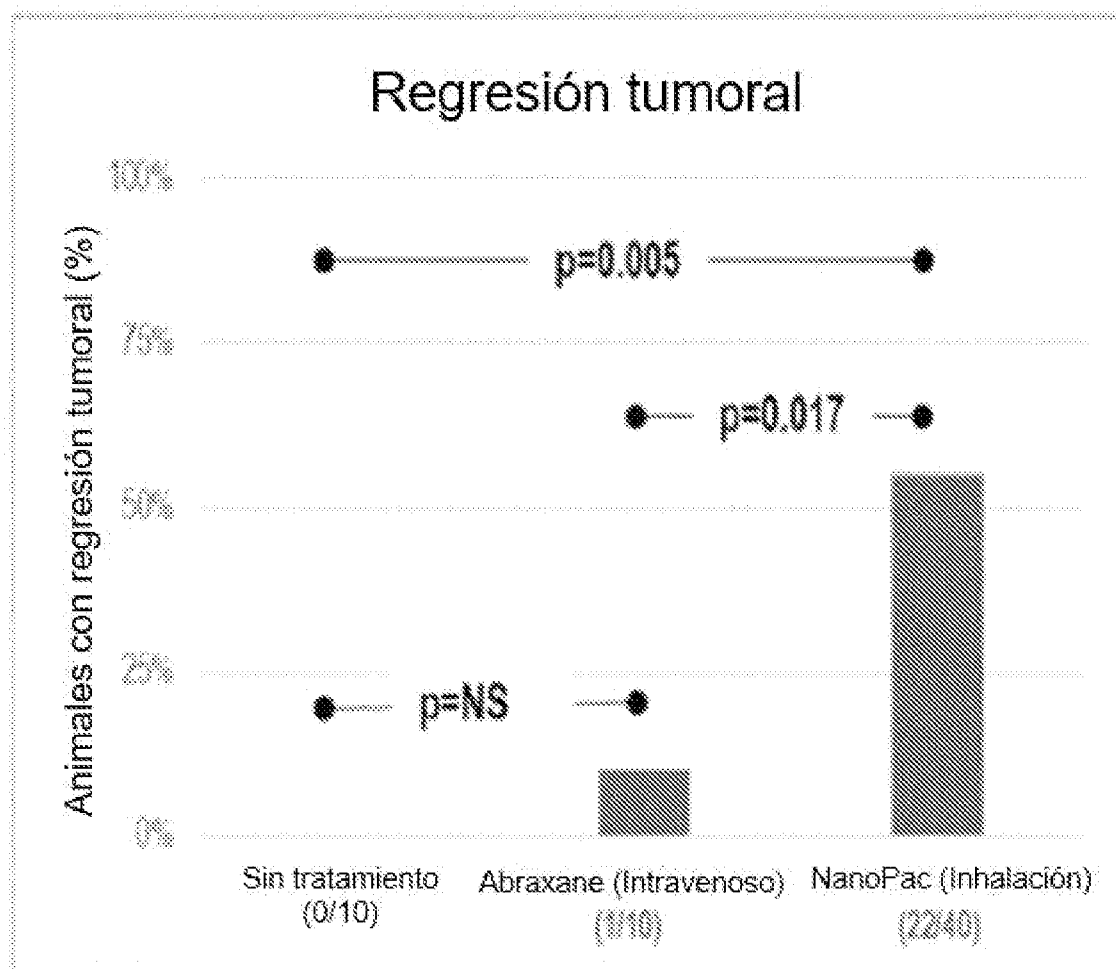


FIGURA 15

**1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0.
Características primarias de las masas tumorales pulmonares. (2x)**

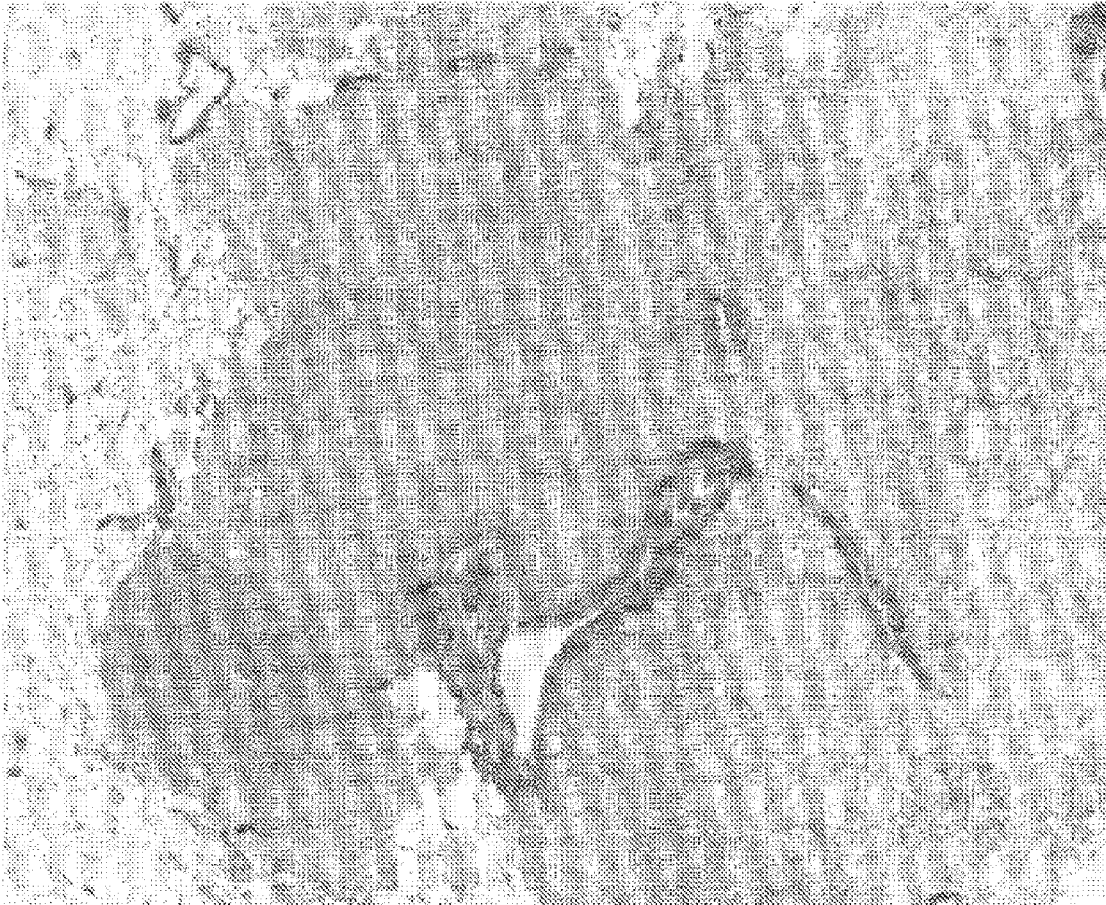


FIGURA 16

**1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0.
Características primarias de las células indiferenciadas dentro de las
masas tumorales pulmonares.**

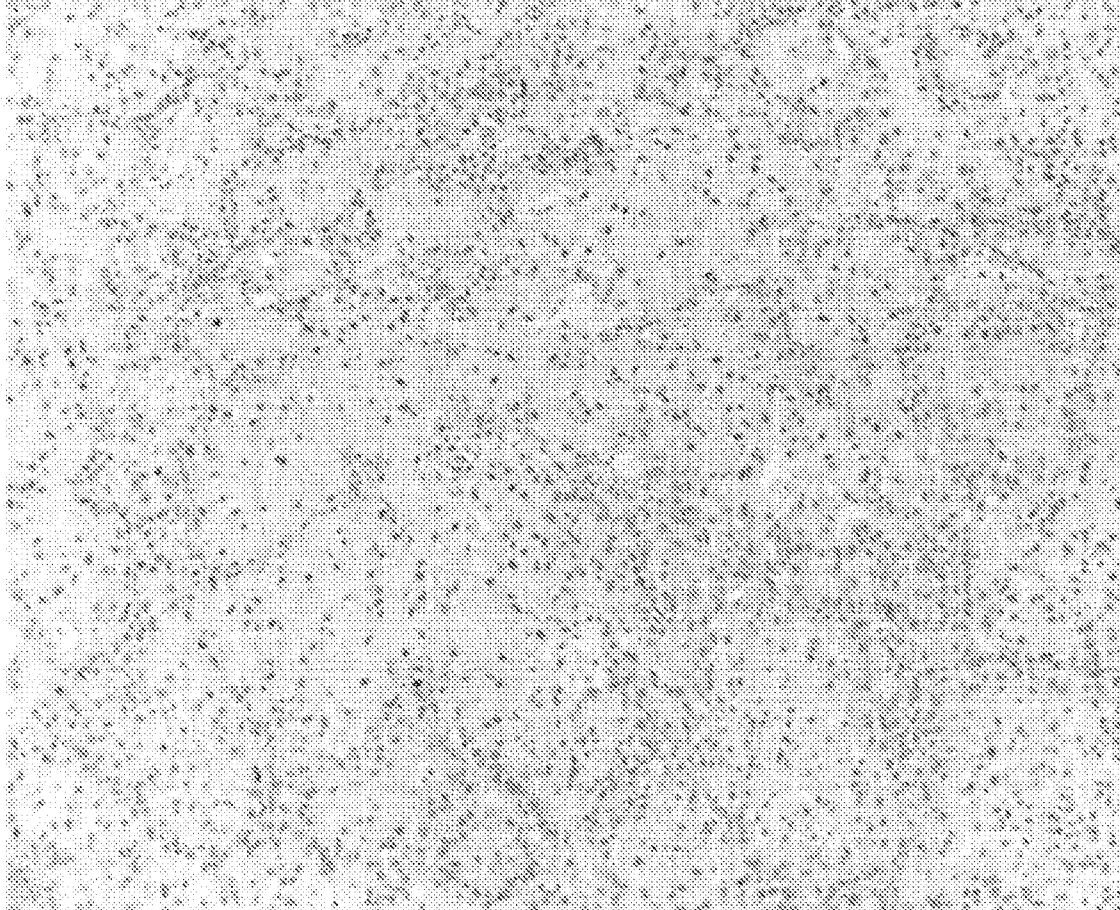


FIGURA 17

**1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0.
Características primarias de las células indiferenciadas dentro de las
masas tumorales pulmonares.**

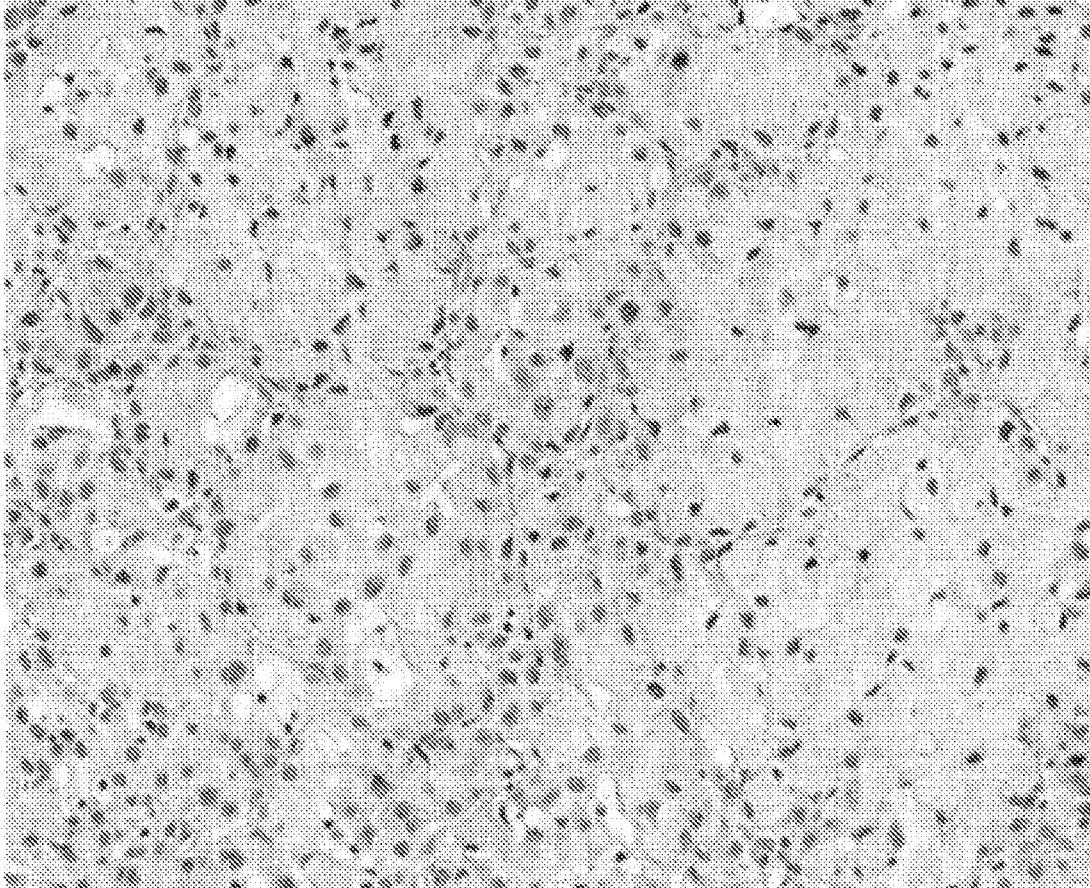


FIGURA 18

1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las células indiferenciadas dentro de las masas tumorales pulmonares que muestran masas dentro de los espacios alveolares. a(20x)

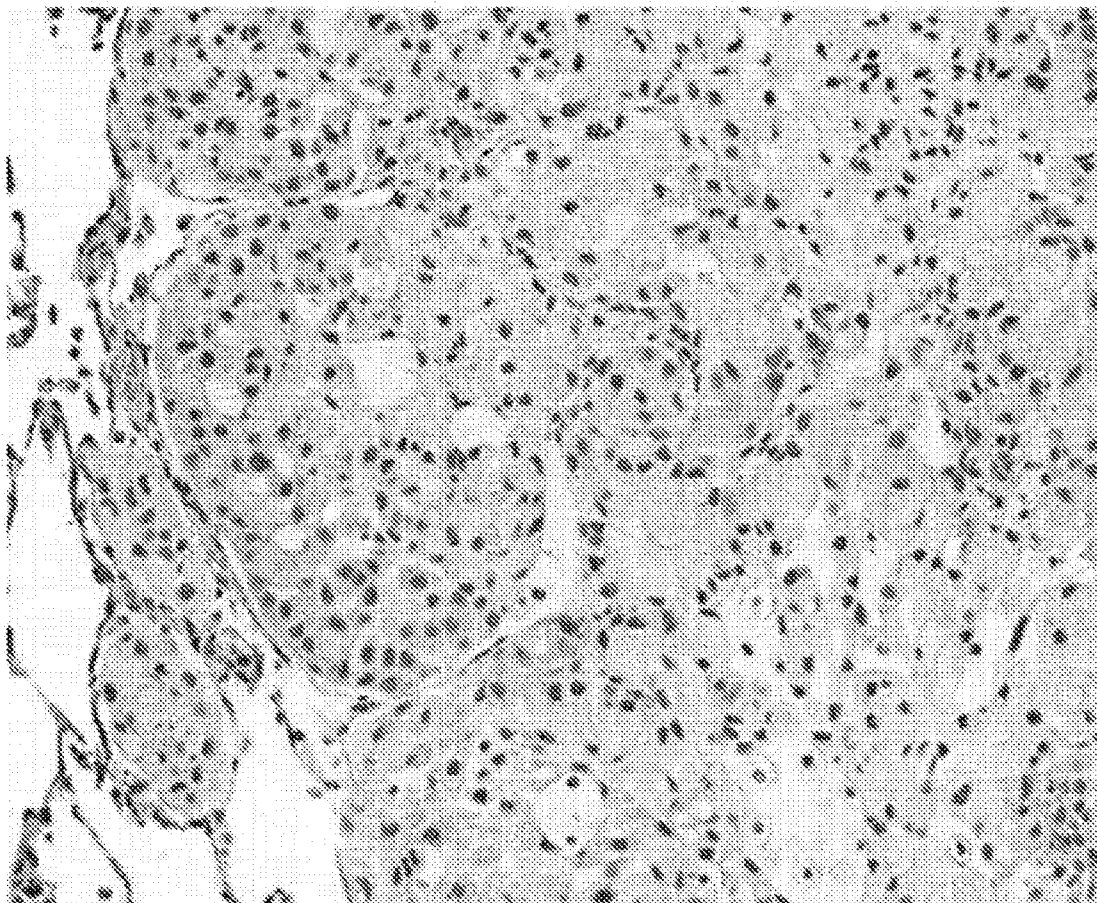


FIGURA 19

1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las células primitivas dentro de las masas tumorales pulmonares. b(10x)

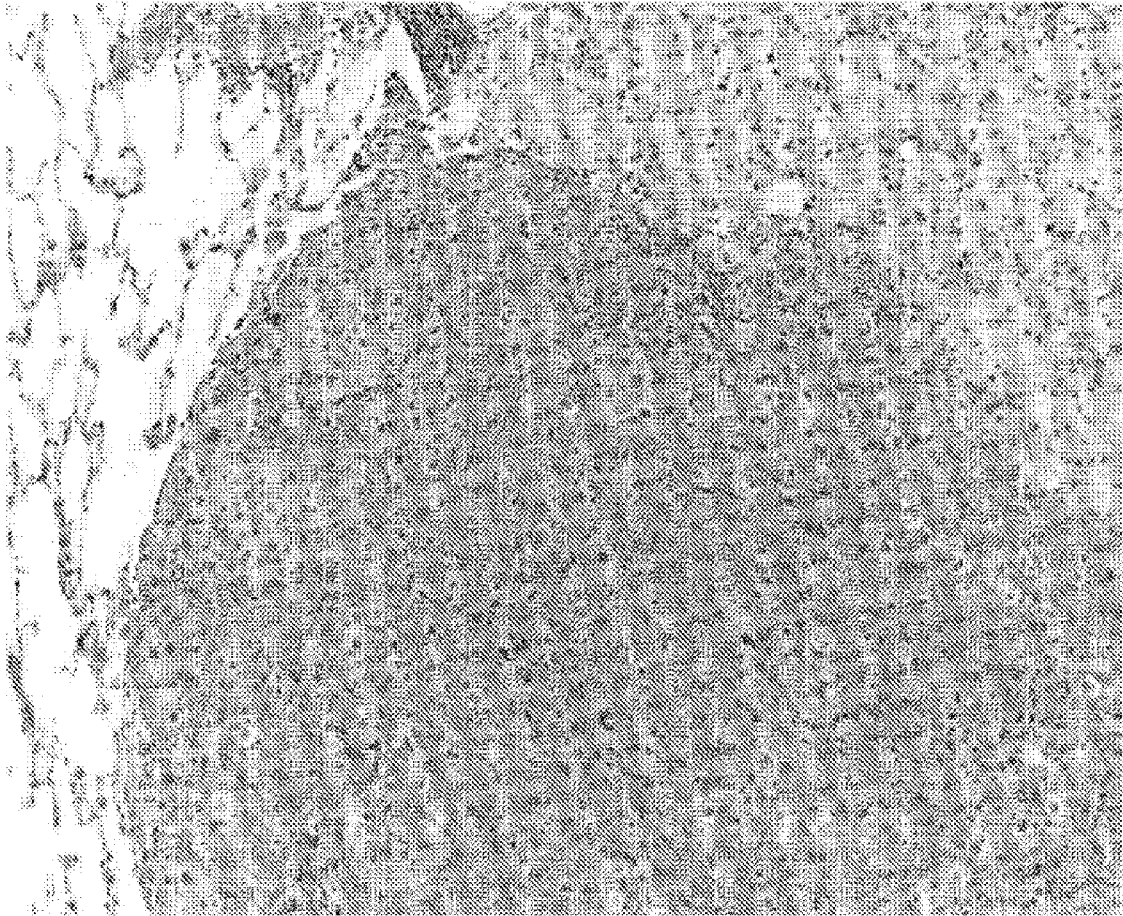


FIGURA 20

1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las células primitivas dentro de las masas tumorales pulmonares. b(20x)

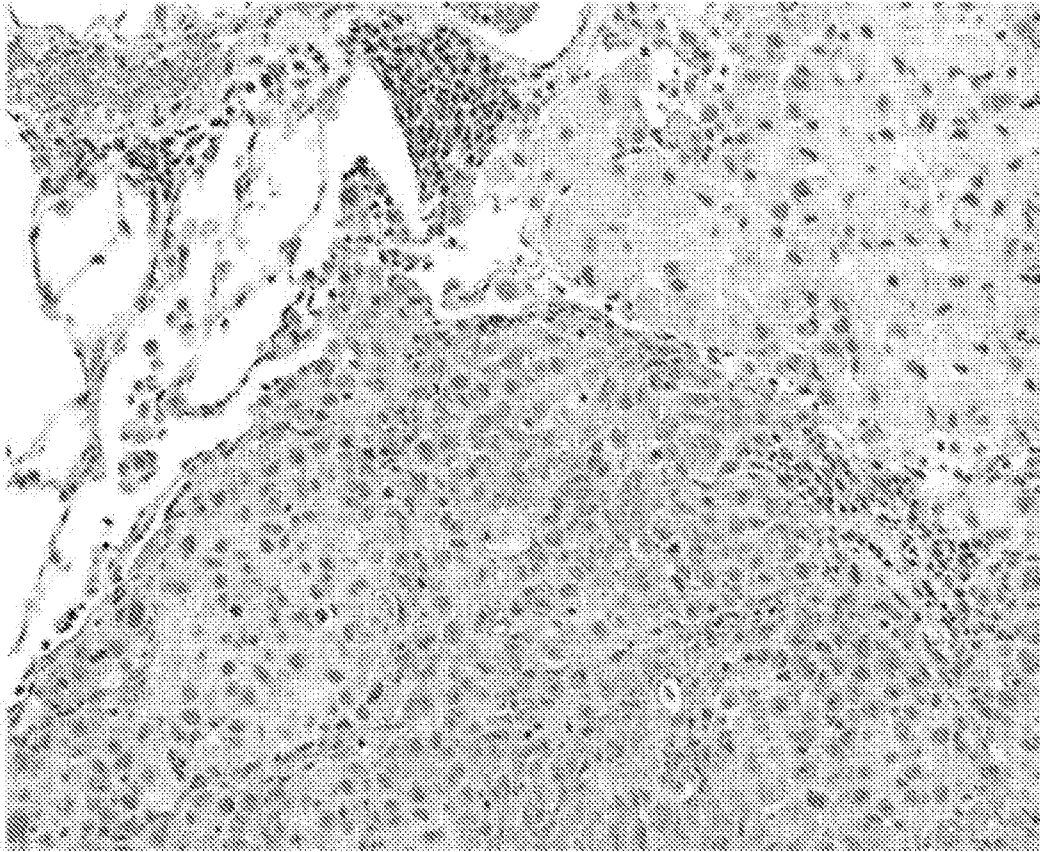


FIGURA 21

1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de las células primitivas dentro de las masas tumorales pulmonares. b(40x)

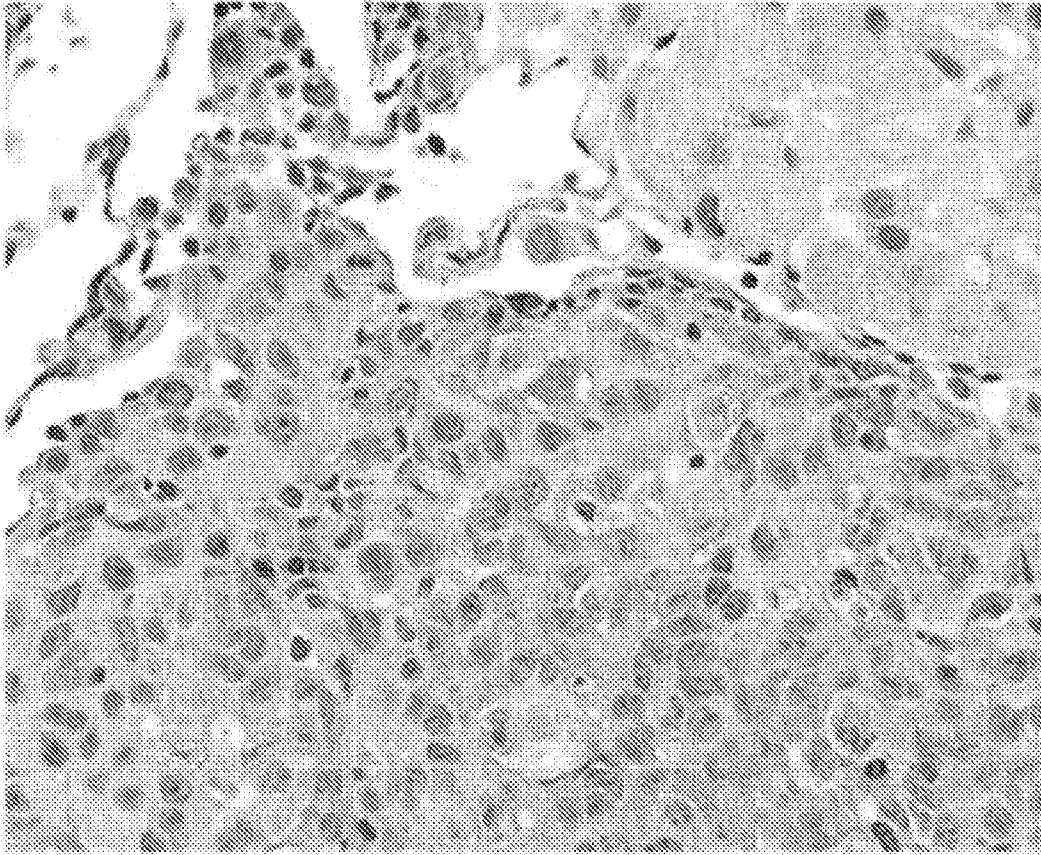


FIGURA 22

1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0 bronquiolo. Características primarias de las células indiferenciadas que se muestran dentro del bronquiolo. c(10x)

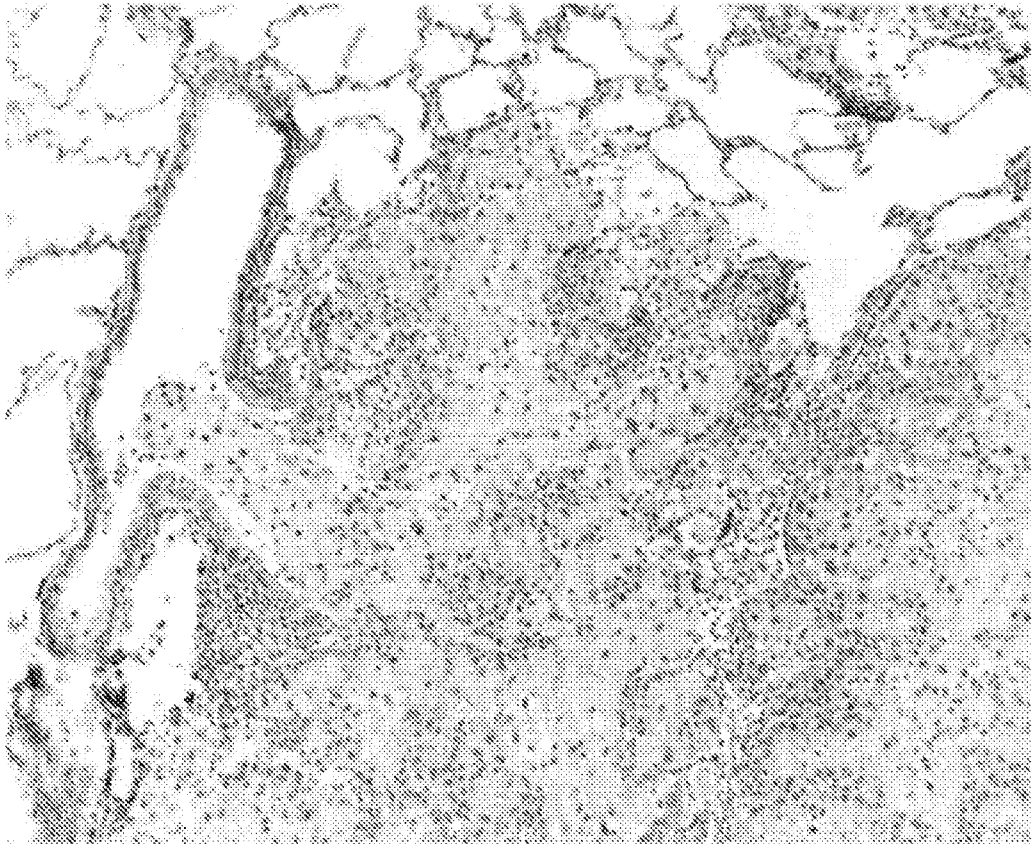


FIGURA 23

1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0 bronquiolo. Características primarias de células indiferenciadas que se muestran dentro del bronquiolo. c(20x)

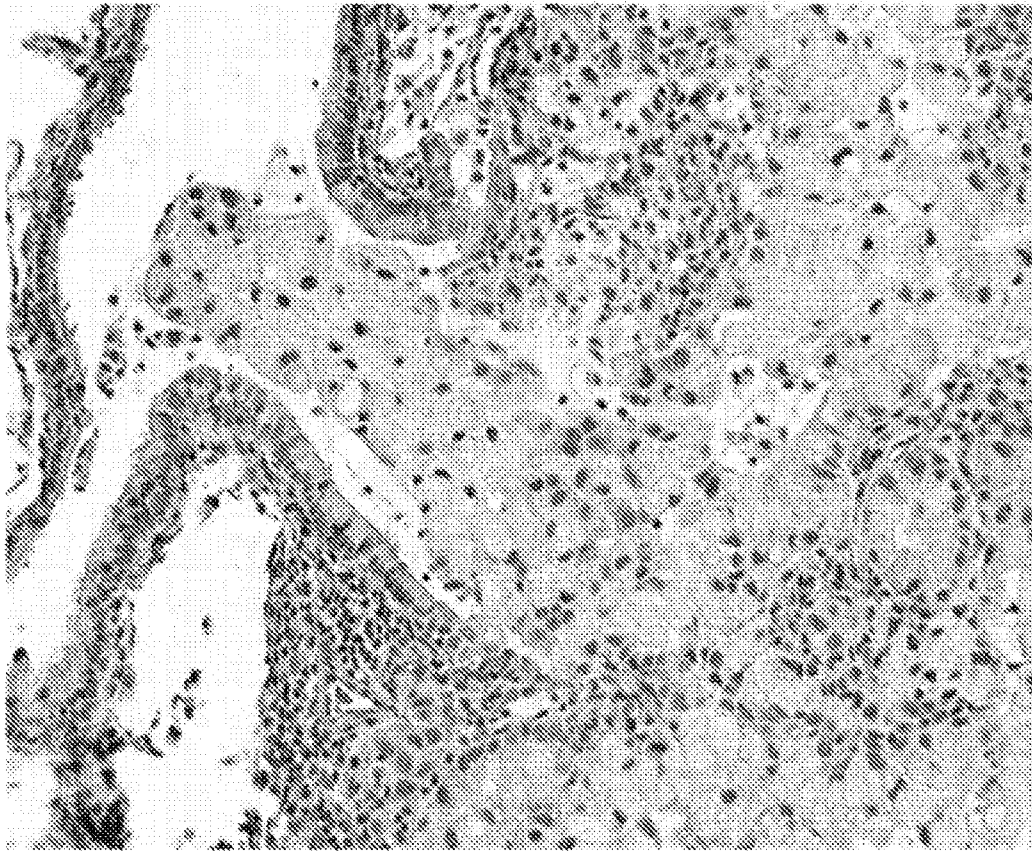


FIGURA 24

**1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0 glándulas.
Características primarias de la diferenciación de las glándulas acinares
dentro de las masas tumorales pulmonares. d(10x)**

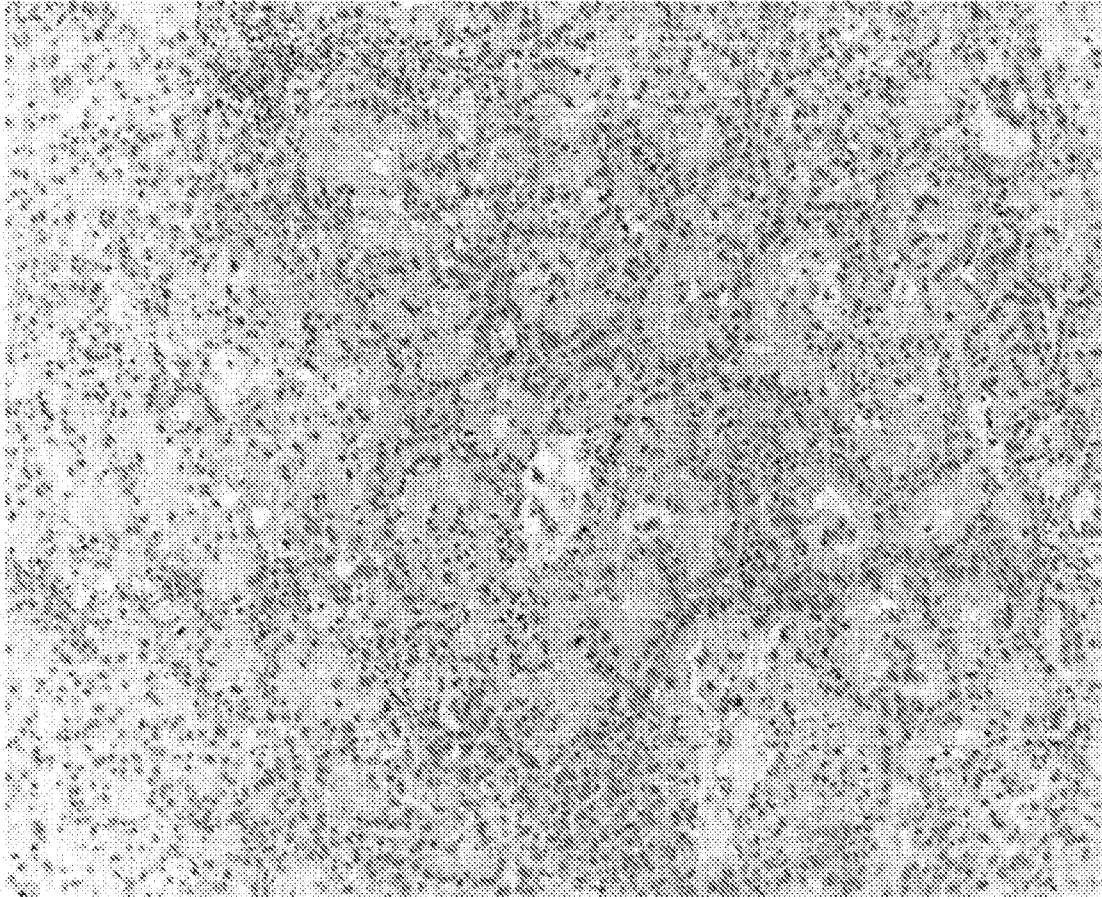


FIGURA 25

**1006 (Control) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0 glándulas.
Características primarias de la diferenciación de las glándulas acinares dentro
de las masas tumorales pulmonares. d(20x)**

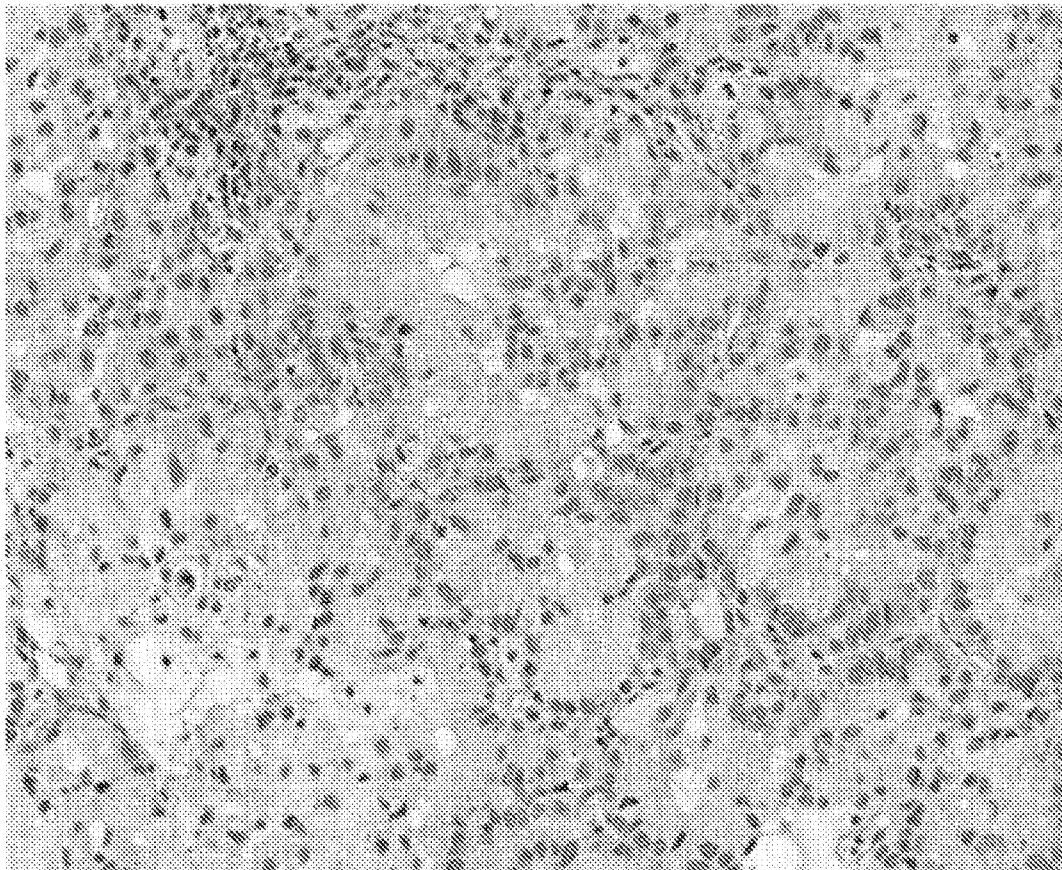


FIGURA 26

2001 (IV Abraxane) Adenocarcinoma-2, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de la masa tumoral pulmonar que empuja por debajo de un bronquiolo y no muestra evidencia de invasión intravascular. (2x)

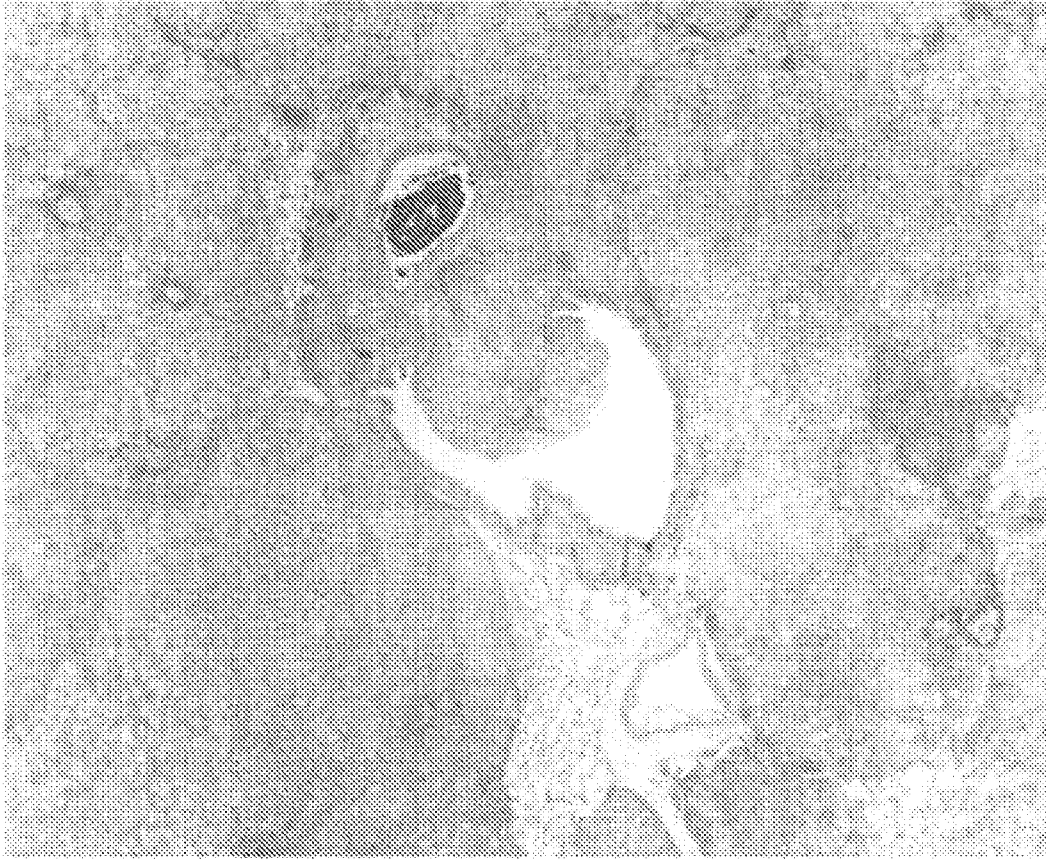


FIGURA 27

2001 (IV Abraxane) Adenocarcinoma-2, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de la masa tumoral pulmonar que empuja por debajo de un bronquiolo y no muestra evidencia de invasión intravascular. (4x)



FIGURA 28

2001 (IV Abraxane) Adenocarcinoma-2, Primitivo-1, Regresión-0. Características primarias de la masa tumoral pulmonar que empuja por debajo de un bronquiolo. (10x)

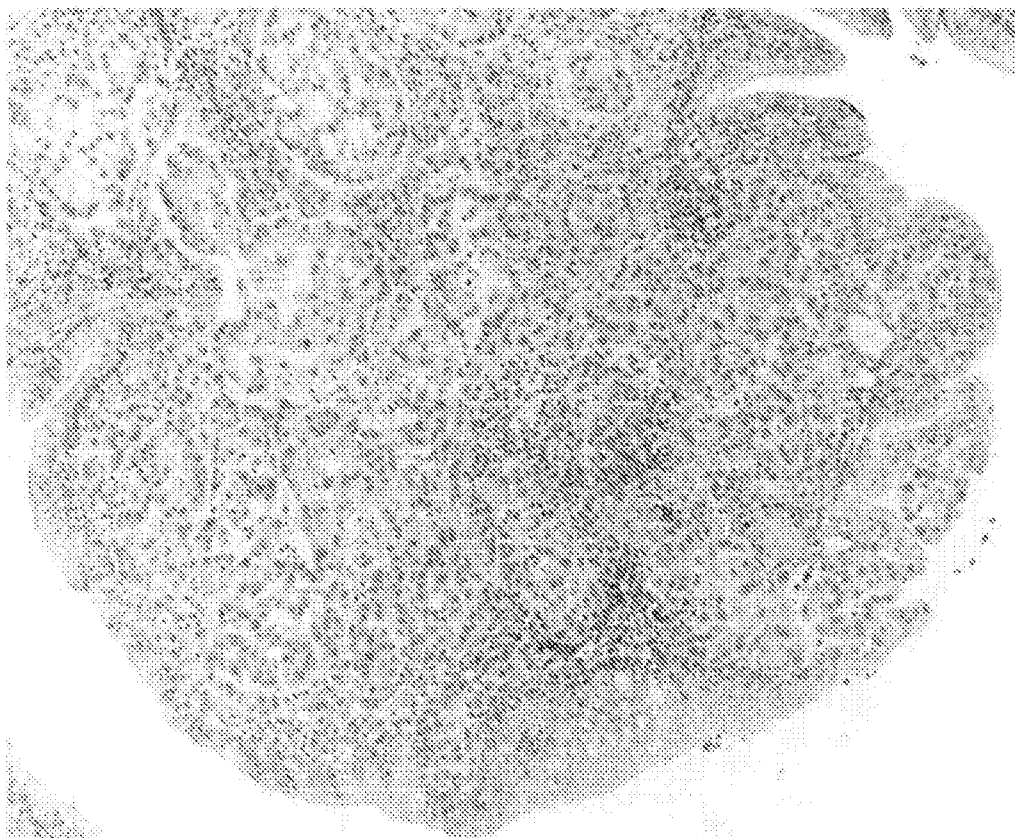


FIGURA 29

**2003 (IV Abraxane) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1.
Características de las masas tumorales pulmonares en regresión. (4x)**

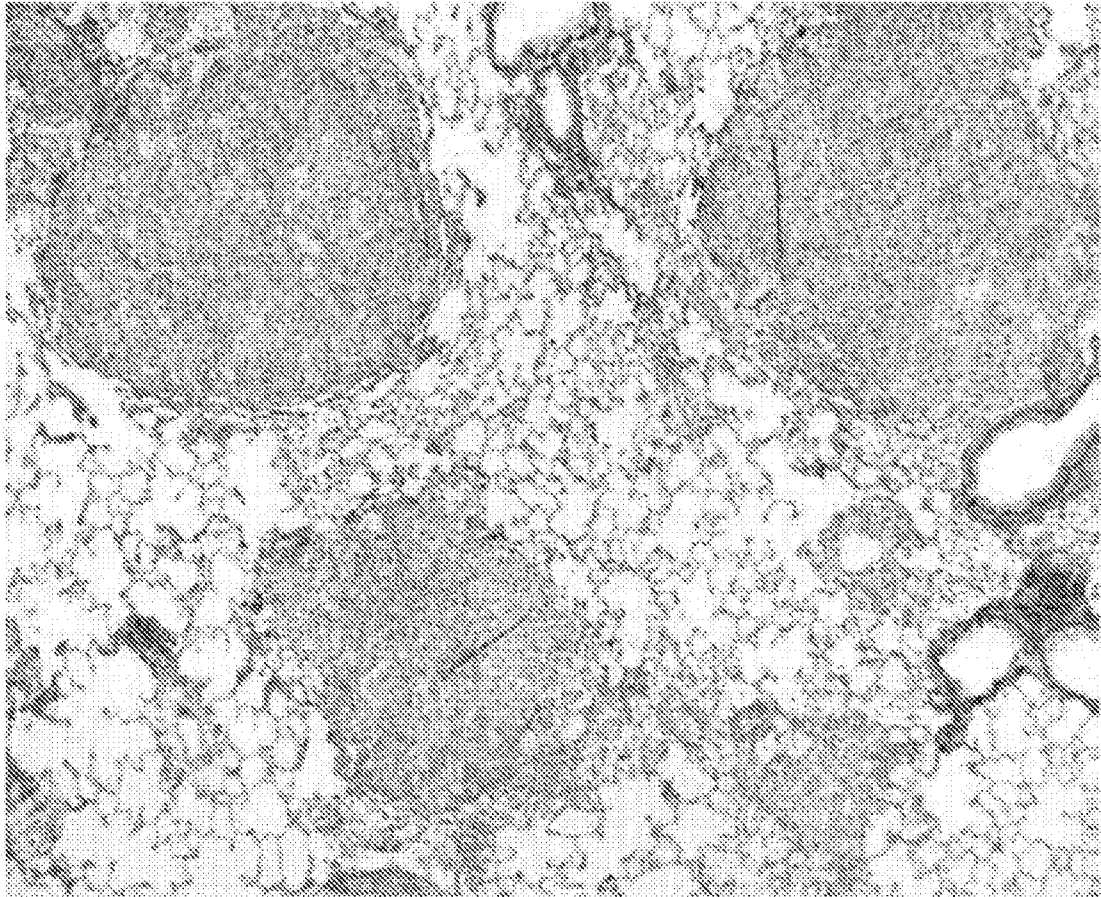


FIGURA 30

**2003 (IV Abraxane) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1.
Características de las masas tumorales pulmonares en regresión. (10x)**

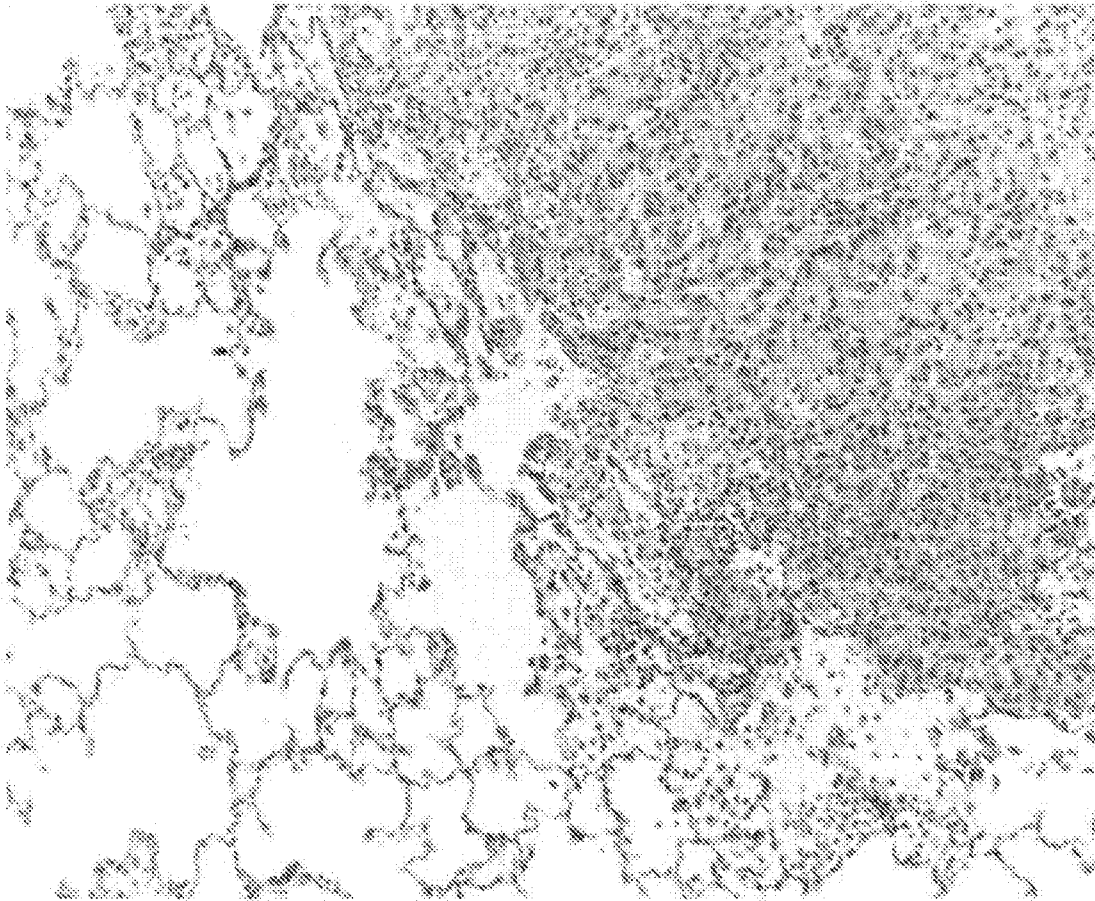


FIGURA 31

2003 (IV Abraxane) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1.
Características de las masas tumorales pulmonares en regresión. (20x)

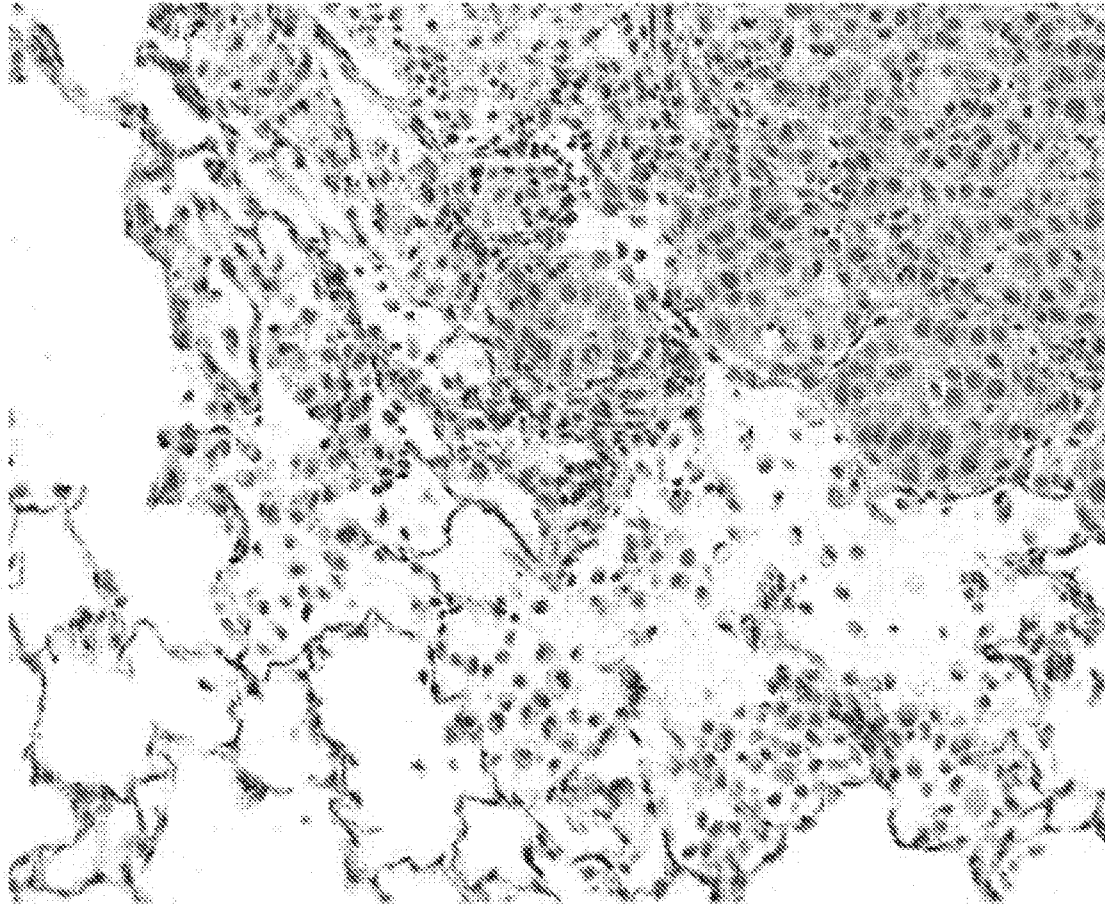


FIGURA 32

2003 (IV Abraxane) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1.
Características de las masas tumorales pulmonares en regresión.
Obsérvense los linfocitos y macrófagos a lo largo del borde. 1(40x)

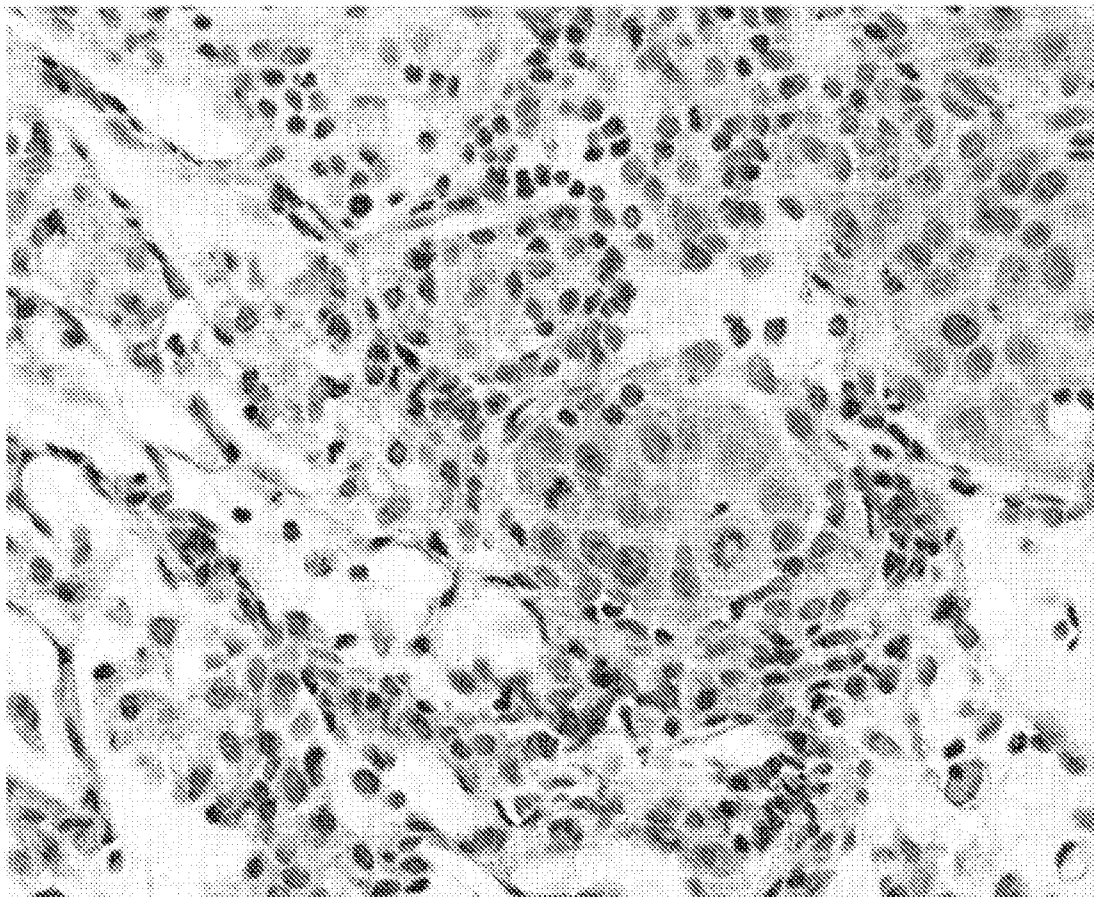


FIGURA 33

2003 (IV Abraxane) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1.
Características de las masas tumorales pulmonares en regresión.
Obsérvense los linfocitos y macrófagos a lo largo del borde. 2(40x)

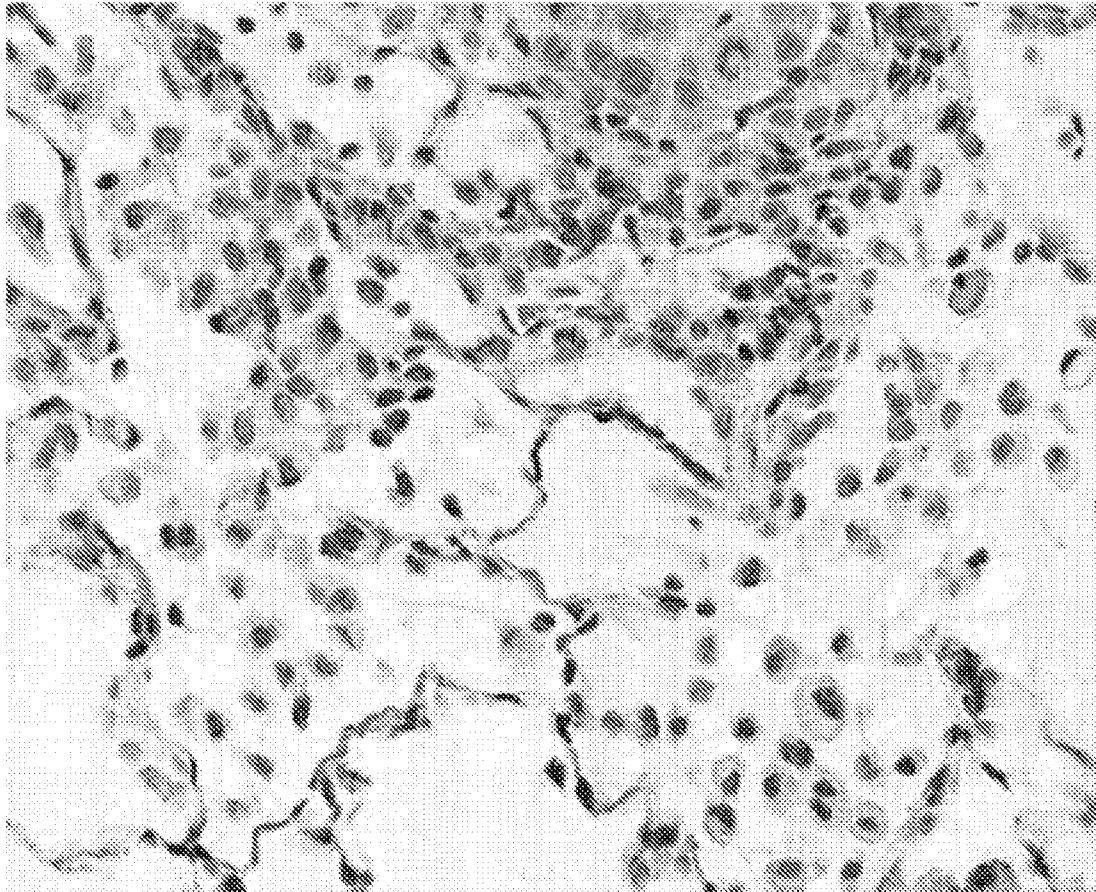


FIGURA 34

2003 (IV Abraxane) Adenocarcinoma-1, Primitivo-1, Regresión-1.
Características de las masas tumorales pulmonares en regresión. Obsérvese
los macrófagos más grandes, espumosos y pigmentados. 2, 2x(40x).

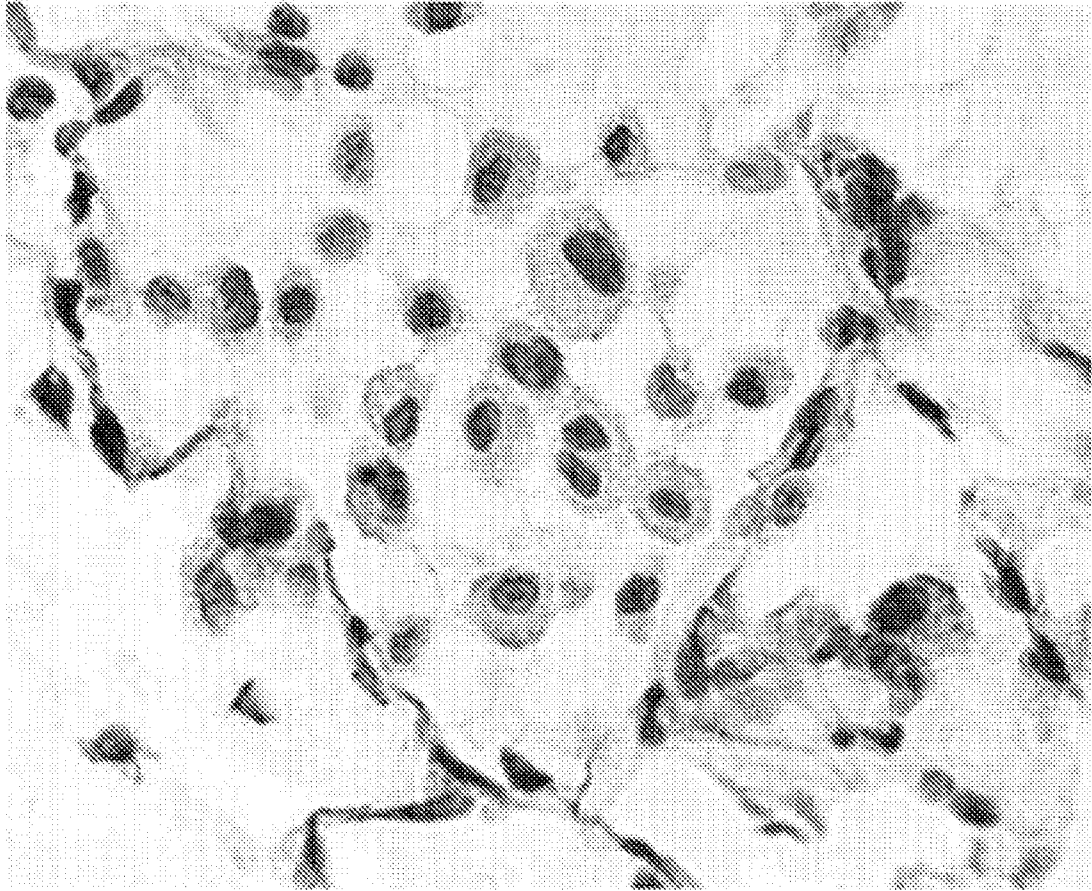


FIGURA 35

2010 (IV Abraxane) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0.
Características primarias de las masas tumorales pulmonares. (2x)

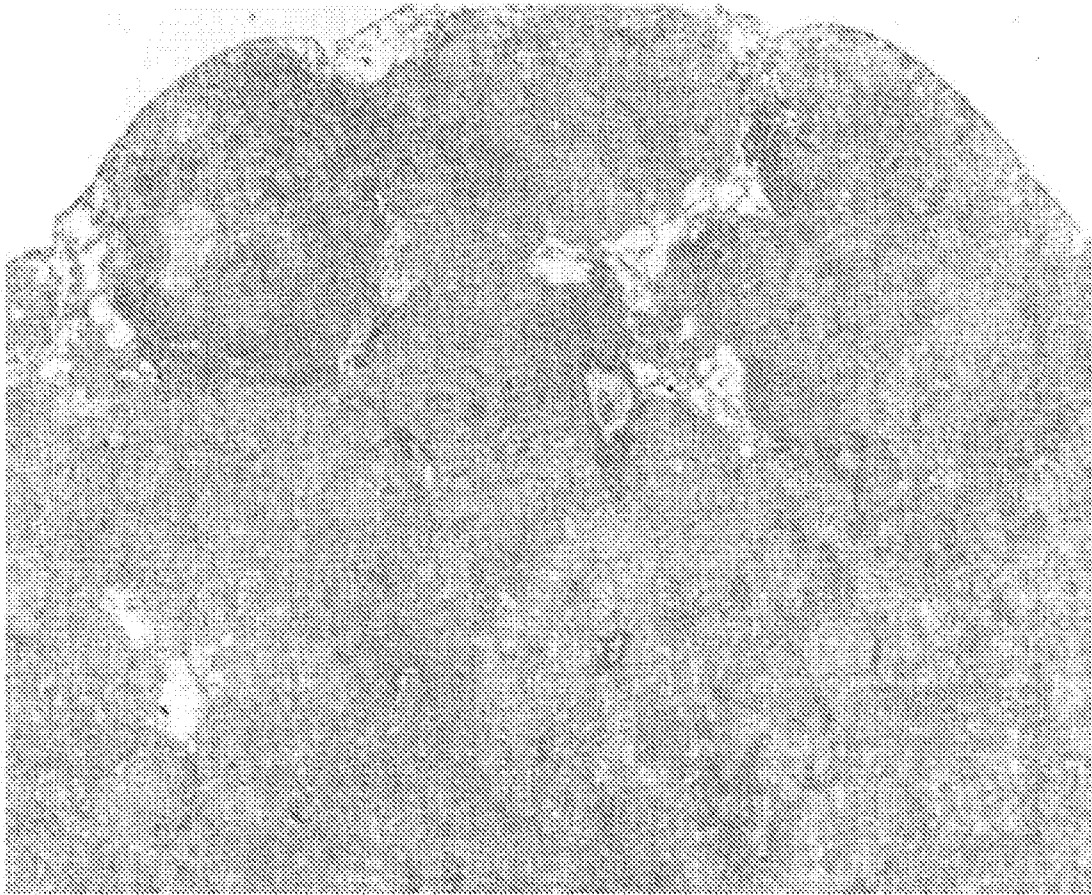


FIGURA 36

**2010 (IV Abraxane) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0.
Características primarias de las masas tumorales pulmonares. (20x)**

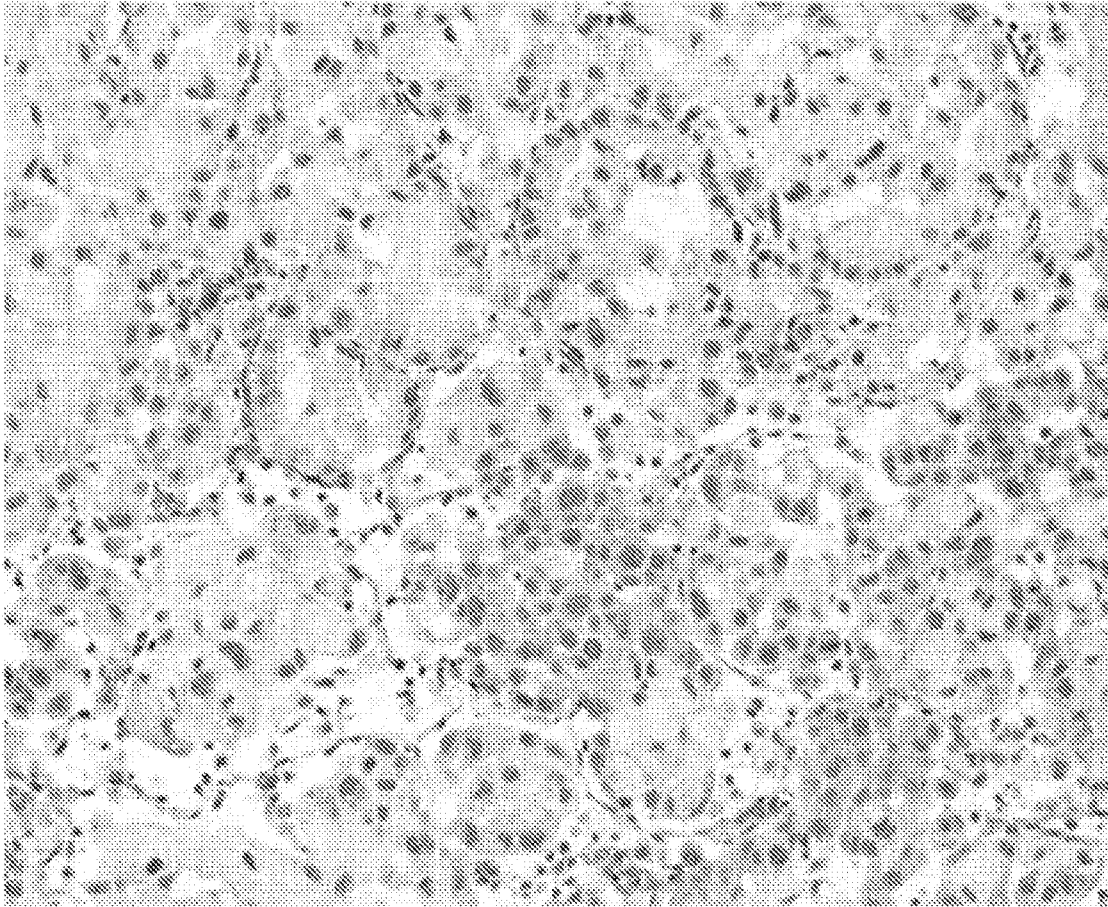


FIGURA 37

2010 (IV Abraxane) Adenocarcinoma-3, Primitivo-1, Regresión-0.
Características primarias de las masas tumorales pulmonares.
Obsérvese la evidencia sutil de macrófagos a lo largo del borde. (40x)

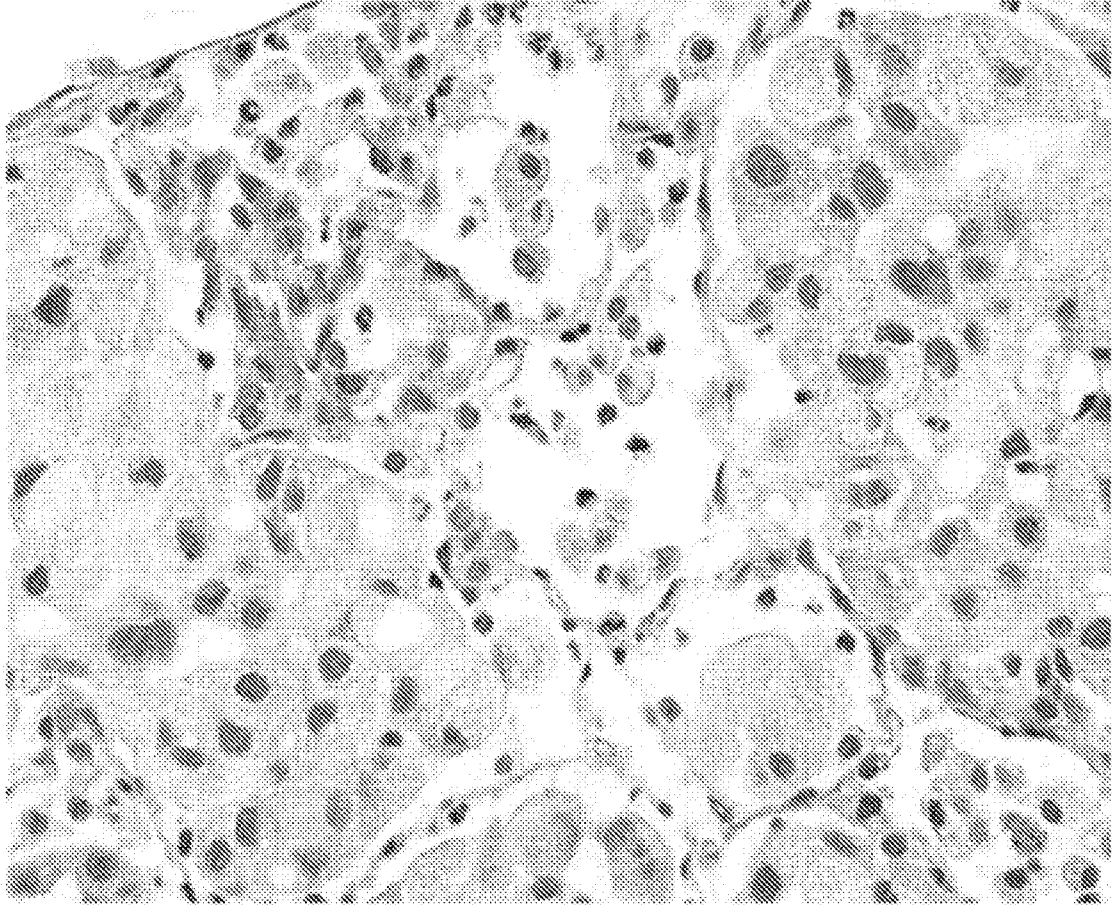


FIGURA 38

**4009 (IH NanoPac 1x Alta) Adenocarcinoma-0. Primitivo-0. Regresión-4.
Características de las masas tumorales pulmonares que han experimentado
una regresión completa. (2x)**

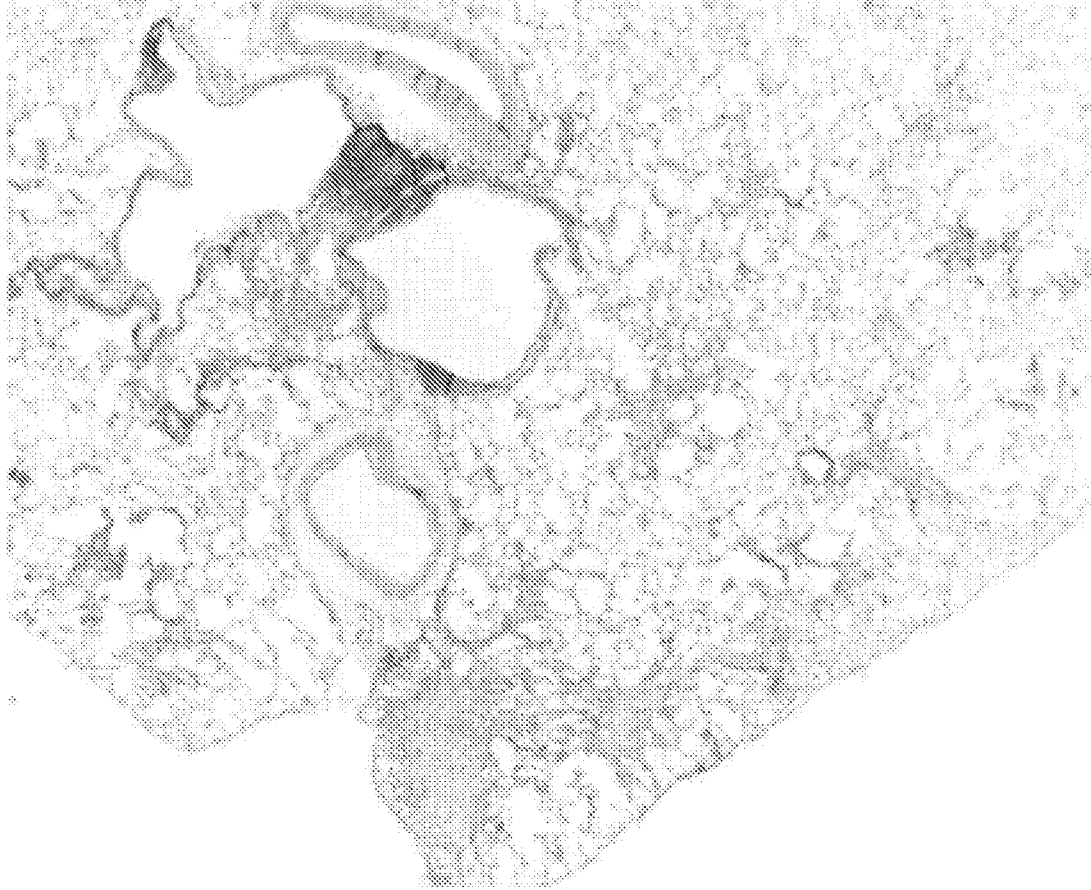


FIGURA 39

4009 (IH NanoPac 1x Alta) Adenocarcinoma-0. Primitivo-0. Regresión-4.
Características de las masas tumorales pulmonares que han experimentado
una regresión completa. Obsérvese la fibrosis del estroma. (10x)

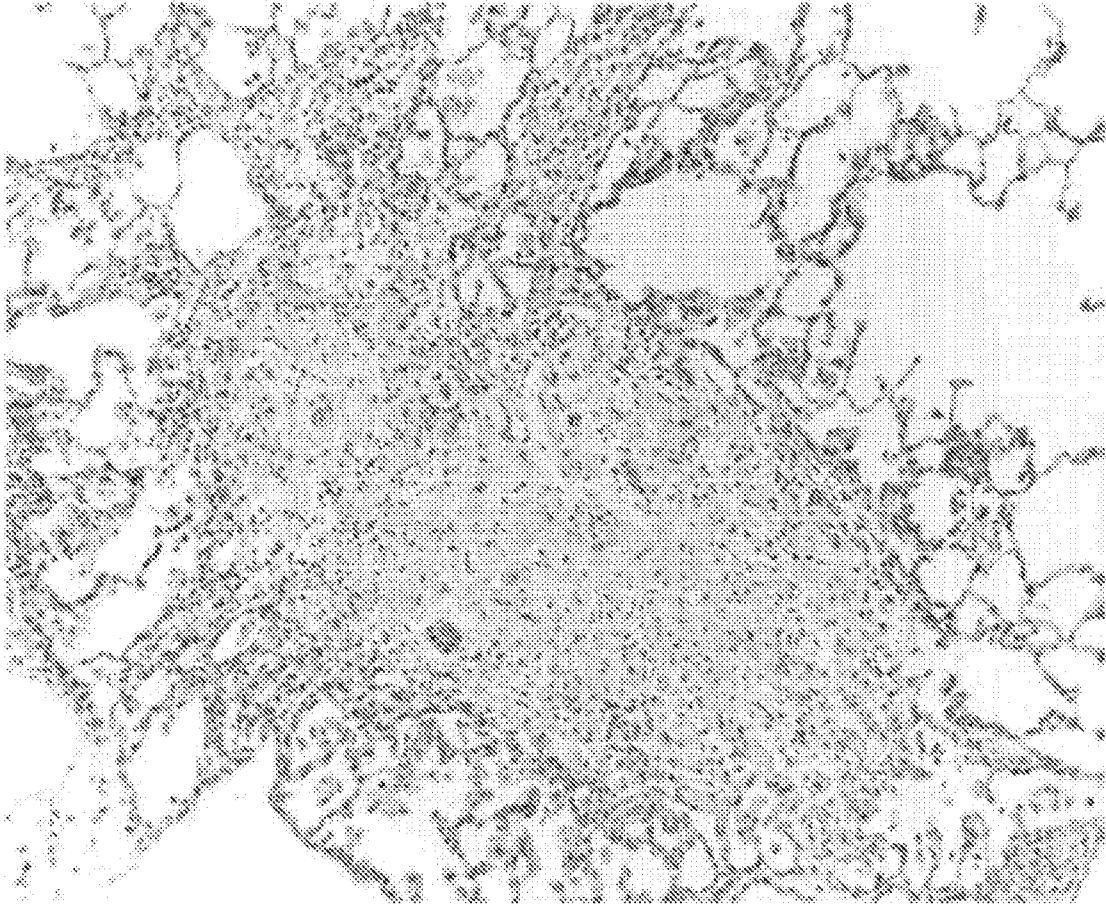


FIGURA 40

4009 (IH NanoPac 1x Alta) Adenocarcinoma-0. Primitivo-0. Regresión-4. Características de la masa tumoral pulmonar que ha experimentado una regresión completa. Obsérvese la fibrosis del estroma y los linfocitos y macrófagos a lo largo del borde. (40x)

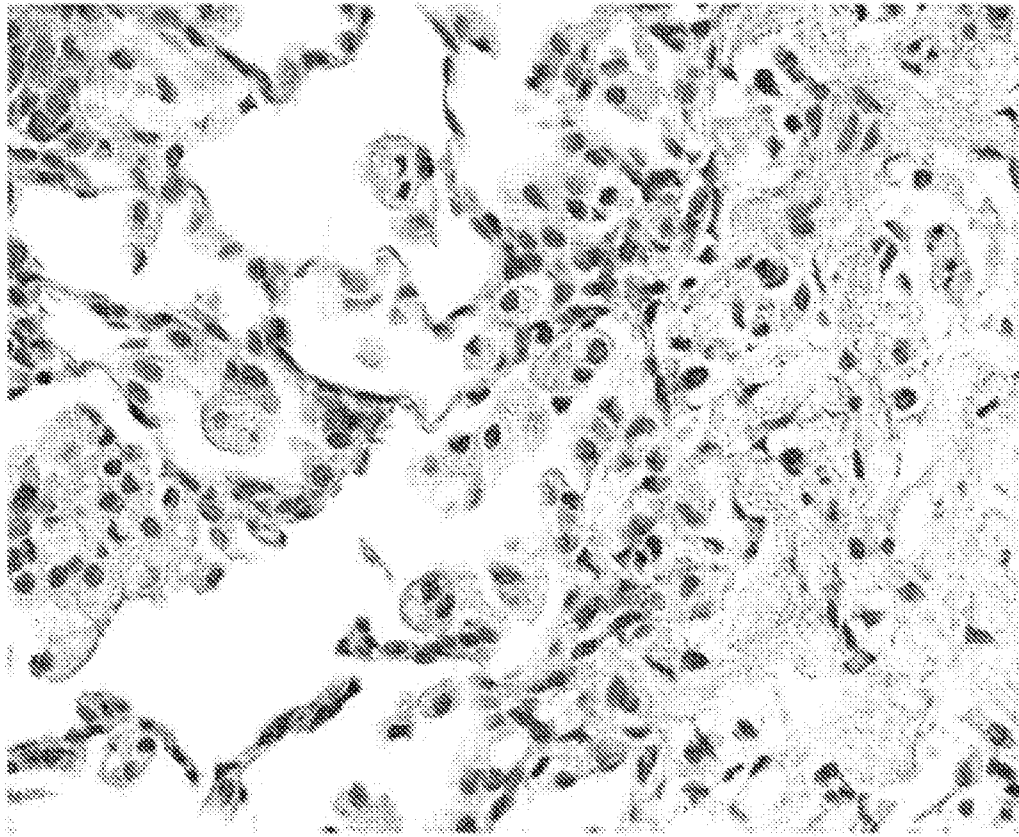


FIGURA 41

5010 (IH NanoPac 2x Baja) Adenocarcinoma-1. Primitivo-0. Regresión-3.
Características de las masas tumorales pulmonares en regresión. (2x)

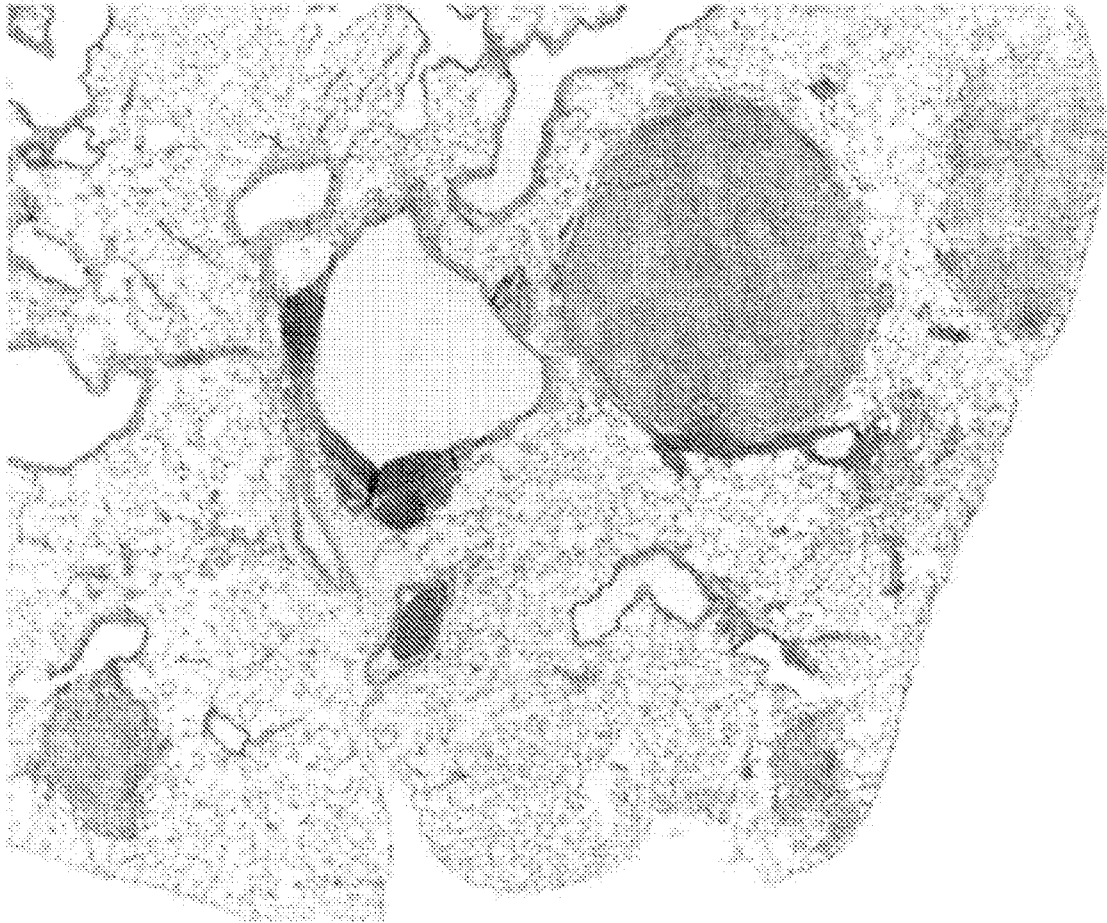


FIGURA 42

5010 (IH NanoPac 2x Baja) Adenocarcinoma-1. Primitivo-0. Regresión-3.
Características de una masa tumoral pulmonar que está en regresión. (10x)

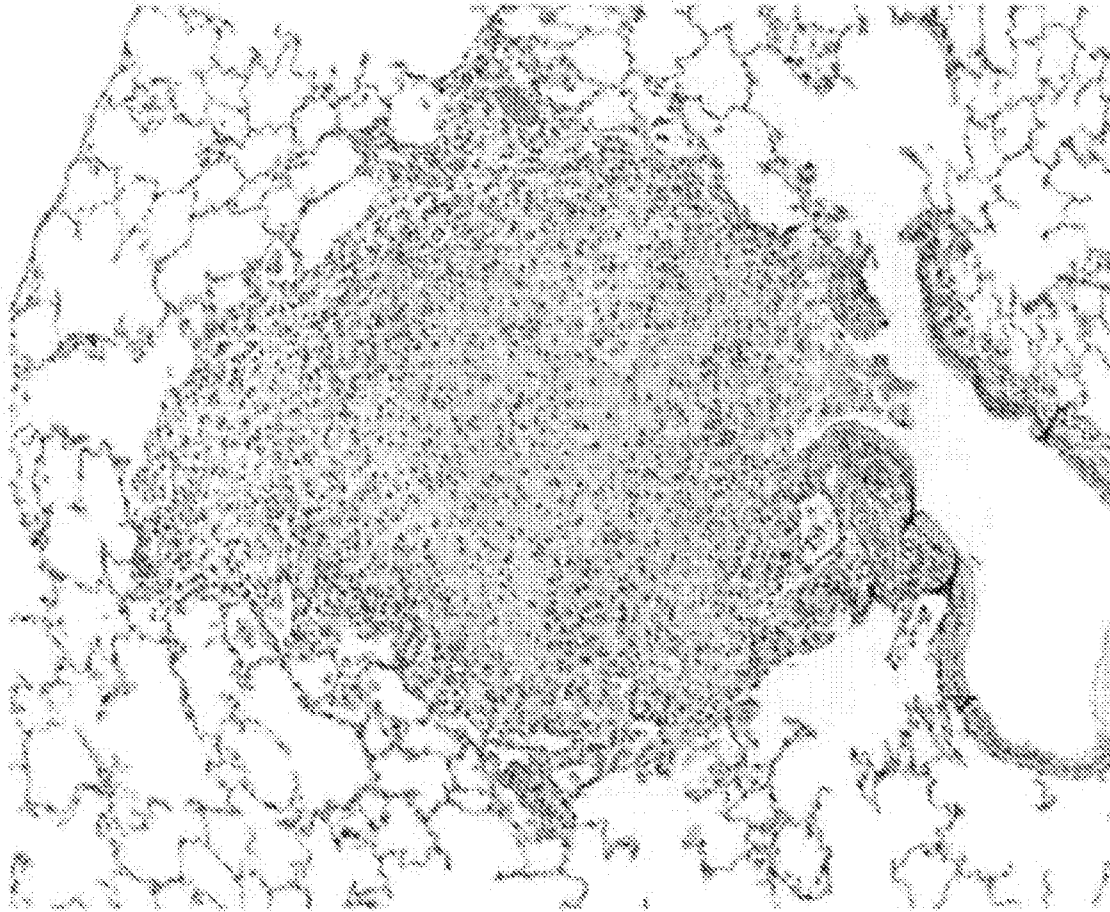


FIGURA 43

5010 (IH NanoPac 2x Baja) Adenocarcinoma-1. Primitivo-0. Regresión-3.
Características de una masa tumoral pulmonar que está en regresión. (20x)

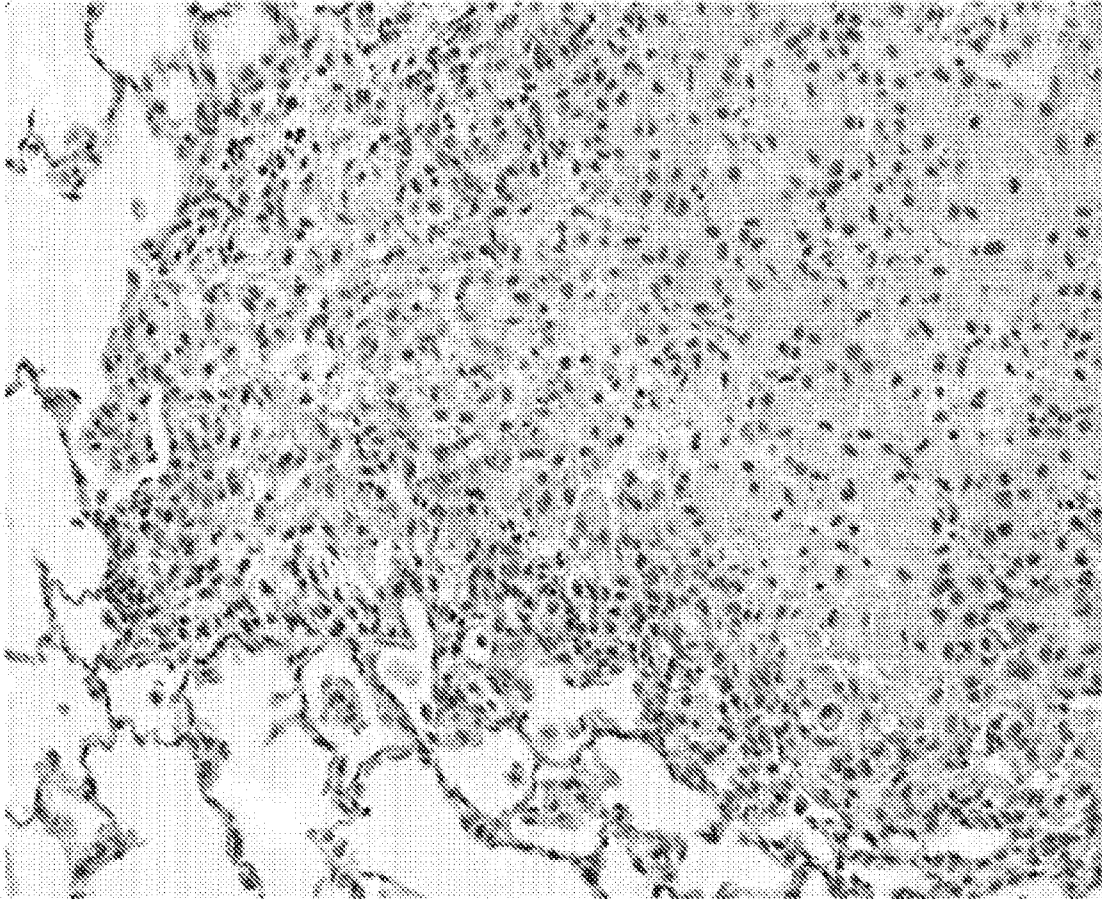


FIGURA 44

5010 (IH NanoPac 2x Baja) Adenocarcinoma-1. Primitivo-0. Regresión-3.
Características de una masa tumoral pulmonar que está en regresión. (40x)

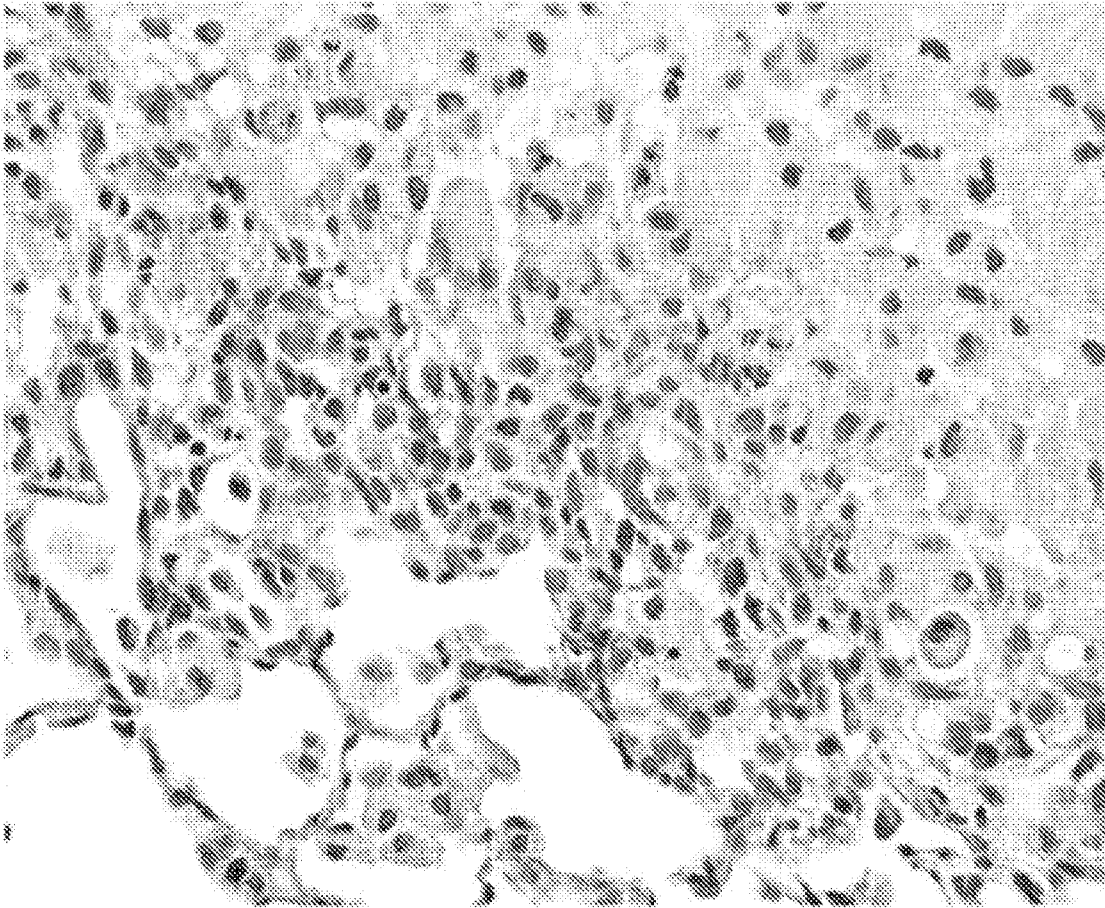


FIGURA 45

**6005 (IH NanoPac 2x Alta) Adenocarcinoma-1. Primitivo-0. Regresión-4.
Características de una masa tumoral pulmonar que está en regresión. (2x)**

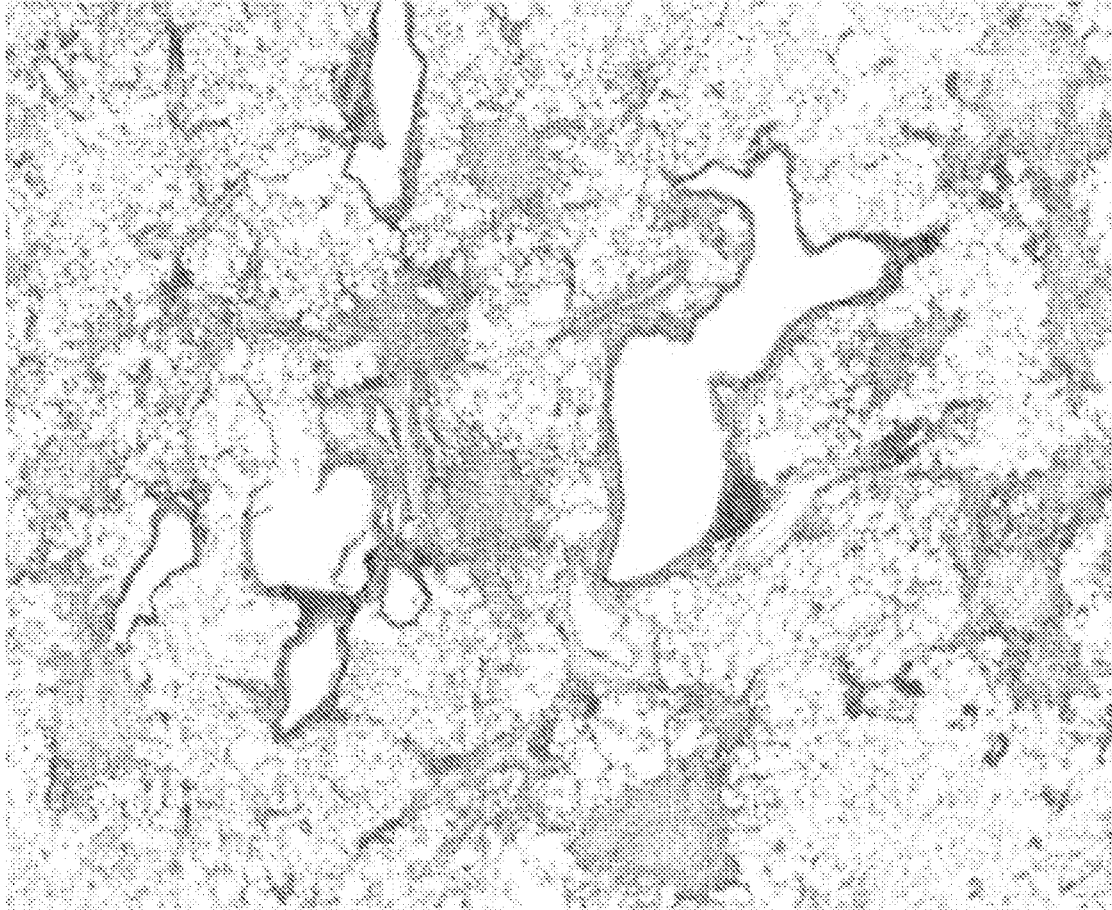


FIGURA 46

6005 (IH NanoPac 2x Alta) Adenocarcinoma-1. Primitivo-0. Regresión-4.
Características de una masa tumoral pulmonar en regresión. Obsérvense la
fibrosis estromal y los linfocitos y macrófagos a lo largo del borde. (10x)

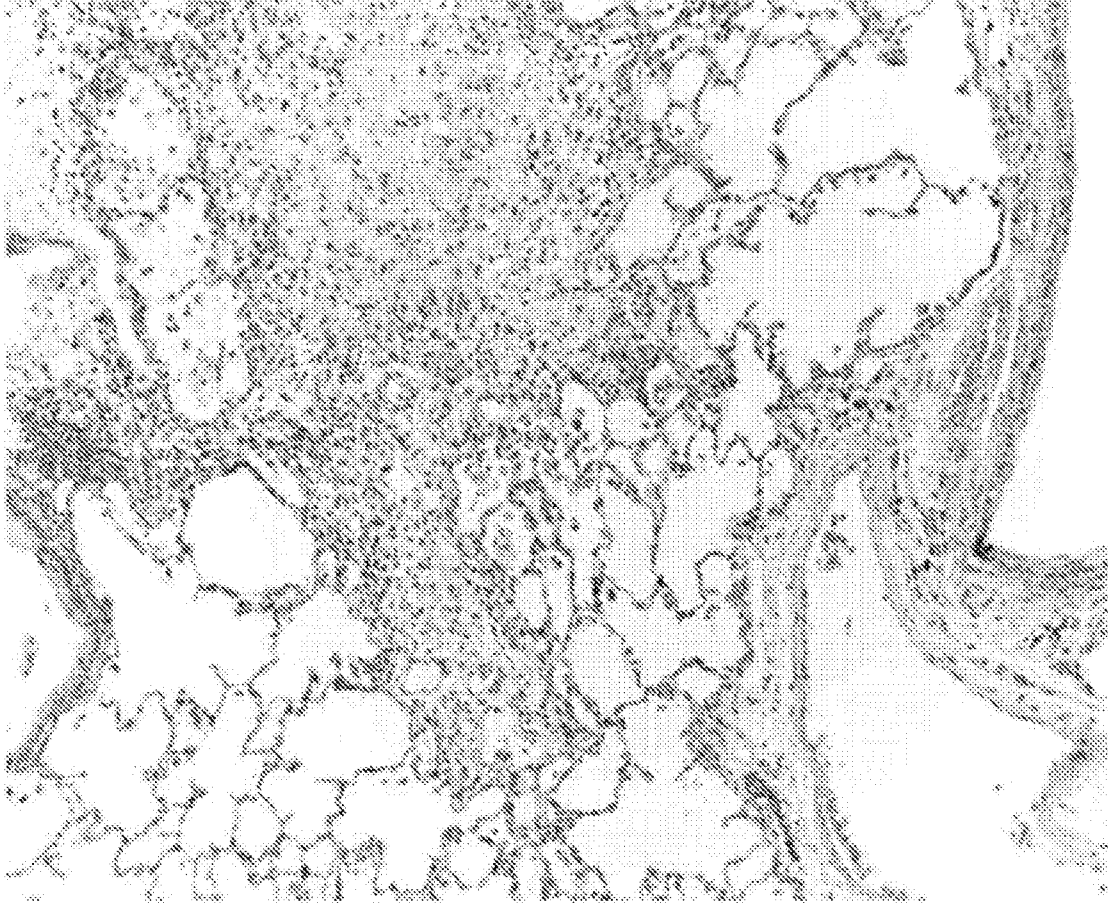


FIGURA 47

6005 (IH NanoPac 2x Alta) Adenocarcinoma-1. Primitivo-0. Regresión-4.
Características de una masa tumoral pulmonar en regresión. Obsérvense
los linfocitos y macrófagos a lo largo del borde. (20x)

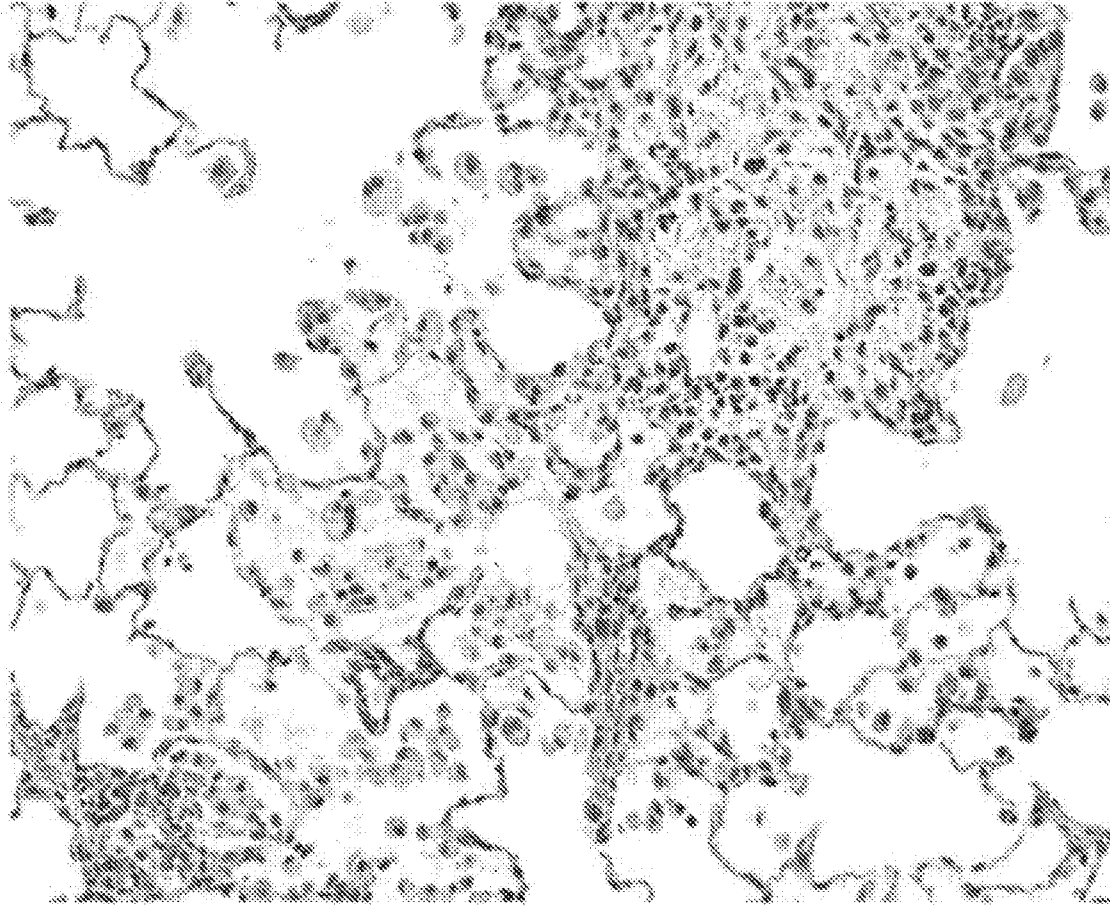


FIGURA 48

6005 (IH NanoPac 2x Alta) Adenocarcinoma-1. Primitivo-0. Regresión-4.
Obsérvense los linfocitos y macrófagos a lo largo del borde. (40x)

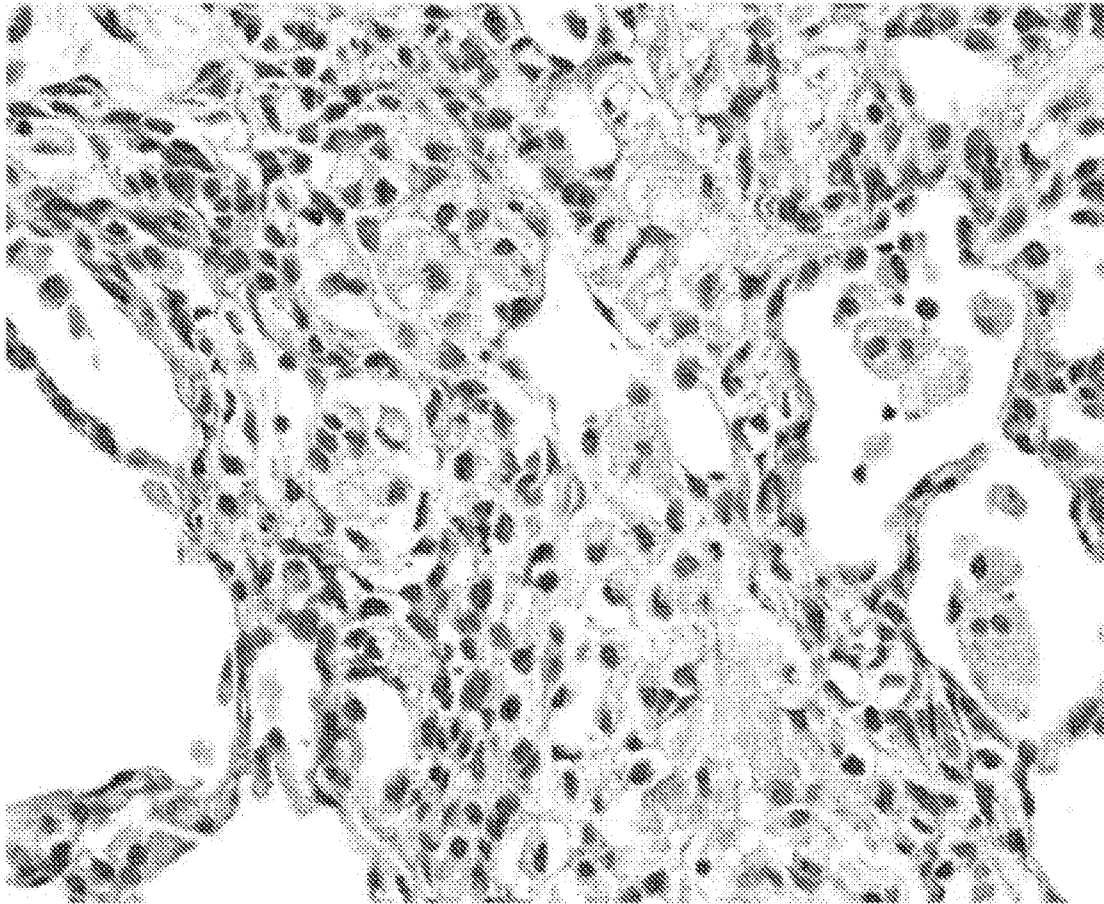


FIGURA 49

6005 (IH NanoPac 2x Alta) Adenocarcinoma-1. Primitivo-0. Regresión-4. Obsérvense los un área focal de células tumorales residuales dentro de un alvéolo. 2(40x)

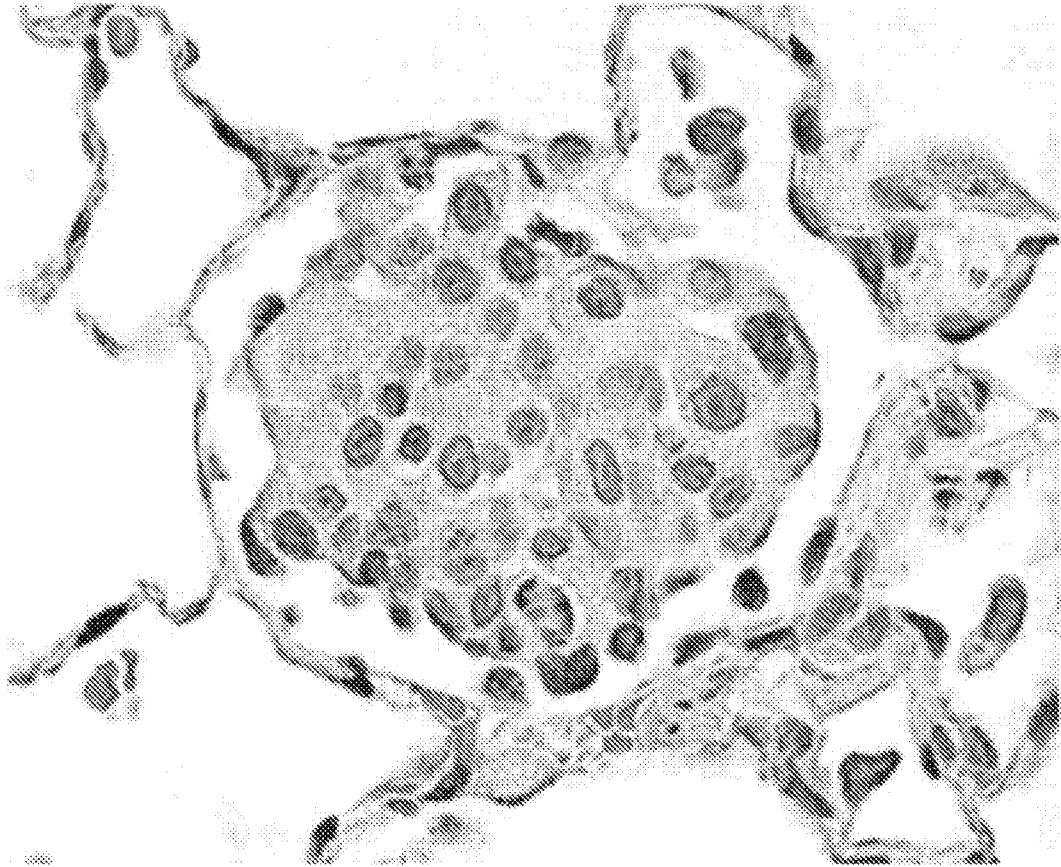


FIGURA 50

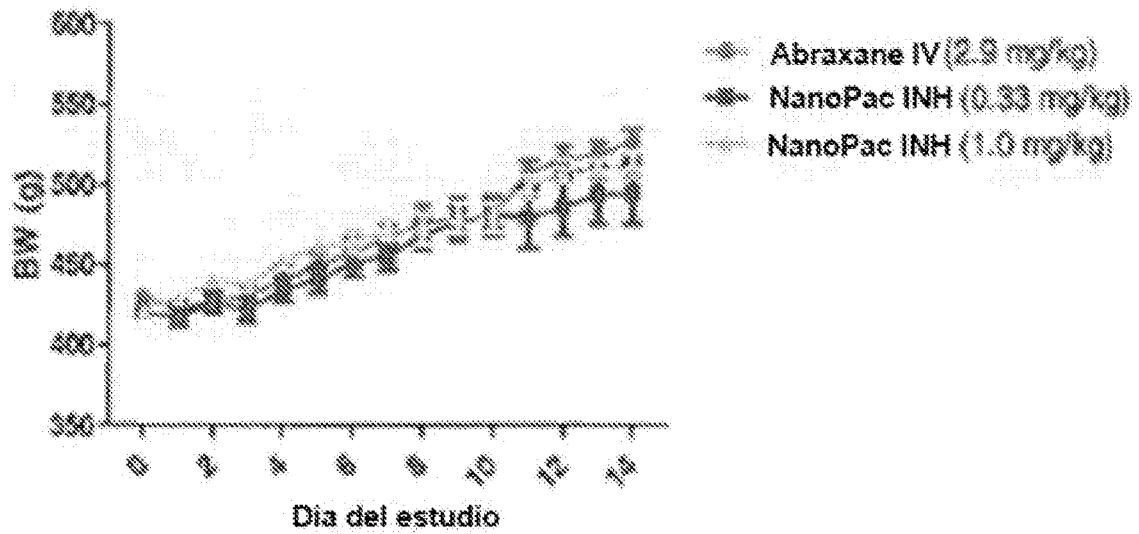


FIG. 51

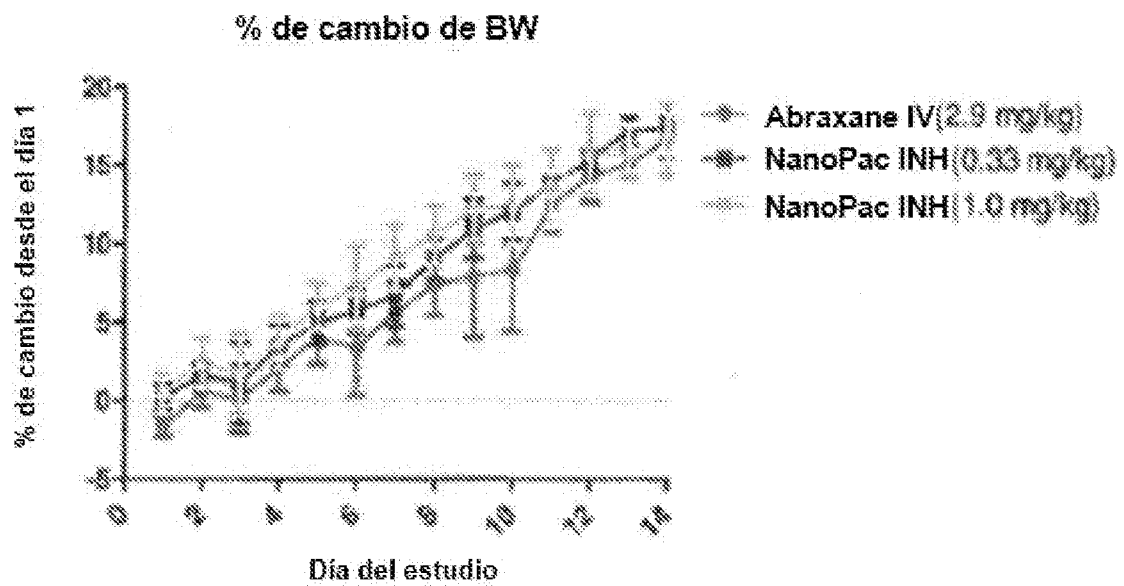


FIG. 52

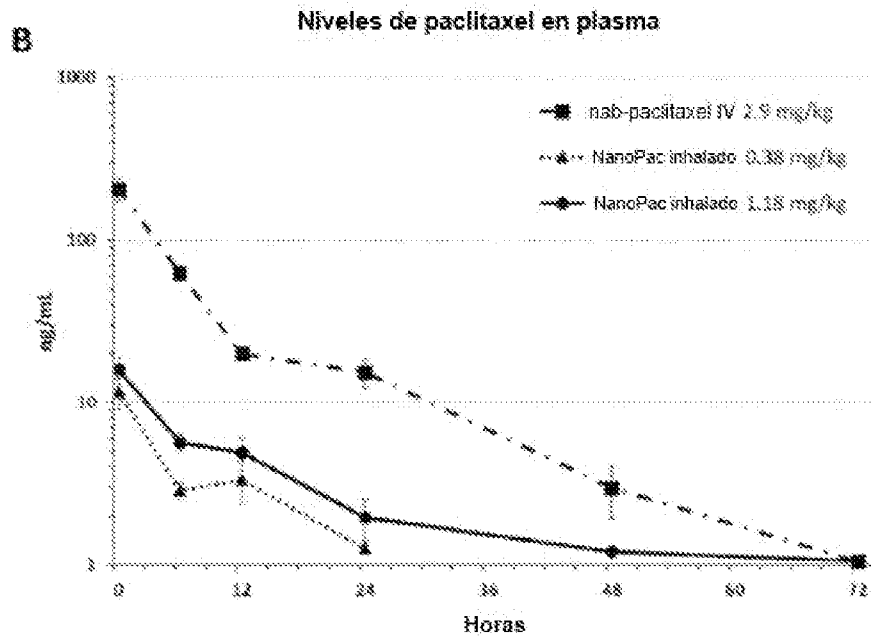


FIG. 53

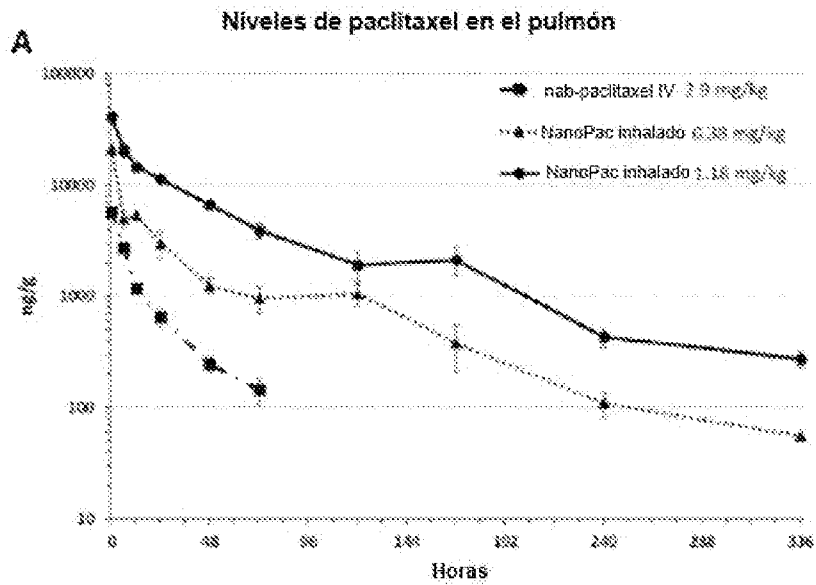


FIG. 54