

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 318**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2015** **PCT/US2015/054295**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016** **WO16057554**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2015** **E 15782205 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019** **EP 3204413**

54 Título: **Composiciones de vehículo-anticuerpo y procedimientos para preparar y usar las mismas**

30 Prioridad:

06.10.2014 US 201462060484 P
18.08.2015 US 201562206770 P
18.08.2015 US 201562206771 P
18.08.2015 US 201562206772 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2020

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)**
200 First Street SW
Rochester, MN 55905, US

72 Inventor/es:

MARKOVIC, SVETOMIR N. y
NEVALA, WENDY K.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 763 318 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

Composiciones de vehículo-anticuerpo y procedimientos para preparar y usar las mismas

5 Campo de la invención

Esta descripción se refiere a nuevas composiciones de anticuerpos y proteínas vehículos y a procedimientos para preparar y usar los mismos, en particular, como un agente terapéutico contra el cáncer.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

La quimioterapia sigue siendo un pilar de la terapia sistémica para muchos tipos de cáncer, incluido el melanoma. La mayoría de los quimioterapéuticos son solo ligeramente selectivos para las células tumorales, y la toxicidad para las células sanas en proliferación puede ser alta (Allen TM. (2002) Cáncer 2: 750-763), que a menudo requieren una
15 reducción de la dosis e incluso la interrupción del tratamiento. En teoría, una forma de superar los problemas de toxicidad de la quimioterapia, así como mejorar la eficacia del fármaco, es dirigir el fármaco de la quimioterapia al tumor utilizando anticuerpos que son específicos para las proteínas expresadas selectivamente (o sobreexpresadas) por las células tumorales para atraer fármacos dirigidos al tumor, alterando la biodistribución de la quimioterapia y dando como resultado que más fármaco vaya al tumor y afecte menos el tejido sano. Sin embargo, a pesar de 30 años
20 de investigación, la focalización específica rara vez tiene éxito en el contexto terapéutico.

La quimioterapia convencional dependiente de anticuerpos (ADC) está diseñada con un agente tóxico unido a un anticuerpo dirigido a través de un conector sintético escindible con proteasa. La eficacia de dicha terapia ADC depende de la capacidad de la célula diana de unirse al anticuerpo, el conector que se va a escindir y la absorción del agente
25 tóxico en la célula diana. Schrama, D. y col. (2006) Nature reviews. Drug discovery 5:147-159.

La quimioterapia dirigida a anticuerpos prometió ventajas sobre la terapia convencional porque proporciona combinaciones de capacidad de focalización, múltiples agentes citotóxicos y una capacidad terapéutica mejorada con potencialmente menos toxicidad. A pesar de la extensa investigación, la quimioterapia dirigida a anticuerpos
30 clínicamente efectiva sigue siendo difícil: los principales obstáculos incluyen la inestabilidad de los conectores entre el anticuerpo y el fármaco de la quimioterapia, la toxicidad tumoral reducida del agente quimioterapéutico cuando se une al anticuerpo y la incapacidad del conjugado para unirse y entrar en las células tumorales. Además, estas terapias no permitieron el control sobre el tamaño de los conjugados anticuerpo-fármaco.

35 Sigue existiendo la necesidad en la técnica de terapias contra el cáncer basadas en anticuerpos que retengan el efecto citotóxico para la administración dirigida de fármacos para proporcionar una eficacia antitumoral confiable y mejorada sobre las terapias anteriores.

Además, en cuanto a cualquier aplicación terapéutica, también existe la necesidad de que la composición sea estable
40 en sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

La liofilización, o secado en frío, elimina el agua de una composición. En el procedimiento, el material a secar primero se congela y a continuación el hielo o el solvente congelado se eliminan por sublimación en un ambiente al vacío. Se puede incluir un excipiente en formulaciones pre-liofilizadas para mejorar la estabilidad durante el procedimiento de
45 secado en frío y/o para mejorar la estabilidad del producto liofilizado tras el almacenamiento. Pikal, M. Biopharm. 3(9)26-30 (1990) y Arakawa y col., Pharm. Res. 8(3):285-291 (1991).

Mientras que las proteínas pueden liofilizarse, el procedimiento de liofilización y reconstitución puede afectar las propiedades de la proteína. Debido a que las proteínas son más grandes y complejas que los fármacos orgánicos e
50 inorgánicos tradicionales (es decir, que poseen múltiples grupos funcionales además de estructuras tridimensionales complejas), la formulación de tales proteínas plantea problemas especiales. Para que una proteína permanezca biológicamente activa, una formulación debe preservar intacta la integridad conformacional de al menos una secuencia central de los aminoácidos de la proteína y al mismo tiempo proteger los múltiples grupos funcionales de la proteína de la degradación. Las vías de degradación de las proteínas pueden implicar inestabilidad química (es decir, cualquier
55 procedimiento que implique la modificación de la proteína mediante la formación de enlaces o la escisión que resulte en una nueva entidad química) o inestabilidad física (es decir, cambios en la estructura de orden superior de la proteína). La inestabilidad química puede resultar de la desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, eliminación beta o intercambio de disulfuro. La inestabilidad física puede resultar de la desnaturalización, agregación, precipitación o adsorción, por ejemplo. Las tres vías de degradación de proteínas más comunes son la agregación de proteínas, la desamidación y la oxidación. Cleland, y col., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10(4): 307-377
60 (1993).

En la presente invención, la composición comprende nanopartículas que contienen (a) proteína vehículo (b) anticuerpo y (c) opcionalmente un agente terapéutico. Se cree que el anticuerpo se une a la proteína vehículo a través de interacciones hidrófobas que, por su naturaleza, son débiles. La liofilización y la reconstitución de dicha composición deben, por lo tanto, no solo preservar la actividad de los componentes individuales, sino también su relación relativa en nanopartículas.

Se imponen desafíos adicionales porque las nanopartículas se usan en terapia.

Por ejemplo, la reorganización de los componentes hidrófobos en la nanopartícula puede mitigarse a través de enlaces covalentes entre los componentes. Sin embargo, estos enlaces covalentes plantean desafíos para el uso terapéutico de nanopartículas en el tratamiento del cáncer. El anticuerpo, la proteína vehículo y el agente terapéutico adicional típicamente actúan en diferentes lugares en un tumor y a través de diferentes mecanismos. Los enlaces no covalentes permiten que los componentes de la nanopartícula se disocien en el tumor. Por lo tanto, mientras que un enlace covalente puede ser ventajoso para la liofilización, puede ser desventajoso para uso terapéutico.

El tamaño de las nanopartículas y la distribución del tamaño también son importantes. Las nanopartículas de la invención pueden comportarse de manera diferente según su tamaño. En tamaños grandes, las nanopartículas o la aglomeración de estas partículas pueden bloquear los vasos sanguíneos, lo que puede afectar el rendimiento y la seguridad de la composición.

Finalmente, los crioprotectores y los agentes que ayudan en el procedimiento de liofilización deben ser seguros y tolerados para uso terapéutico.

WO 2014/055415 describe procedimientos y materiales relacionados con el uso de composiciones que contienen complejos de nanopartículas/anticuerpos que contienen albúmina para tratar el cáncer (por ejemplo, cáncer de piel).

RESUMEN

En un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición liofilizada que comprende complejos de nanopartículas que tienen una superficie externa, donde cada uno de los complejos de nanopartículas comprende

- a. una proteína vehículo que es albúmina,
- b. entre aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 anticuerpos que tienen una porción Fc y una porción de unión a antígeno, y
- c. al menos un agente terapéutico que es paclitaxel,

donde la proteína vehículo, los anticuerpos y el al menos un agente terapéutico están unidos a través de enlaces no covalentes, dichos complejos de nanopartículas se liofilizan, y donde tras la reconstitución con una solución acuosa, las porciones de unión a antígeno de los anticuerpos permanecen dispuestas en la superficie externa de los complejos de nanopartículas, y además donde los complejos de nanopartículas siguen siendo capaces de unirse al antígeno *in vivo*.

También se proporcionan en esta invención composiciones de nanopartículas que comprenden nanopartículas donde cada una de las nanopartículas comprende una proteína vehículo, entre aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 anticuerpos, y al menos un agente terapéutico, donde los anticuerpos están dispuestos hacia afuera desde la superficie de las nanopartículas y donde las nanopartículas son capaces de unirse a un epítipo predeterminado *in vivo*.

Cuando se administran por vía intravenosa, las partículas grandes (por ejemplo, superiores a 1 μm) se desfavorecen típicamente porque pueden alojarse en la microvasculatura de los pulmones. Al mismo tiempo, se pueden acumular partículas más grandes en el tumor u órganos específicos. *Ver por ej.* partícula de vidrio de 20-60 micras que se usa para inyectar en la arteria hepática que se introduce en un tumor del hígado, llamado "therasphere" (en uso clínico para el cáncer de hígado).

Por lo tanto, para la administración intravenosa, se usan partículas de menos de 1 μm . Las partículas de más de 1 μm , más típicamente, se administran directamente en un tumor ("inyección directa") o en una arteria que se introduce en el sitio del tumor.

También se proporcionan en esta invención composiciones de nanopartículas que comprenden nanopartículas en las que cada una de las nanopartículas comprende una proteína vehículo que no es albúmina, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 100 anticuerpos, preferiblemente de aproximadamente 400 a aproximadamente 800 anticuerpos, y opcionalmente al menos un agente terapéutico, donde los anticuerpos son dispuestos en una superficie

exterior de las nanopartículas y donde las nanopartículas son capaces de unirse a un epítipo predeterminado *in vivo*. Cuando las nanopartículas se multimerizan, el número de anticuerpos aumenta proporcionalmente. Por ejemplo, si una nanopartícula de 160 nm contiene 400 anticuerpos, un dímero de 320 nm contiene aproximadamente 800 anticuerpos.

5

También se proporcionan en esta invención composiciones de nanopartículas que comprenden nanopartículas, donde cada una de las nanopartículas comprende proteína vehículo, entre aproximadamente 400 a aproximadamente 800 anticuerpos, y opcionalmente al menos un agente terapéutico que no es paclitaxel, donde los anticuerpos están dispuestos en una superficie de las nanopartículas tales que la porción de unión del anticuerpo se dirige hacia afuera desde esa superficie y donde las nanopartículas son capaces de unirse a un epítipo predeterminado *in vivo*.

10

Las nanopartículas pueden multimerizarse, por ejemplo, dimerizarse. La multimerización puede observarse como múltiplos del peso o tamaño de la molécula unitaria, por ejemplo, las partículas de 160 nm se multimerizan a aproximadamente 320 nm, 480 nm, 640 nm, etc. Menos del 20% de la población puede ser multímeros. Alternativamente, más del 80% de la población puede ser multímeros.

15

En una realización, la relación en peso de fármaco unido a vehículo a anticuerpo (por ejemplo, paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab) está entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:1. En una realización, la relación en peso de fármaco unido a vehículo a anticuerpo es de aproximadamente 10:4. En una realización, el anticuerpo es una capa sustancialmente única de anticuerpos en toda o parte de la superficie de la nanopartícula. Menos del 0,01% de las nanopartículas en la composición pueden tener un tamaño seleccionado del grupo que consiste en más de 200 nm, más de 300 nm, más de 400 nm, más de 500 nm, más de 600 nm, más de 700 nm y más de 800 nm. Se cree que los tamaños más grandes son el resultado de la multimerización de varias nanopartículas, cada una de las cuales comprende un núcleo y un recubrimiento de anticuerpos en toda o parte de la superficie de cada nanopartícula.

25

La invención incluye además composiciones liofilizadas y composiciones liofilizadas que no difieren materialmente de las propiedades de las nanopartículas recién preparadas o que son las mismas. En particular, la composición liofilizada, al resuspender en solución acuosa, es similar o idéntica a la composición fresca en términos de tamaño de partícula, distribución del tamaño de partícula, toxicidad para las células cancerosas, afinidad de anticuerpos y especificidad de anticuerpos. La invención se dirige al sorprendente hallazgo de que las nanopartículas liofilizadas retienen las propiedades de las nanopartículas recién preparadas a pesar de la presencia de dos componentes proteicos diferentes en estas partículas.

30

En un aspecto, esta invención se refiere a una composición de nanopartículas liofilizadas que comprende nanopartículas, donde cada una de las nanopartículas comprende un núcleo de fármaco unido a un vehículo y una cantidad de anticuerpo dispuesta en una superficie del núcleo de tal manera que la porción de unión del anticuerpo se dirige hacia afuera de esa superficie, donde los anticuerpos retienen su asociación con la superficie exterior de la nanopartícula tras la reconstitución con una solución acuosa. La composición liofilizada puede ser estable a temperatura ambiente durante al menos 3 meses. En una realización, las nanopartículas reconstituidas retienen la actividad del agente terapéutico y son capaces de unirse a la diana *in vivo*.

40

El tamaño medio de nanopartículas reconstituidas puede ser de aproximadamente 130 nm a aproximadamente 1 µm. El tamaño medio de nanopartículas reconstituidas puede ser de aproximadamente 130 nm a aproximadamente 200 nm, y más preferiblemente de aproximadamente 160 nm. Alternativamente, el tamaño medio de nanopartículas reconstituidas es de más de 800 nm a aproximadamente 3,5 µm, que comprende multímeros de nanopartículas más pequeñas, por ejemplo, multímeros de nanopartículas de 100-200 nm. La relación en peso de núcleo a anticuerpo puede ser mayor de 1:1 a aproximadamente 1:3.

45

En un aspecto, esta descripción se refiere a una composición de nanopartículas liofilizadas que comprende nanopartículas, donde cada una de las nanopartículas comprende: (a) un núcleo de paclitaxel unido a albúmina y (b) entre aproximadamente 400 a aproximadamente 800 moléculas de bevacizumab dispuestas en una superficie del núcleo de paclitaxel unido a albúmina de modo que la porción de unión del anticuerpo se dirija hacia afuera desde esa superficie, donde los anticuerpos retienen su asociación con la superficie de la nanopartícula tras la reconstitución con una solución acuosa, siempre que dicha composición liofilizada sea estable a aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C durante al menos 3 meses y las nanopartículas reconstituidas sean capaces de unirse al VEGF *in vivo*.

55

En otros aspectos, esta descripción se refiere a una composición de nanopartículas liofilizadas que comprende nanopartículas, donde cada una de las nanopartículas comprende: (a) un núcleo de paclitaxel unido a albúmina y (b) una cantidad de bevacizumab dispuesta una superficie del núcleo de paclitaxel unido a albúmina de modo que la porción de unión del anticuerpo se dirija hacia afuera desde esa superficie, donde los anticuerpos retienen su asociación con la superficie de la nanopartícula tras la reconstitución con una solución acuosa, siempre que dicha

60

composición liofilizada sea estable a aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C durante al menos 3 meses y las nanopartículas reconstituidas sean capaces de unirse al VEGF *in vivo* y además donde el tamaño promedio de nanopartículas reconstituidas no es sustancialmente diferente del tamaño de partícula de las nanopartículas recién preparadas. En algunas realizaciones, los tamaños de partícula están entre 200 y 800 nm, incluyendo 200, 300, 400, 500, 600, 700 u 800 nm. Las partículas pueden ser más grandes, por ejemplo, de más de 800 nm a aproximadamente 3,5 µm. Las partículas pueden ser multímeros de nanopartículas.

En algunas realizaciones, la relación en peso de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab está entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:1. En otras realizaciones, la relación en peso de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab es de aproximadamente 10:4. Alternativamente, la relación en peso de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab puede ser mayor de 1:1 a aproximadamente 1:3.

En algunas realizaciones, el núcleo es paclitaxel unido a albúmina, y los anticuerpos se seleccionan de anticuerpos que reconocen selectivamente VEGF (por ejemplo, bevacizumab/Avastin), anticuerpos que reconocen selectivamente CD20 (por ejemplo, rituximab/Rituxin) y anticuerpos que reconocen selectivamente Her2 (Trastuzumab/Herceptin).

En algunas realizaciones, el al menos un agente terapéutico se encuentra dentro de la nanopartícula. En otras realizaciones, el al menos un agente terapéutico se encuentra en la superficie exterior de la nanopartícula. En otras realizaciones más, el al menos un agente terapéutico se encuentra dentro de la nanopartícula y en la superficie exterior de la nanopartícula.

En algunas realizaciones, la nanopartícula contiene más de un tipo de agente terapéutico. Por ejemplo, un taxano y un fármaco de platino, por ejemplo, paclitaxel y cisplatino.

En algunas realizaciones, los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en ado-trastuzumab emtansine, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, denosumab, dinutuximab, ipilimumab, nivolumab, obinutuzumab, ofatumumab, panitumumab, pembrolizumab, pertuzumab, rituximab y trastuzumab. En algunas realizaciones, los anticuerpos son una capa sustancialmente única de anticuerpos en toda o parte de la superficie de la nanopartícula.

En realizaciones adicionales, los anticuerpos están menos glicosilados de lo que normalmente se encuentra en los anticuerpos humanos naturales. Tal glicosilación puede estar influenciada por, por ejemplo, el sistema de expresión, o la presencia de inhibidores de la glicosilación durante la expresión. En algunas realizaciones, el estado de glicosilación de un anticuerpo se altera a través de acción enzimática o química.

El al menos un agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en abiraterone, bendamustine, bortezomib, carboplatin, cabazitaxel, cisplatino, chlorambucil, dasatinib, docetaxel, doxorubicin, epirubicin, erlotinib, etoposide, everolimus, gefitinib, idarubicin, imatinib, hydroxyurea, imatinib, lapatinib, leuprorelin, melphalan, methotrexate, mitoxantrone, nedaplatin, nilotinib, oxaliplatin, paclitaxel, pazopanib, pemetrexed, picoplatin, romidepsin, satraplatin, sorafenib, vemurafenib, sunitinib, teniposide, triplatin, vinblastine, vinorelbine, vincristine y ciclofosfamida.

En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende además al menos un agente terapéutico adicional que no es paclitaxel o bevacizumab.

En algunas realizaciones, los anticuerpos, la proteína vehículo y, cuando está presente, el agente terapéutico, se unen a través de enlaces no covalentes.

La proteína vehículo puede seleccionarse del grupo que consiste en gelatina, elastina, gliadina, legumina, zeína, una proteína de soja, una proteína de leche y una proteína de suero. En otras realizaciones, la proteína vehículo es albúmina, por ejemplo, albúmina sérica humana.

La composición puede formularse para administración intravenosa. La composición puede formularse para inyección directa o perfusión en un tumor.

El tamaño medio de nanopartículas en la composición puede ser de más de 800 nm a aproximadamente 3,5 µm.

Las nanopartículas pueden tener una constante de disociación entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 1×10^{-9} M.

También se proporcionan en esta invención procedimientos para preparar composiciones de nanopartículas, donde dichos procedimientos comprenden poner en contacto la proteína vehículo y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico con los anticuerpos en una solución que tiene un pH entre 5,0 y 7,5 y una temperatura entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 60°C, entre aproximadamente 23°C y aproximadamente 60°C, o entre

aproximadamente 55°C y aproximadamente 60°C en condiciones y proporciones de componentes que permitirán la formación de las nanopartículas deseadas. La nanopartícula se puede preparar a 55-60°C y pH 7,0. También se proporcionan en esta invención procedimientos para preparar las composiciones de nanopartículas, donde dicho procedimiento comprende (a) contactar la proteína vehículo y opcionalmente al menos un agente terapéutico para

- 5 formar un núcleo y (b) contactar el núcleo con los anticuerpos en una solución que tiene un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5 a una temperatura entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 60°C, entre aproximadamente 23°C y aproximadamente 60°C, o entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 60°C en condiciones y proporciones de componentes que permitirán la formación de las nanopartículas deseadas.
- 10 La cantidad de componentes (por ejemplo, proteína vehículo, anticuerpos, agentes terapéuticos, combinaciones de los mismos) se controla para proporcionar la formación de las nanopartículas deseadas. Una composición en la que la cantidad de componentes es demasiado diluida no formará las nanopartículas como se describe en esta invención. En una realización preferida de la invención, la relación en peso de proteína vehículo a anticuerpo es 10:4. En algunas realizaciones, la cantidad de proteína vehículo está entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 100 mg/mL.
- 15 En algunas realizaciones, la cantidad de anticuerpo está entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 30 mg/mL. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proporción de proteína vehículo:anticuerpo:solución es de aproximadamente 9 mg de proteína vehículo (por ejemplo, albúmina) a 4 mg de anticuerpo (por ejemplo, BEV) en 1 ml de solución (por ejemplo, solución salina). También se puede agregar una cantidad de agente terapéutico (por ejemplo, taxol) a la proteína vehículo.

20 Las nanopartículas pueden prepararse como se indicó anteriormente y a continuación liofilizarse.

También se proporcionan en esta invención procedimientos para tratar una célula cancerosa, el procedimiento comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de una composición de nanopartículas descrita en

25 esta invención para tratar la célula cancerosa.

También se proporcionan en esta invención procedimientos para tratar un tumor en un paciente que lo necesita, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de una composición de nanopartículas descrita en esta invención para tratar el tumor. El tamaño del tumor puede ser reducido. La composición

30 de nanopartículas puede administrarse por vía intravenosa. La composición de nanopartículas puede ser administrada mediante inyección directa o perfusión en el tumor.

Los procedimientos proporcionados en esta invención incluyen las etapas de: a) administrar la composición de nanopartículas una vez por semana durante tres semanas; b) cesar la administración de la composición de

35 nanopartículas durante una semana; y c) repetir las etapas a) y b) según sea necesario para tratar el tumor.

El tratamiento puede comprender la administración del anticuerpo dirigido antes de la administración de las nanopartículas. El anticuerpo dirigido puede administrarse entre aproximadamente 6 y 48, o 12 y 48 horas antes de la administración de las nanopartículas. El anticuerpo dirigido puede administrarse entre 6 y 12 horas antes de la

40 administración de las nanopartículas. El anticuerpo dirigido puede administrarse entre 2 y 8 horas antes de la administración de las nanopartículas. El anticuerpo dirigido puede administrarse una semana antes de la administración de las nanopartículas. Por ejemplo, la administración de una dosis de BEV 24 horas antes de la administración de AB160. En otro ejemplo, la administración previa de rituximab antes de administrar nanopartículas de AR. El anticuerpo administrado antes de la nanopartícula puede administrarse como una dosis subterapéutica,

45 como 1/2, 1/10 ° o 1/20 la cantidad normalmente considerada terapéutica. Por lo tanto, en el hombre, el pretratamiento con BEV puede comprender la administración de 1 mg/kg de BEV, que es 1/10 ° la dosis habitual, seguida de la administración de AB160.

La cantidad terapéuticamente efectiva puede comprender aproximadamente 75 mg/m² a aproximadamente 175 mg/m² de la proteína vehículo (es decir, miligramos de proteína vehículo por m² del paciente). La cantidad terapéuticamente efectiva puede comprender aproximadamente 75 mg/m² a aproximadamente 175 mg/m² de agente terapéutico (por ejemplo, paclitaxel). La cantidad terapéuticamente efectiva puede comprender aproximadamente 30 mg/m² hasta

50 aproximadamente 70 mg/m² del anticuerpo La cantidad terapéuticamente efectiva puede comprender aproximadamente 30 mg/m² hasta aproximadamente 70 mg/m² de bevacizumab

55 En una realización específica, la composición liofilizada comprende aproximadamente 75 mg/m² a aproximadamente 175 mg/m² de la proteína vehículo que es preferiblemente albúmina; de aproximadamente 30 mg/m² hasta aproximadamente 70 mg/m² del anticuerpo que es preferiblemente bevacizumab; y de aproximadamente 75 mg/m² a aproximadamente 175 mg/m² de paclitaxel.

60 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Las siguientes figuras son solo representativas de la invención y no pretenden ser una limitación. En aras de la consistencia, las nanopartículas de esta invención que usan Abraxane® y bevacizumab emplean el acrónimo "AB" y el número después de AB, como AB160, debe conferir el tamaño medio de partícula de estas nanopartículas (en nanómetros). Del mismo modo, cuando el anticuerpo es rituximab, el acrónimo es "AR", mientras que el número a partir de entonces sigue siendo el mismo.

La **FIG. 1A** muestra diagramas de dispersión de citometría de flujo que incluyen: Abraxane® (ABX - disponible comercialmente de Celgene Corporation, Summit, NJ 07901) teñido solo con anticuerpo secundario (panel superior izquierdo), ABX teñido con anticuerpo secundario IgG1 Fab plus anti-ratón de cabra (panel superior derecho), AB160 (que es una nanopartícula de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab en una proporción de aproximadamente 10:4 y tienen un tamaño de partícula promedio de 160 nm) teñido solo con anticuerpo secundario (panel inferior izquierdo), o AB160 teñido con anticuerpo secundario IgG1 Fab plus anti-ratón de cabra (panel inferior derecho).

La **FIG. 1B** muestra una micrografía electrónica representativa después de la incubación de AB160 con IgG Fc anti-humano marcado con partículas de oro.

La **FIG. 1C** muestra un gráfico circular (arriba) que indica los porcentajes de paclitaxel total en fracciones de AB160 (partículas, proteínas mayores de 100 kD y proteínas menores de 100 kD); y un Western blot con anticuerpos contra IgG Fab de ratón (BEV) y paclitaxel para verificar la localización conjunta (abajo).

La **FIG. 1D** representa la actividad de paclitaxel en un ensayo de toxicidad *in vitro* con células de melanoma humano A375, en comparación con ABX solo. Los resultados están representados por el índice de proliferación promedio (+/- SEM), que es el porcentaje de proliferación total de células no tratadas. Estos datos representan 3 experimentos y las diferencias no fueron significativas.

La **FIG. 1E** representa los resultados de un ELISA VEGF de sobrenadante después de la incubación conjunta de VEGF con ABX y AB160 para determinar la unión del ligando, VEGF, por el anticuerpo. Los resultados se muestran como el porcentaje promedio +/- SEM de VEGF que no estaba unido por los 2 complejos. Los datos representan 3 experimentos. ** P < 0,005.

La **FIG. 2A** muestra el tamaño de los complejos (determinados por la tecnología de dispersión de luz) formados mediante la adición de BEV (bevacizumab) a ABX en condiciones en las que se forman nanopartículas y superiores. Se añadieron concentraciones crecientes de BEV (0-25 mg) a 10 mg de ABX y se determinó el tamaño de los complejos formados. El tamaño promedio de los complejos (146 nm a 2.166 nm) aumentó a medida que se aumentó la concentración de BEV. Los datos se muestran como volumen de muestra/tamaño y los gráficos muestran la distribución del tamaño de las partículas. Estos datos son representativos de 5 preparaciones farmacológicas separadas. Como comparación, ABX, por sí mismo, tiene un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 130 nm.

La **FIG. 2B** muestra afinidad de la unión de ABX y BEV (según lo determinado por la tecnología de absorción de luz (BLItz)). Los datos se muestran como constante de disociación (Kd). Se evaluó la afinidad de unión de las partículas preparadas a cuatro niveles de pH (3, 5, 7, 9) y 3 temperaturas (RT, 37°C y 58°C), y los datos son representativos de 5 experimentos.

La **FIG. 2C** muestra la estabilidad de los complejos de nanopartículas de la FIG. 2B en suero según lo determinado por un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) en Nanosight 300 (NS300). Los datos se muestran como el número de partículas/mg de ABX y compara AB160 preparado a RT y pH 7 (AB16007; tamaño de partícula, pH), 58°C y pH 7 (AB1600758; tamaño de partícula, pH, temperatura) y 58°C y pH 5 (AB1600558; tamaño de partícula, pH, temperatura), en relación con ABX solo en cada condición. Una vez que se prepararon las partículas, se agregaron al suero AB humano durante 15, 30 y 60 minutos para determinar la estabilidad en el suero a lo largo del tiempo.

La **FIG. 3A** muestra la prueba *in vivo* de nanopartículas AB en ratones atímicos desnudos inyectados con 1×10^6 células de melanoma humano A375 en el flanco derecho y tratadas con PBS, 12 mg/kg BEV, 30 mg/kg ABX, 12 mg/kg BEV + 30 mg/kg ABX, o AB160 (que tiene aproximadamente 12 mg/kg BEV y aproximadamente 30 mg/kg ABX) con un tamaño tumoral entre aproximadamente 600 mm³ hasta 900 mm³. Los datos se representan el día 7 después del tratamiento como el cambio porcentual en el tamaño del tumor desde el inicio (el tamaño del tumor el día del tratamiento). Se utilizó la prueba t de Student para determinar la significación. Los valores de p para las partículas AB fueron significativamente diferentes a los de PBS, los fármacos individuales solos y los 2 fármacos administrados secuencialmente.

La **FIG. 3B** muestra las curvas de Kaplan-Meier generadas para la supervivencia media de los ratones analizados en la FIG. 3A. La significación se determinó utilizando la prueba de Mantle-Cox que compara las curvas de supervivencia.

La **FIG. 3C** muestra el cambio porcentual desde el inicio para ratones tratados cuando los tumores eran menores o mayores que 700 mm^3 , para determinar si el tamaño del tumor afectó la respuesta tumoral solo para los grupos ABX y AB160. La prueba t de Student se utilizó para determinar la significación; los grupos solo ABX no mostraron diferencias significativas ($p = 0,752$) en función del tamaño del tumor, mientras que los grupos AB160 fueron significativamente diferentes ($p = 0,0057$).

La **FIG. 3D** muestra las pruebas *in vivo* de nanopartículas AB en ratones atímicos desnudos inyectados con 1×10^6 células de melanoma humano A375 en el flanco derecho y tratadas con PBS, 30 mg/kg de ABX, o 45 mg/kg de BEV y AB160, AB580 (nanopartícula de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab que tiene un tamaño de partícula promedio de 580 nm) o AB1130 (nanopartícula de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab que tiene un tamaño de partícula promedio de 1130 nm) a un tamaño tumoral entre aproximadamente 600 mm^3 hasta 900 mm^3 . Los datos se representan el día 7 después del tratamiento como el cambio porcentual en el tamaño del tumor desde el inicio (el tamaño del tumor el día del tratamiento). Se utilizó la prueba t de Student para determinar la significación. Los valores de p para las partículas AB fueron significativamente diferentes a los de PBS, los fármacos individuales solos y los 2 fármacos administrados secuencialmente. La diferencia entre las partículas AB de diferentes tamaños no fue significativa.

La **FIG. 3E** muestra las curvas de Kaplan-Meier generadas para la supervivencia media de los ratones analizados en la FIG. 3D. La significación se determinó utilizando la prueba de Mantle-Cox que compara las curvas de supervivencia.

La **FIG. 4A** demuestra la concentración de paclitaxel en sangre que se muestra en el gráfico lineal con el eje y en escala logarítmica, en base a muestras de sangre y tumor tomadas de ratones sin tumor y portadores de tumor a las 0-24 horas después de la inyección IV con 30 mg/kg de paclitaxel en el contexto de ABX o AB160 y medido por LC-MS. Los ratones se inyectaron IV por vía intravenosa en el momento 0, se tomaron muestras de sangre y los ratones se sacrificaron en puntos temporales de 0, 4, 8, 12 y 24 horas. Hubo al menos a 3 ratones para punto temporal. Se utilizó la prueba t de Student para determinar si las diferencias en las concentraciones entre ABX y AB160 fueron significativas.

La **FIG. 4B** demuestra la concentración de paclitaxel en sangre de la FIG. 4A, que se muestra en un gráfico lineal con el eje y en escala numérica.

La **FIG. 4C** muestra la $C_{\max}$, la vida media y los valores de AUC calculados a partir de los datos de concentración en sangre proporcionados en las FIGs 4A y 4B.

La **FIG. 4D** demuestra la concentración de paclitaxel en sangre que se muestra en el gráfico lineal con el eje y en escala logarítmica de un segundo experimento farmacocinético utilizando puntos de tiempo anteriores (2 a 8 horas).

La **FIG. 4E** demuestra la concentración de paclitaxel en sangre de la FIG. 4D, se muestra en un gráfico lineal con el eje y en escala numérica.

La **FIG. 4F** muestra la concentración de paclitaxel en sangre en ratones en los que se permitió que los tumores crecieran a un tamaño mayor antes de las inyecciones ABX y AB160.

La **FIG. 4G** muestra la $C_{\max}$ y el AUC calculado a partir de los datos en la FIG. 4F.

La **FIG. 4H** muestra las concentraciones de paclitaxel en los tumores del segundo experimento con ratones según lo determinado por LC-MS. Los datos se muestran como μg de paclitaxel/mg de tejido tumoral. Se utilizó la prueba t de Student para determinar si las diferencias fueron significativas.

La **FIG. 4I** muestra I-125 niveles de radiactividad en ratones tratados con AB160 en relación con ABX solo.

La **FIG. 4J** muestra una representación gráfica de los niveles de radiactividad I-125 mostrados en la FIG. 4I.

La **FIG. 5A** muestra las medidas del tamaño de partícula y la afinidad de las nanopartículas preparadas con rituximab. Se incubaron 10 mg/ml de ABX con rituximab (RIT) a 0-10 mg/ml y se usó tecnología de dispersión de luz (Mastersizer 2000) para determinar los tamaños de partícula resultantes. Los datos se muestran como el porcentaje de volumen de partículas en cada tamaño y las curvas representan distribuciones de tamaño de partículas (arriba). La tabla (abajo) muestra los tamaños de las partículas resultantes en cada concentración de anticuerpo.

La **FIG. 5B** muestra las medidas del tamaño de partícula y la afinidad de las nanopartículas preparadas con trastuzumab. Se incubaron 10 mg/ml de ABX con trastuzumab (HER) a 0-22 mg/ml y se usó tecnología de dispersión

de luz (Mastersizer 2000) para determinar los tamaños de partícula resultantes. Los datos se muestran como el porcentaje de volumen de partículas en cada tamaño y las curvas representan distribuciones de tamaño de partículas (arriba). La tabla (abajo) muestra los tamaños de las partículas resultantes en cada concentración de anticuerpo.

- 5 La **FIG. 5C** muestra la afinidad de unión de rituximab y trastuzumab en comparación con ABX a pH 3, 5, 7 y 9, determinado por la tecnología de interferometría de biocapa (BLItz). Las constantes de disociación se muestran para cada interacción.

- La **FIG. 6A** muestra la toxicidad *in vitro* de AR160 según lo probado con la línea celular de linfoma humano Daudi
10 CD20 positivo. Los datos se muestran en un gráfico del índice de proliferación, que es el porcentaje de células positivas para FITC en pocillos tratados en relación con las células positivas para FITC en el pocillo no tratado (el nivel más alto de proliferación).

- La **FIG. 6B** muestra la eficacia tumoral *in vivo* en ratones atímicos desnudos inyectados con 5×10^6 células de linfoma
15 humano de Daudi en el flanco derecho. Se permitió que los tumores crecieran hasta 600 mm³ hasta 900 mm³ y los ratones fueron tratados con PBS, 30 mg/kg de ABX, 12 mg/kg de rituximab, 12 mg/kg de rituximab + 30 mg/kg de ABX o AR160. La respuesta tumoral se determinó el día 7 después del tratamiento por el cambio porcentual en el tamaño del tumor desde el primer día de tratamiento. La significación se determinó mediante la prueba t de Student; el cambio porcentual desde el inicio fue significativamente diferente entre los ratones tratados con AR160 y todos los demás
20 grupos ($p < 0,0001$).

- La **FIG. 6C** muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier generadas a partir del experimento que se muestra en la FIG. 6B. Se muestra la mediana de supervivencia para cada grupo de tratamiento. Se usó una prueba de Mantle-Cox para determinar si las diferencias en la curva de supervivencia fueron significativas.

- 25 La **FIG. 7A** demuestra la adición de otro fármaco quimioterápico (cisplatino) cisplatino a AB160. Se incubó ABX (5 mg/ml) con cisplatino (0,5 mg/ml) a temperatura ambiente durante 30 minutos y se midió el cisplatino libre por HPLC en el sobrenadante después de eliminar las partículas de ABX. La cantidad de cisplatino libre se restó de la concentración inicial para determinar la cantidad de cisplatino que se unió al ABX. Los datos se muestran en un gráfico
30 de columnas, junto con la concentración inicial (cisplatino).

- La **FIG. 7B** muestra la toxicidad de ABX (AC) unido a cisplatino en un ensayo de proliferación de células de melanoma humano A375. Después de 24 horas de exposición al fármaco e incorporación de EdU, las células se fijaron, se permeabilizaron y se marcaron con un anticuerpo anti-EdU conjugado con FITC. Los datos se muestran en un gráfico
35 del índice de proliferación, que es el porcentaje de células positivas para FITC en pocillos tratados en relación con las células positivas para FITC en el pocillo no tratado (el nivel más alto de proliferación).

- La **FIG. 7C** muestra la eficacia tumoral *in vivo* de AC (complejo ABC; ABX unido a cisplatino) en ratones atímicos desnudos inyectados con 1×10^6 de células de melanoma humano A375 en el flanco derecho. Se permitió que los
40 tumores crecieran hasta 600 mm³ hasta 900 mm³ y los ratones fueron tratados con PBS, 30 mg/kg de ABX, 2 mg/kg de cisplatino, AB160, 2 mg/kg de cisplatino + AB160 o ABC160. La respuesta tumoral se determinó el día 7 después del tratamiento por el cambio porcentual en el tamaño del tumor desde el primer día de tratamiento. La significación se determinó mediante la prueba t de Student; el cambio porcentual desde el inicio fue significativamente diferente entre los ratones tratados con ABC160 y los ratones tratados con PBS, cisplatino o ABX ($p < 0,0001$). No hubo
45 diferencias significativas entre los grupos tratados con AB160, AB160 + cisplatino y ABC 160 para el cambio porcentual posterior al tratamiento del día 7 desde el inicio.

- La **FIG. 7D** muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier generadas en base al experimento que se muestra en la FIG. 7C y mediana de supervivencia para cada grupo de tratamiento. Se usó una prueba de Mantle-Cox para
50 determinar si las diferencias en la curva de supervivencia fueron significativas.

La **FIG. 8A** muestra la distribución de tamaños de las nanopartículas AB160 que se liofilizaron, almacenaron a temperatura ambiente durante un mes y se reconstituyeron, en comparación con AB160 o ABX fresco solo.

- 55 La **FIG. 8B** muestra la capacidad de unión al ligando (VEGF) de las nanopartículas AB160 que se liofilizaron, almacenaron a temperatura ambiente durante un mes y se reconstituyeron, en comparación con AB160 o ABX fresco solo.

- La **FIG. 8C** muestra la toxicidad en células cancerosas *in vitro* de nanopartículas AB160 que fueron liofilizadas, almacenadas a temperatura ambiente durante un mes y reconstituidas, en comparación con AB160 o ABX fresco solo.
60

La **FIG. 8D** muestra la distribución de tamaños de las nanopartículas AB160 que se liofilizaron, almacenaron a

temperatura ambiente durante diez meses y se reconstituyeron, en comparación con AB160 o ABX fresco solo.

La **FIG. 8E** muestra la capacidad de unión al ligando (VEGF) de las nanopartículas AB160 que se liofilizaron, almacenaron a temperatura ambiente durante diez meses y se reconstituyeron, en comparación con AB160 o ABX fresco solo.

La **FIG. 8F** muestra la toxicidad en células cancerosas *in vitro* de nanopartículas AB160 liofilizadas, almacenadas a temperatura ambiente durante diez meses y reconstituidas, en comparación con AB160 o ABX fresco solo.

10 Las **FIGs. 9A-C** muestran las distribuciones de tamaño de los complejos ABX-BEV en condiciones de infusión IV (concentración final de ABX de 5 mg/ml) incubados en solución salina a temperatura ambiente durante hasta 24 horas (**FIGs. A y B**). A las 4 horas a temperatura ambiente, hay alguna evidencia de descomposición compleja por ELISA (20%, **FIG. C**)

15 La **FIG. 10** muestra incubación *in vitro* durante 30 segundos de ABX (panel superior) o AB160 (panel inferior) en solución salina o plasma humano heparinizado a relaciones de volumen relativo de 9:1 o 1:1.

Las **FIGs. 11A-E** muestran pruebas *in vivo* de ratones desnudos atímicos inyectados con 1×10^6 células de melanoma humano A375 en el flanco derecho y tratadas con (**Fig. 11A**) PBS, (**Fig. 11B**) 12 mg/kg BEV, (**Fig. 11C**) 30 mg/kg

20 ABX, (**Fig. 11D**) AB160, o (**Fig. 11E**) pretratada con 0.12 mg/kg BEV y, 24 horas después, AB160. Los datos se representan en el 7 y 10 días post-tratamiento como volumen tumoral en mm^3 .

La **FIG. 11F** resume los datos del día 7 después del tratamiento de las **FIGs. 11A-E**.

25 La **FIG. 11G** resume los datos del día 10 después del tratamiento de las **FIGs. 11A-E**.

Descripción detallada

Después de leer esta descripción, resultará evidente para un experto en la materia cómo implementar la invención en 30 diversas realizaciones alternativas y aplicaciones alternativas.

La descripción detallada de la invención se divide en varias secciones solo para la conveniencia del lector y la descripción que se encuentra en cualquier sección puede combinarse con la de otra sección. Los títulos o subtítulos pueden usarse en la memoria descriptiva para la conveniencia de un lector, que no están destinados a influir en el 35 alcance de la presente invención.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado según lo entiende comúnmente un experto en la materia al que pertenece esta invención. En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, se hará referencia a una cantidad de términos, los cuales tendrán los significados estipulados a continuación:

La terminología utilizada en esta invención tiene el único fin de describir realizaciones particulares y no pretende limitar 45 la invención. Como se usa en esta invención, las formas singulares «un», «una» y «el», «la» pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia que se describe posteriormente puede o no ocurrir, y que la descripción incluye casos en los que ocurre el evento o circunstancia y casos en los que no ocurre.

50 El término "aproximadamente" cuando se usa antes de una designación numérica, por ejemplo, temperatura, tiempo, cantidad, concentración y otros, incluido un intervalo, indica aproximaciones que pueden variar en (+) o (-) 10%, 5%, 1%, o cualquier subintervalo o subvalor entre ellos. Preferiblemente, el término "aproximadamente" cuando se usa con respecto a una cantidad de dosis significa que la dosis puede variar en +/- 10%. Por ejemplo, "aproximadamente 400 55 a aproximadamente 800 anticuerpos" indica que la superficie exterior de una nanopartícula contiene una cantidad de anticuerpo entre 360 y 880 partículas.

"Comprender" o "comprende" pretende significar que las composiciones y procedimientos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. "Consistir esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y 60 procedimientos, significará excluir otros elementos de cualquier importancia esencial para la combinación para el propósito establecido. Por lo tanto, una composición que consista esencialmente en los elementos como se definen en esta invención no excluiría otros materiales o etapas que no afecten materialmente las características básicas y

novedosas de la invención reivindicada. "Consistir en" significará excluir más que elementos traza de otros ingredientes y etapas sustanciales del procedimiento. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

- 5 El término "nanopartícula", como se usa en esta invención, se refiere a partículas que tienen al menos una dimensión que es inferior a 5 micras. En realizaciones preferidas de la invención, tales como para la administración intravenosa, la nanopartícula es inferior a 1 micra. Para administración directa, la nanopartícula es más grande. Incluso partículas más grandes están expresamente contempladas por la invención.
- 10 En una población de partículas, el tamaño de las partículas individuales se distribuye alrededor de una media. Por lo tanto, el tamaño de las partículas para la población puede representarse por un promedio y también por percentiles. D50 es el tamaño de partícula por debajo del cual cae el 50% de las partículas. El 10% de las partículas son más pequeñas que el valor D10 y el 90% de las partículas son más pequeñas que D90. Donde no está claro, el tamaño "promedio" es equivalente a D50. Entonces, por ejemplo, AB160 se refiere a nanopartículas que tienen un tamaño
- 15 promedio de 160 nanómetros.

El término "nanopartícula" también puede abarcar multímeros discretos de nanopartículas de conjuntos más pequeños. Por ejemplo, una partícula de 320 nm comprende un dímero de un conjunto de nanopartículas de 160 nm. Por lo tanto, para nanopartículas de 160 nm, los multímeros serían aproximadamente 320 nm, 480 nm, 640 nm, 800

20 nm, 960 nm, 1120 nm, y así sucesivamente.

El término "proteína vehículo" como se usa en esta invención se refiere a proteínas que funcionan para transportar anticuerpos y/o agentes terapéuticos. Los anticuerpos de la presente descripción pueden unirse reversiblemente a las proteínas vehículos. Las proteínas vehículos ejemplares se analizan con más detalle a continuación.

- 25 El término "núcleo", como se usa en esta invención, se refiere a la porción central o interna de la nanopartícula que puede estar compuesta por una proteína vehículo, una proteína vehículo y un agente terapéutico, u otros agentes o combinación de agentes. En algunas realizaciones, se puede incorporar una porción hidrófoba del anticuerpo en el núcleo.

30 El término "agente terapéutico" como se usa en esta invención significa un agente que es terapéuticamente útil, por ejemplo, un agente para el tratamiento, remisión o atenuación de un estado de enfermedad, afección fisiológica, síntomas o factores etiológicos, o para la evaluación o diagnóstico de los mismos. Un agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico, por ejemplo, inhibidores mitóticos, inhibidores de topoisomerasa, esteroides, antibióticos

35 antitumorales, antimetabolitos, agentes alquilantes, enzimas, inhibidores de proteasoma o cualquier combinación de los mismos.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usa en esta invención se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno). El término también se refiere a anticuerpos compuestos por dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, así como una variedad de formas que incluyen anticuerpos de longitud completa y porciones de los mismos; incluyendo, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv unido por disulfuro, un scFv, un anticuerpo

40 de dominio único (dAb), un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico doble, un anticuerpo anti-idiotípico, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de unión a epítipo funcionalmente activo del mismo, anticuerpos híbridos bifuncionales (por ejemplo, Lanzavecchia y col., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) y cadenas individuales (por ejemplo, Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 85, 5879-5883 (1988) y Bird y col., Science 242, 423-426 (1988)). (Ver, en general, Hood y col., Immunology, Benjamin, N.Y., 2^a ed. (1984); Harlow y

45 Lane, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Hunkapiller y Hood, Nature, 323, 15-16 (1986)). El anticuerpo puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgE o IgD). Preferiblemente, el anticuerpo es IgG. Un anticuerpo puede ser no humano (por ejemplo, de ratón, cabra o cualquier otro animal), completamente humano, humanizado o quimérico.

- 55 El término "constante de disociación", también conocido como "K_d", se refiere a una cantidad que expresa el grado en que una sustancia particular se separa en componentes individuales (por ejemplo, el vehículo proteico, el anticuerpo y el agente terapéutico opcional).

Los términos "liofilizado", "liofilización" y similares, como se usan en esta invención, se refieren a un procedimiento por el cual el material (por ejemplo, nanopartículas) a secar se congela primero y a continuación el hielo o el solvente congelado se eliminan por sublimación en un ambiente al vacío. Un excipiente se incluye opcionalmente en formulaciones pre-liofilizadas para mejorar la estabilidad del producto liofilizado tras el almacenamiento. En algunas

60

realizaciones, las nanopartículas pueden formarse a partir de componentes liofilizados (proteína vehículo, anticuerpo y agente terapéutico opcional) antes de su uso como agente terapéutico. En otras realizaciones, la proteína vehículo, el anticuerpo y el agente terapéutico opcional se combinan primero en nanopartículas y a continuación se liofilizan. La muestra liofilizada puede contener además excipientes adicionales.

5

El término "agentes de carga" comprende agentes que proporcionan la estructura del producto liofilizado. Los ejemplos comunes utilizados para los agentes de carga incluyen manitol, glicina, lactosa y sacarosa. Además de proporcionar una torta farmacéuticamente elegante, los agentes de carga también pueden impartir cualidades útiles con respecto a la modificación de la temperatura de colapso, proporcionando protección contra congelación y descongelación y mejorando la estabilidad de la proteína durante el almacenamiento a largo plazo. Estos agentes también pueden servir como modificadores de tonicidad.

10

El término "tampón" abarca aquellos agentes que mantienen el pH de la solución en un intervalo aceptable antes de la liofilización y puede incluir succinato (sodio o potasio), histidina, fosfato (sodio o potasio), Tris(tris(hidroximetil)aminometano), dietanolamina, citrato (sodio) y similares. El tampón de esta invención tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5; y preferiblemente tiene un pH de aproximadamente 6,0. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH en este intervalo incluyen succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros tampones ácidos orgánicos.

15

El término "crioprotectores" generalmente incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína frente a tensiones inducidas por congelación, presumiblemente al estar preferentemente excluidos de la superficie de la proteína. También pueden ofrecer protección durante el secado primario y secundario, y el almacenamiento de productos a largo plazo. Ejemplos son polímeros tales como dextrano y polietilenglicol; azúcares tales como sacarosa, glucosa, trehalosa y lactosa; tensioactivos tales como polisorbatos; y aminoácidos tales como glicina, arginina y serina.

20

El término "lioprotector" incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína durante el procedimiento de secado o 'deshidratación' (ciclos de secado primario y secundario), presumiblemente al proporcionar una matriz vítrea amorfa y al unirse con la proteína mediante enlaces de hidrógeno, reemplazando las moléculas de agua que se eliminan durante el procedimiento de secado. Esto ayuda a mantener la conformación de la proteína, minimizar la degradación de la proteína durante el ciclo de liofilización y mejorar los productos a largo plazo. Los ejemplos incluyen polioles o azúcares tales como sacarosa y trehalosa.

25

El término "formulación farmacéutica" se refiere a preparaciones que están en tal forma que permiten que los ingredientes activos sean efectivos, y que no contiene componentes adicionales que sean tóxicos para los sujetos a los que se administraría la formulación.

30

Los excipientes "farmacéuticamente aceptables" (vehículos, aditivos) son aquellos que pueden administrarse razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis efectiva del ingrediente activo utilizado.

35

El "tiempo de reconstitución" es el tiempo que se requiere para rehidratar una formulación liofilizada con una solución a una solución clarificada sin partículas.

Una formulación "estable" es aquella en la que la proteína en su interior retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras el almacenamiento.

40

El término "epítipo" como se usa en esta invención se refiere a la porción de un antígeno que es reconocido por un anticuerpo. Los epítipos incluyen, pero no se limitan a, una secuencia de aminoácidos corta o péptido (opcionalmente glicosilado o modificado de otra manera) que permite una interacción específica con una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) o ligando. Por ejemplo, un epítipo puede ser parte de una molécula a la que se une el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo.

45

El término "tratar" o "tratamiento" cubre el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) en un sujeto, como un ser humano, e incluye: (i) inhibir una enfermedad o trastorno, es decir, detener su desarrollo; (ii) aliviar una enfermedad o trastorno, es decir, causar una regresión del trastorno; (iii) desacelerar la progresión del trastorno; y/o (iv) inhibir, aliviar o retrasar la progresión de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno. En algunas realizaciones, "tratar" o "tratamiento" se refiere a la destrucción de células cancerosas.

50

El término "matar" con respecto a un tratamiento contra el cáncer está dirigido a incluir cualquier tipo de manipulación que conduzca a la muerte de esa célula cancerosa o al menos de una parte de una población de células cancerosas.

55

Además, algunos términos utilizados en esta memoria descriptiva se definen más específicamente a continuación.

60

Visión General

La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que, opcionalmente, las nanopartículas liofilizadas que comprenden una proteína vehículo, un anticuerpo y un agente terapéutico proporcionan terapia dirigida a un tumor al tiempo que minimizan la toxicidad para el paciente. Las nanopartículas como se describen en esta invención son, por lo tanto, una mejora significativa frente a las ADC convencionales.

Para que las ADC convencionales sean efectivas, es crítico que el conector sea lo suficientemente estable como para no disociarse en la circulación sistémica, sino que permita la liberación suficiente del fármaco en el sitio del tumor.

Alley, SC, y col. (2008) Bioconjug Chem 19: 759-765. Esto ha demostrado ser un obstáculo importante en el desarrollo de conjugado efectivo de fármacos (Julien, DC, y col. (2011) MABs 3: 467-478; Alley, SC, y col. (2008) Bioconjug Chem 19: 759-765); por lo tanto, una característica atractiva del conjugado nanoimmune es que no se requiere un conector bioquímico.

Otra deficiencia de las ADC actuales es que una mayor penetración del fármaco en el tumor no se ha probado de manera sustancial en tumores humanos. Pruebas tempranas de ADC en modelos de ratón sugirieron que el ataque al tumor con anticuerpos daría como resultado una concentración más alta del agente activo en el tumor (Deguchi, T. y col. (1986) Cancer Res 46: 3751-3755); sin embargo, esto no se ha correlacionado en el tratamiento de la enfermedad humana, probablemente porque los tumores humanos tienen una permeabilidad mucho más heterogénea que los tumores de ratón. Jain, RK y col. (2010) Nat Rev Clin Oncol 7:653-664. Además, el tamaño de la nanopartícula es crítico para la extravasación de la vasculatura hacia el tumor. En un estudio en ratones con un modelo de xenotrasplante de adenocarcinoma de colon humano, los poros vasculares eran permeables a liposomas de hasta 400 nm. Yuan, F. y col. (1995) Cancer Res 55: 3752-3756. Otro estudio sobre el tamaño de los poros del tumor y la permeabilidad demostró que ambas características dependían de la ubicación del tumor y el estado de crecimiento, con tumores en regresión y tumores craneales permeables a partículas de menos de 200 nm. Hobbs, S.K., y coll. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:4607-4612. El conjugado nanoimmune descrito en esta invención supera este problema por el hecho de que el complejo grande, que está intacto a menos de 200 nm, se disocia parcialmente en la circulación sistémica en conjuntos funcionales más pequeños que pueden penetrar fácilmente el tejido tumoral. Además, una vez que el conjugado llega al sitio del tumor, se puede liberar la carga útil tóxica más pequeña y solo la porción tóxica necesita ser absorbida por las células tumorales, no todo el conjugado.

La llegada de las nanopartículas de albúmina recubiertas con anticuerpos (es decir, AVASTIN®) que contienen un agente terapéutico (es decir, ABRAXANE®) ha llevado a un nuevo paradigma de suministro direccional de dos o más agentes terapéuticos a un sitio predeterminado *in vivo*. Ver Publicaciones de Patentes PCT Nos. WO 2012/154861 y WO 2014/055415.

Cuando las composiciones de albúmina y un anticuerpo se mezclan juntas en una solución acuosa a concentraciones y proporciones específicas, los anticuerpos se autoensamblan espontáneamente en y sobre la albúmina para formar nanopartículas que tienen múltiples copias del anticuerpo (hasta 500 o más). Sin limitarse a ninguna teoría, se contempla que la porción del receptor de antígeno del anticuerpo se coloca hacia afuera de la nanopartícula mientras que la cola hidrófoba se integra en la albúmina por interacciones hidrófobas - hidrófobas.

Si bien las composiciones de proteínas que comprenden una proteína de fuente única se almacenan comúnmente en forma liofilizada donde exhiben una vida útil significativa, tales composiciones liofilizadas no contienen una nanopartícula autoensamblada de dos proteínas diferentes integradas entre sí por interacciones hidrófobas-hidrófobas. Además, la configuración de nanopartículas donde la mayoría de las porciones de unión de anticuerpos están expuestas en la superficie de las nanopartículas se presta a ser susceptible de desplazamiento o reconfiguración por condiciones que de otro modo se considerarían benignas. Por ejemplo, durante la liofilización, las cargas iónicas en las proteínas se deshidratan, exponiendo así las cargas subyacentes. Las cargas expuestas permiten interacciones carga-carga entre las dos proteínas que pueden alterar la afinidad de unión de cada proteína a la otra. Además, la concentración de las nanopartículas aumenta significativamente a medida que se elimina el disolvente (por ejemplo, agua). Tales concentraciones aumentadas de nanopartículas podrían conducir a una oligomerización irreversible. La oligomerización es una propiedad conocida de las proteínas que reduce las propiedades biológicas del oligómero en comparación con la forma monomérica y aumenta el tamaño de la partícula a veces más allá de 1 micra.

Por otro lado, se requiere una forma estable de una composición de nanopartículas para uso clínico y/o comercial donde se requiere una vida útil de al menos 3 meses y se prefieren vidas superiores a 6 meses o 9 meses. Dicha composición estable debe estar fácilmente disponible para inyección intravenosa, debe retener su forma autoensamblada tras la inyección intravenosa para dirigir la nanopartícula al sitio predeterminado *in vivo*, debe tener un tamaño máximo de menos de 1 micra para evitar cualquier evento isquémico cuando se administra al torrente sanguíneo, y finalmente debe ser compatible con la composición acuosa utilizada para inyección.

Compuestos

Como será evidente para el experto en la materia al leer esta descripción, la presente descripción se refiere a composiciones de nanopartículas que contienen una proteína vehículo, anticuerpos, y opcionalmente al menos un agente terapéutico, donde dichas composiciones se liofilizan opcionalmente.

La proteína vehículo puede ser albúmina, gelatina, elastina (incluida la topoelastina) o polipéptidos derivados de elastina (por ejemplo, α -elastina y polipéptidos similares a elastina (ELP)), gliadina, legumina, zeína, proteína de soja (por ejemplo, aislado de proteína de soja (SPI)), proteína de la leche (por ejemplo, β -lactoglobulina (BLG) y caseína) o proteína de suero (por ejemplo, concentrados de proteína de suero (WPC) y aislados de proteína de suero (WPI)). En una realización preferida de la invención, la proteína vehículo es la albúmina. En realizaciones preferidas de la invención, la albúmina es clara de huevo (ovoalbúmina), albúmina de suero bovino (BSA) o similares. En realizaciones aún más preferidas de la invención, la proteína vehículo es albúmina de suero humano (HSA). En algunas realizaciones, la proteína vehículo es generalmente considerada un excipiente seguro (GRAS) aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA).

En algunas realizaciones, los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en ado-trastuzumab emtansine, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, denosumab, dinutuximab, ipilimumab, nivolumab, obinutuzumab, ofatumumab, panitumumab, pembrolizumab, pertuzumab, rituximab y trastuzumab. En algunas realizaciones, los anticuerpos son una capa sustancialmente única de anticuerpos en toda o parte de la superficie de la nanopartícula.

La Tabla 1 representa una lista de la lista no limitante de anticuerpos.

Tabla 1: Anticuerpos

Anticuerpos		
	Biológico	Tratamiento (s)/Diana (s)
Anticuerpos monoclonales (MAb)	Rituximab (Rituxan®)	Linfoma no Hodgkin
	Alemtuzumab (Campath®)	Leucemia linfocítica crónica (CLL)
	Ipilimumab (Yervoy®)	Melanoma metastásico
	Bevacizumab (Avastin®)	Cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer de ovario, glioblastoma multiforme
	Cetuximab (Erbix®)	Cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de la cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, glioblastoma, epitelio ovárico, trompa de Falopio o cáncer peritoneal primario, cáncer de células renales
	Panitumumab (Vectibix®)	Cáncer colorrectal
	Trastuzumab (Herceptin®)	Cáncer de mama, Adenocarcinoma
	⁹⁰ Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin®)	Linfoma no Hodgkin
	Ado-trastuzumab emtansine (Kadcycla®, también llamado TDM-1)	Cáncer de mama
	Brentuximab vedotin (Adcetris®)	Linfoma de Hodgkin, linfoma anaplásico de células grandes
	Blinatumomab (Blincyto)	Leucemia linfocítica aguda (ALL)
	Pembrolizumab (Keytruda®)	PD-1 (melanoma, cáncer de pulmón no microcítico)
	Nivolumab (Opdivo®)	PD-1 (melanoma, cáncer de pulmón no microcítico)
	Ofatumumab (Arzerra®)	Leucemia linfocítica crónica (CLL)
	Pertuzumab (Perjeta®)	Cáncer de mama
	Obinutuzumab (Gazyva®)	Linfoma

Anticuerpos		
	Biológico	Tratamiento (s)/Diana (s)
	Dinutuximab (Unituxin®)	Neuroblastoma
	Denosumab (Prolia®)	Metástasis óseas, mieloma múltiple, tumor óseo de células gigantes

El al menos un agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en abiraterone, bendamustine, bortezomib, carboplatin, cabazitaxel, cisplatin, chlorambucil, dasatinib, docetaxel, doxorubicin, epirubicin, erlotinib, 5 etoposide, everolimus, gefitinib, idarubicin, imatinib, hydroxyurea, imatinib, lapatinib, leuprorelin, melphalan, methotrexate, mitoxantrone, nedaplatin, nilotinib, oxaliplatin, paclitaxel, pazopanib, pemetrexed, picoplatin, romidepsin, satraplatin, sorafenib, vemurafenib, sunitinib, teniposide, triplatin, vinblastine, vinorelbine, vincristine y ciclofosfamida.

La Tabla 2 representa una lista de la lista no limitante de agentes terapéuticos contra el cáncer.

10

Tabla 2: Agentes terapéuticos contra el cáncer

Fármacos contra el cáncer	
Fármaco	Diana (s)
Abitrexato (metotrexato)	Leucemia linfoblástica aguda; cáncer de mama; enfermedad trofoblástica gestacional, cáncer de la cabeza y cuello; cáncer de pulmón; micosis fungoide; linfoma no Hodgkin; osteosarcoma
Abraxane (formulación de nanopartículas estabilizadas con albúmina de Paclitaxel)	Cáncer de mama; cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de páncreas
ABVD (Adriamicina, bleomicina, sulfato de vinblastina, dacarbazina)	Linfoma de Hodgkin
ABVE (Adriamicina, bleomicina, sulfato de vincristina, etopósido)	Linfoma de Hodgkin (en niños)
ABVE-PC (Adriamicina, bleomicina, sulfato de vincristina, etopósido, prednisona, ciclofosfamida)	Linfoma de Hodgkin (en niños)
AC (ciclofosfamida de adriamicina)	Cáncer de mama
AC-T (Adriamicina, ciclofosfamida, Taxol)	Cáncer de mama
Adcetris (Brentuximab Vedotin)	Linfoma anaplásico de células grandes; linfoma de Hodgkin
ADE (citarabina (Ara-C), clorhidrato de daunorubicina, etopósido)	Leucemia mieloide aguda (en niños)
Ado-Trastuzumab Emtansina	Cáncer de mama
Adriamicina (clorhidrato de doxorubicina)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; cáncer de mama, cáncer gástrico (estómago); Linfoma de Hodgkin; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de ovarios; cáncer de pulmón microcítico; sarcomas de tejidos blandos y óseos; cáncer de tiroides; cáncer de vejiga de células transicionales; Tumor de Wilms
Adrucilo (Fluorouracilo)	Carcinoma de células basales; cáncer de mama; cáncer colonrectal; adenocarcinoma gástrico (estómago); cáncer de páncreas; carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello

Fármacos contra el cáncer	
Fármaco	Diana (s)
Dimaleato de afatinib	Cáncer de pulmón no microcítico
Afinitor (Everolimus)	Cáncer de mama, cáncer de páncreas; carcinoma de células renales; astrocitoma subependimal de células gigantes
Alimta (Pemetrexed Disódico)	Mesotelioma pleural maligno; cáncer de pulmón no microcítico
Amboclorina (Clorambucil)	Leucemia linfocítica crónica; linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin
Anastrozol	Cáncer de mama
Aredia (Pamidronato disódico)	Cáncer de mama; mieloma múltiple
Arimidex (anastrozol)	Cáncer de mama
Aromasina (Exemestano)	Cáncer de mama avanzado; cáncer de mama en etapa temprana y receptor de estrógeno positivo
Arranon (Nelarabina)	Leucemia linfoblástica aguda de células T; linfoma linfoblástico de células T
Azacitidina	Síndromes mielodisplásicos
BEACOPP	Linfoma de Hodgkin
Becenum (Carmustine)	Tumores cerebrales; linfoma de Hodgkin; mieloma múltiple; linfoma no Hodgkin
Beleodaq (Belinostat)	Linfoma de células T periféricas
BEP	Tumores de células germinales de ovario; tumores de células germinales testiculares
Bicalutamida	Cáncer de próstata
BiCNU (Carmustine)	Tumores cerebrales; linfoma de Hodgkin; mieloma múltiple; linfoma no Hodgkin
Bleomicina	Linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin; cáncer de pene carcinoma de células escamosas del cuello uterino; carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello; carcinoma de células escamosas de la vulva; cáncer testicular
Bosulif (Bosutinib)	Leucemia mielógena crónica
Brentuximab Vedotin	Linfoma anaplásico de células grandes; linfoma de Hodgkin
Busulfan	Leucemia mielógena crónica
Busulfex (Busulfan)	Leucemia mielógena crónica
Cabozantinib-S-malato	Cáncer medular de tiroides
CAF	Cáncer de mama
Camptosar (clorhidrato de irinotecán)	Cáncer colorrectal
CAPOX	Cáncer colorrectal
Carfilzomib	Mieloma múltiple
Casodex (Bicalutamida)	Cáncer de próstata
CeeNU (Lomustine)	Tumores cerebrales; linfoma de Hodgkin
Ceritinib	Cáncer de pulmón no microcítico
Cerubidina (clorhidrato de daunorrubicina)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda
Clorambucilo	Leucemia linfocítica crónica; linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin
CLORAMBUCILO-PREDNISONA	Leucemia linfocítica crónica

Fármacos contra el cáncer	
Fármaco	Diana (s)
CHOP	Linfoma no Hodgkin
Cisplatín	Cáncer de vejiga; cáncer de cuello uterino; mesotelioma maligno; cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de ovarios; carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello; cáncer testicular
Clafen (ciclofosfamida)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; cáncer de mama; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; Linfoma de Hodgkin; mieloma múltiple; micosis fungoide; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de ovarios; retinoblastoma
Clofarex (Clofarabina)	Leucemia linfoblástica aguda
CMF	Cáncer de mama
Cometriq (Cabozantinib-S-malato)	Cáncer medular de tiroides
COPP	Linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin
COPP-ABV	Linfoma de Hodgkin
Cosmegen (Dactinomicina)	Sarcoma de Ewing; enfermedad trofoblástica gestacional; rabdomiosarcoma; tumores sólidos; cáncer testicular; tumor de Wilms
CVP	linfoma no Hodgkin; leucemia linfocítica crónica
Ciclofosfamida	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; cáncer de mama; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; linfoma de Hodgkin; mieloma múltiple; micosis fungoide; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de ovarios; retinoblastoma
Cyfos (ifosfamida)	Tumores de células germinales testiculares
Cyramza (Ramucirumab)	Adenocarcinoma; cáncer colonrectal; cáncer de pulmón no microcítico
Citarabina	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; leucemia mielógena crónica; leucemia meníngea
Cytosar-U (citarabina)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; leucemia mielógena crónica; leucemia meníngea
Cytosan (ciclofosfamida)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; cáncer de mama; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; linfoma de Hodgkin; mieloma múltiple; micosis fungoide; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de ovarios; retinoblastoma
Dacarbazina	Linfoma de Hodgkin; melanoma
Dacogen (Decitabina)	Síndromes mielodisplásicos
Dactinomicina	Sarcoma de Ewing; enfermedad trofoblástica gestacional; rabdomiosarcoma; tumores sólidos; cáncer testicular; tumor de Wilms
Clorhidrato de daunorrubicina	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda
Degarelix	Cáncer de próstata
Denileukin Diftitox	Linfoma de células T cutáneas
Denosumab	Tumor de células gigantes del hueso; cáncer de mama, cáncer de próstata
DepoCyt (Citarabina liposomal)	Meningitis linfomatosa
DepoFoam (Citarabina liposomal)	Meningitis linfomatosa
Docetaxel	Cáncer de mama; adenocarcinoma del estómago o unión gastroesofágica; cáncer

Fármacos contra el cáncer	
Fármaco	Diana (s)
	de pulmón no microcítico; cáncer de próstata; carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello
Doxil (liposoma de clorhidrato de doxorubicina)	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; mieloma múltiple; cáncer de ovarios
Clorhidrato de doxorubicina	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; cáncer de mama; cáncer gástrico (estómago); Linfoma de Hodgkin; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de ovarios; cáncer de pulmón microcítico; sarcomas de tejidos blandos y óseos; cáncer de tiroides; cáncer de vejiga de células transicionales; tumor de Wilms.
Doxil-SL (liposoma de clorhidrato de doxorubicina)	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; mieloma múltiple; cáncer de ovarios
DTIC-Dome (Dacarbazina)	Linfoma de Hodgkin; melanoma
Efudex (fluorouracilo)	Carcinoma de células basales; cáncer de mama; cáncer colonrectal; adenocarcinoma gástrico (estómago); cáncer de páncreas; carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello
Ellence (clorhidrato de epirubicina)	Cáncer de mama
Eloxatina (oxaliplatino)	Cáncer colonrectal; cáncer de colon en estadio III
Emend (Aprepitant)	Náuseas y vómitos causados por quimioterapia y náuseas y vómitos después de cirugía.
Enzalutamida	Cáncer de próstata
Clorhidrato de epirubicina	Cáncer de mama
EPOCH	Linfoma no Hodgkin
Erbitux (Cetuximab)	Cáncer colonrectal; carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello
Mesilato de eribulina	Cáncer de mama
Erivedge (Vismodegib)	Carcinoma de células basales
Clorhidrato de erlotinib	Cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de páncreas
Erwinaze (Asparaginase Erwinia chrysanthemi)	Leucemia linfoblástica aguda
Etopófos (fosfato de etopósido)	Cáncer de pulmón microcítico; cáncer testicular
Evacet (Liposoma de clorhidrato de doxorubicina)	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; mieloma múltiple; cáncer de ovarios
Everolimus	Cáncer de mama, cáncer de páncreas; carcinoma de células renales; astrocitoma subependimal de células gigantes
Evista (Clorhidrato de raloxifeno)	Cáncer de mama
Exemestano	Cáncer de mama
Fareston (Toremifeno)	Cáncer de mama
Farydak (Panobinostat)	Mieloma múltiple
Faslodex (Fulvestrant)	Cáncer de mama
FEC	Cáncer de mama
Femara (letrozol)	Cáncer de mama

Fármacos contra el cáncer	
Fármaco	Diana (s)
Filgrastim	Neutropenia
Fludara (fosfato de fludarabina)	Leucemia linfocítica crónica
Fluoroplex (fluorouracilo)	Carcinoma de células basales; cáncer de mama; cáncer colorrectal; adenocarcinoma gástrico (estómago); cáncer de páncreas; carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello
Folex (metotrexato)	Leucemia linfoblástica aguda; cáncer de mama; enfermedad trofoblástica gestacional; cáncer de la cabeza y cuello; cáncer de pulmón; micosis fungoide; linfoma no Hodgkin; osteosarcoma
FOLFIRI	Cáncer colorrectal
FOLFIRI-BEVACIZUMAB	Cáncer colorrectal
FOLFIRI-CETUXIMAB	Cáncer colorrectal
FOLFIRINOX	Cáncer pancreático
FOLFOX	Cáncer colorrectal
Folotylin (pralatrexato)	Linfoma de células T periféricas
FU-LV	Cáncer colorrectal; cáncer de esófago; cáncer gástrico
Fulvestrant	Cáncer de mama
Gefitinib	Cáncer de pulmón no microcítico
Clorhidrato de gemcitabina	Cáncer de mama; cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de ovarios; cáncer de páncreas
GEMCITABINA-CISPLATINA	Cáncer del tracto biliar; cáncer de vejiga; cáncer de cuello uterino; mesotelioma maligno; cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de ovarios; cáncer de páncreas
GEMCITABINA-OXALIPLATINA	Cáncer pancreático
Gemtuzumab Ozogamicina (conjugado de fármacos de anticuerpos)	Leucemia mieloide aguda
Gemzar (clorhidrato de gemcitabina)	Cáncer de mama; cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de ovarios; cáncer de páncreas
Gilotrif (dimaleato de afatinib)	Cáncer de pulmón no microcítico
Gleevec (mesilato de imatinib)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia eosinofílica crónica o síndrome hipereosinofílico; leucemia mielógena crónica; dermatofibrosarcoma protuberans; tumor del estroma gastrointestinal; neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas; mastocitosis sistémica
Gliadel (Carmustine Implant)	Glioblastoma multiforme; glioma maligno
Acetato de goserelina	Cáncer de mama; cáncer de próstata
Halaven (mesilato de eribulina)	Cáncer de mama
Hycamtin (clorhidrato de topotecan)	Cáncer de cuello uterino; cáncer de ovarios; cáncer de pulmón microcítico
Hyper-CVAD	Leucemia linfoblástica aguda; linfoma no Hodgkin
Ibrance (Palbociclib)	Cáncer de mama
Ibrutinib	Leucemia linfocítica crónica; linfoma de células del manto;
ICE	Linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin

Fármacos contra el cáncer		
Fármaco		Diana (s)
Iclusig (clorhidrato de ponatinib)	de	Leucemia linfoblástica aguda; lmielógena crónica
Idamicina (Clorhidrato de Idarubicina)	de	Leucemia mieloide aguda
Mesilato de Imatinib		Leucemia linfoblástica aguda; leucemia eosinofílica crónica o síndrome hipereosinofílico; leucemia mielógena crónica; dermatofibrosarcoma protuberans; tumor del estroma gastrointestinal; neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas; mastocitosis sistémica
Imbruvica (Ibrutinib)		Leucemia linfocítica crónica; linfoma de células del manto; macroglobulinemia de Waldenström
Inlyta (Axitinib)		Carcinomas de células renales
Iressa (Gefitinib)		Cáncer de pulmón no microcítico
Clorhidrato de irinotecan		Cáncer colorrectal
Istodax (Romidepsina)		Linfoma de células T cutáneas
Ixempra (Ixabepilone)		Cáncer de mama
Jevtana (Cabazitaxel)		Cáncer de próstata
Keoxifene (Clorhidrato de raloxifeno)	de	Cáncer de mama
Kyprolis (Carfilzomib)		Mieloma múltiple
Lenvima (mesilato de lenvatinib)	de	Cáncer de tiroides
Letrozole		Cáncer de mama
Leucovorin Cálcico		Cáncer colorrectal
Leukeran (clorambucilo)		Leucemia linfocítica crónica; linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin
Acetato de leuprolida		Cáncer de próstata
Linfolizin (clorambucilo)		Leucemia linfocítica crónica; linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin
LipoDox (Liposoma de clorhidrato de doxorubicina)	de	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; mieloma múltiple; cáncer de ovarios
Lomustina		Tumores cerebrales; linfoma de Hodgkin
Lupron (acetato de leuprolida)		Cáncer de próstata
Lynparza (Olaparib)		Cáncer de ovario
Marqibo (liposoma de sulfato de vincristina)		Leucemia linfoblástica aguda
Matulane (clorhidrato de procarbazona)	de	Linfoma de Hodgkin
Clorhidrato de mecloretamina		Carcinoma broncogénico; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; Linfoma de Hodgkin; derrame pleural maligno, derrame pericárdico maligno y derrame peritoneal maligno; micosis fungoide; linfoma no Hodgkin
Megace (acetato de megestrol)		Cáncer de mama; cáncer endometrial
Mekinist (Trametinib)		Melanoma
Mercaptopurina		Leucemia linfoblástica aguda
Mesnex (Mesna)		Cistitis hemorrágica

Fármacos contra el cáncer	
Fármaco	Diana (s)
Metazolastone (temozolomida)	Astrocitoma anaplásico; glioblastoma multiforme
Mexate (metotrexato)	Leucemia linfoblástica aguda; cáncer de mama; enfermedad trofoblástica gestacional; cáncer de la cabeza y cuello; cáncer de pulmón; micosis fungoide; linfoma no Hodgkin; osteosarcoma
Mexate-AQ (metotrexato)	Leucemia linfoblástica aguda; cáncer de mama; enfermedad trofoblástica gestacional; cáncer de la cabeza y cuello; cáncer de pulmón; micosis fungoide; linfoma no Hodgkin; osteosarcoma
Clorhidrato de mitoxantrona	Leucemia mieloide aguda; cáncer de próstata
Mitozytrex (Mitomicina C)	Adenocarcinoma gástrico (estómago) y pancreático
MOPP	Linfoma de Hodgkin
Mozobil (Plerixafor)	Mieloma múltiple; linfoma no Hodgkin
Mustargen (clorhidrato de mecloretamina)	Carcinoma broncogénico; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; Linfoma de Hodgkin; derrame pleural maligno, derrame pericárdico maligno y derrame peritoneal maligno; micosis fungoide; linfoma no Hodgkin
Myleran (Busulfan)	Leucemia mielógena crónica
Mylotarg (Gemtuzumab Ozogamicin)	Leucemia mieloide aguda
Nanoparticle Paclitaxel (formulación de nanopartículas estabilizadas con albúmina de Paclitaxel)	Cáncer de mama; cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de páncreas
Navelbine (tartrato de vinorelbina)	Cáncer de pulmón no microcítico
Nelarabina	Leucemia linfoblástica aguda de células T
Neosar (ciclofosfamida)	Leucemia linfoblástica aguda; Leucemia mieloide aguda; Cáncer de mama; Leucemia linfocítica crónica; Leucemia mielógena crónica; Linfoma de Hodgkin; Mieloma múltiple; Micosis fungoide; Neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; Cáncer de ovarios; Retinoblastoma
Nexavar (tosilato de sorafenib)	Carcinoma hepatocelular; Carcinoma de células renales; Cáncer de tiroides
Nilotinib	Leucemia mielógena crónica
Nivolumab	Melanoma; Cáncer de pulmón escamoso no microcítico
Nolvadex (citrato de tamoxifeno)	Cáncer de mama
Odomzo (Sonidegib)	Carcinoma de células basales
OEPA	Linfoma de Hodgkin
OFF	Cáncer pancreático
Olaparib	Cáncer de ovario
Oncaspar (Pegaspargase)	Leucemia linfoblástica aguda
OPPA	Linfoma de Hodgkin
Oxaliplatin	Cáncer colonrectal; cáncer de colon en estadio III
Paclitaxel	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; Cáncer de mama; Cáncer de pulmón no microcítico; Cáncer de ovarios
Formulación de nanopartículas	Cáncer de mama; cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de páncreas

Fármacos contra el cáncer	
Fármaco	Diana (s)
estabilizadas con albúmina de Paclitaxel	
PAD	Mieloma múltiple
Palbociclib	Cáncer de mama
Pamidronato disódico	Cáncer de mama; mieloma múltiple
Panitumumab	Cáncer colorrectal
Panobinostat	Mieloma múltiple
Paraplat (carboplatino)	Cáncer de pulmón no microcítico; Cáncer de ovarios
Paraplatino (carboplatino)	Cáncer de pulmón no microcítico; Cáncer de ovarios
Clorhidrato de pazopanib	Carcinoma de células renales; Sarcoma de tejidos blandos
Pegaspargase	Leucemia linfoblástica aguda
Disodio de pemetrexed	Mesotelioma pleural maligno; Cáncer de pulmón no microcítico
Platinol (cisplatino)	Cáncer de vejiga; Cáncer de cuello uterino; Mesotelioma maligno; Cáncer de pulmón no microcítico; Cáncer de ovarios; Carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello; cáncer testicular
Platinal-AQ (Cisplatin)	Cáncer de vejiga; Cáncer de cuello uterino; Mesotelioma maligno; Cáncer de pulmón no microcítico; Cáncer de ovarios; Carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello; cáncer testicular
Plerixafor	Mieloma múltiple; linfoma no Hodgkin
Pomalidomid	Mieloma múltiple
Pomalista (Pomalidomida)	Mieloma múltiple
Clorhidrato de pontinib	Leucemia linfoblástica aguda; Imielógena crónica
Pralatrexato	Linfoma de células T periféricas
Prednisona	Leucemia linfoblástica aguda; Leucemia linfocítica crónica; Linfoma de Hodgkin; Mieloma múltiple; linfoma no Hodgkin; cáncer de próstata; Timoma y carcinoma tímico
Clorhidrato de procarbazona	Linfoma de Hodgkin
Provenge (Sipuleucel-T)	Cáncer de próstata
Purinethol (mercaptopurina)	Leucemia linfoblástica aguda
Dicloruro de radio 223	Cáncer de próstata
Clorhidrato de raloxifeno	Cáncer de mama
R-CHOP	Linfoma no Hodgkin
R-CVP	Linfoma no Hodgkin
Regorafenib	Cáncer colonrectal; Tumor del estroma gastrointestinal
R-EPOCH	Linfoma no Hodgkin de células B
Revlimid (Lenalidomida)	Linfoma de células del manto; Mieloma múltiple; Anemia
Rheumatrex (metotrexato)	Leucemia linfoblástica aguda; Cáncer de mama; Enfermedad trofoblástica gestacional; Cáncer de la cabeza y cuello; Cáncer de pulmón; linfoma no Hodgkin; Osteosarcoma
Romidepsina	Linfoma de células T cutáneas

Fármacos contra el cáncer	
Fármaco	Diana (s)
Rubidomicina (clorhidrato de daunorrubicina)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda
Sipuleucel-T	Cáncer de próstata
Depósito de Somatulina (acetato de lanreotida)	Tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos
Sonidegib	Carcinoma de células basales
Tosilato de sorafenib	Carcinoma hepatocelular; Carcinoma de células renales; Cáncer de tiroides
Sprycel (Dasatinib)	Leucemia linfoblástica aguda; Imielógena crónica
STANFORD V	Linfoma de Hodgkin
Stivarga (Regorafenib)	Cáncer colonrectal; Tumor del estroma gastrointestinal
Malato de sunitnib	Tumor estromal gastrointestinal; Cáncer de páncreas; Carcinoma de células renales
Sutent (malato de sunitinib)	Tumor estromal gastrointestinal; Cáncer de páncreas; Carcinoma de células renales
Synovir (talidomida)	Mieloma múltiple
Synribo (mepesuccinato de omacetaxina)	Leucemia mielógena crónica
TAC	Cáncer de mama
Tafinlar (Dabrafenib)	Melanoma
Citrato de tamoxifeno	Cáncer de mama
Tarabine SLP (citarabina)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; leucemia mielógena crónica
Tarceva (clorhidrato de erlotinib)	Cáncer de pulmón no microcítico; Cáncer de páncreas
Targretina (Bexaroteno)	Problemas de la piel causados por linfoma de células T cutáneas
Tasigna (nilotinib)	Leucemia mielógena crónica
Taxol (paclitaxel)	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; Cáncer de mama; Cáncer de pulmón no microcítico; Cáncer de ovarios
Taxotere (docetaxel)	Cáncer de mama; Adenocarcinoma; Cáncer de pulmón no microcítico; cáncer de próstata; Carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello.
Temodar (temozolomida)	Astrocitoma anaplásico; glioblastoma multiforme
Temozolomida	Astrocitoma anaplásico; glioblastoma multiforme
Thiotepa	Cáncer de vejiga; Cáncer de mama; Derrame pleural maligno, derrame pericárdico maligno y derrame peritoneal maligno; Cáncer de ovarios
Toposar (Etopósido)	Cáncer de pulmón microcítico; cáncer testicular
Clorhidrato de topotecan	Cáncer de cuello uterino; Cáncer de ovarios; Cáncer de pulmón microcítico
Toremifeno	Cáncer de mama
Torisel (Temsilolimus)	Carcinomas de células renales
TPF	Carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello; Cáncer gástrico (estomacal)
Trastuzumab	Adenocarcinoma; Cáncer de mama

Fármacos contra el cáncer	
Fármaco	Diana (s)
Treanda (clorhidrato de bendamustina)	linfoma no Hodgkin de células B; leucemia linfocítica crónica
Trisenox (trióxido de arsénico)	Leucemia promielocítica aguda
Tykerb (ditosilato de lapatinib)	Cáncer de mama
Vandetabib	Cáncer medular de tiroides
VAMP	Linfoma de Hodgkin
VelP	Célula germinal ovárica; cáncer testicular
Velban (sulfato de vinblastina)	Cáncer de mama; Coriocarcinoma; Linfoma de Hodgkin; Sarcoma de Kaposi; Fungoides micosidos; linfoma no Hodgkin; cáncer testicular
Velcade (Bortezomib)	Mieloma múltiple; Linfoma de células del manto
Velsar (sulfato de vinblastina)	Cáncer de mama; Coriocarcinoma; Linfoma de Hodgkin; Sarcoma de Kaposi; Micosis fungoide; linfoma no Hodgkin; cáncer testicular
VePesid (Etopósido)	Cáncer de pulmón microcítico; cáncer testicular
Viadur (acetato de leuprolida)	Cáncer de próstata
Vidaza (azacitidina)	Síndromes mielodisplásicos
Vincasar SLP (sulfato de vincristina)	Leucemia aguda; Linfoma de Hodgkin; Neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; Rabdomiosarcoma; Tumor de Wilms
Lliposoma de sulfato de vincristina	Leucemia linfoblástica aguda
Tartrato de vinorelbina	Cáncer de pulmón no microcítico
VIP	Cáncer testicular
Visbodegib	Carcinoma de células basales
Voraxaze (glucarpidasa)	Niveles tóxicos en sangre del fármaco contra el cáncer metotrexato
Votrient (clorhidrato de pazopanib)	Carcinoma de células renales; Sarcoma de tejidos blandos
Wellcovorin (Leucovorina cálcica)	Cáncer colonrectal; Anemia
Xalkori (crizotinib)	Cáncer de pulmón no microcítico
Xeloda (capecitabina)	Cáncer de mama; cáncer colonrectal
XELIRI	Cáncer colonrectal; cáncer de esófago; cáncer gástrico (estómago)
XELOX	Cáncer colorrectal
Xofigo (Dicloruro de radio 223)	Cáncer de próstata
Xtandi (Enzalutamida)	Cáncer de próstata
Zaltrap (Ziv-Aflibercept)	Cáncer colorrectal
Zelboraf (Vemurafenib)	Melanoma
Ziv-Aflibercept	Cáncer colorrectal
Zoladex (acetato de goserelina)	Cáncer de mama; cáncer de próstata
Zolinza (Vorinostat)	Linfoma de células T cutáneas
Zometa (ácido zoledrónico)	Mieloma múltiple

Fármacos contra el cáncer	
Fármaco	Diana (s)
Zydelig (Idelalisib)	Leucemia linfocítica crónica; Linfoma no Hodgkin (linfoma no Hodgkin de células B foliculares y linfoma linfocítico pequeño)
Zykadia (Certinib)	Cáncer de pulmón no microcítico
Zytiga (acetato de abiraterona)	Cáncer de próstata

Debe entenderse que el agente terapéutico puede estar ubicado dentro de la nanopartícula, en la superficie exterior de la nanopartícula, o en ambos. La nanopartícula puede contener más de un agente terapéutico, por ejemplo, dos
5 agentes terapéuticos, tres agentes terapéuticos, cuatro agentes terapéuticos, cinco agentes terapéuticos o más. Además, una nanopartícula puede contener agentes terapéuticos iguales o diferentes dentro y fuera de la nanopartícula.

En algunas realizaciones, cualquier proteína vehículo, anticuerpo, agente terapéutico o cualquier combinación de los
10 mismos está expresamente excluida. Por ejemplo, una composición puede comprender cualquier proteína vehículo y quimioterapéutica, excepto Abraxane® y/o cualquier anticuerpo dirigido, excepto bevacizumab.

En un aspecto, la nanopartícula comprende al menos 100 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende al menos 200 anticuerpos unidos de forma no covalente
15 a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende al menos 300 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende al menos 400 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende al menos 500 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto,
20 la nanopartícula comprende al menos 600 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula.

En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende entre
aproximadamente 200 y aproximadamente 1000 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 300 y aproximadamente 1000
25 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 400 y aproximadamente 1000 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 500 y aproximadamente 1000 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto,
30 la nanopartícula comprende entre aproximadamente 600 y aproximadamente 1000 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 200 y aproximadamente 800 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 300 y aproximadamente 800 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. En realizaciones preferidas de la invención, la nanopartícula comprende
entre aproximadamente 400 y aproximadamente 800 anticuerpos unidos de forma no covalente a la superficie de la nanopartícula. Los valores contemplados incluyen cualquier valor o subintervalo dentro de cualquiera de los intervalos
35 recitados, incluidos los puntos finales.

En un aspecto, el tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas es inferior a aproximadamente 1 μm . El tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas puede estar entre aproximadamente 130 nm
40 y aproximadamente 1 μm . El tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas puede estar entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 900 nm. En un aspecto, el tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas está entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 800 nm. En un aspecto, el tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas está entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 700 nm. En un aspecto, el tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas está entre aproximadamente 130
45 nm y aproximadamente 600 nm. En un aspecto, el tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas está entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 500 nm. En un aspecto, el tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas está entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 400 nm. En un aspecto, el tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas está entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 300 nm. En un aspecto, el tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas está
50 entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 200 nm. En una realización preferida de la invención, el tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas está entre aproximadamente 150 nm y aproximadamente 180 nm. En una realización especialmente preferida de la invención, el tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas es de aproximadamente 160 nm. Los valores contemplados incluyen cualquier valor, subintervalo o

intervalo dentro de cualquiera de los intervalos recitados, incluidos los puntos finales.

La composición de nanopartículas puede formularse para inyección intravenosa. Para evitar un evento isquémico, la composición de nanopartículas formulada para inyección intravenosa debe comprender nanopartículas con un tamaño de partícula promedio de menos de aproximadamente 1 μm .

El tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas puede ser mayor que aproximadamente 1 μm . El tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas puede estar entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 5 μm . El tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas puede estar entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 4 μm . El tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas puede estar entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 3 μm . El tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas puede estar entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 2 μm . El tamaño medio de partícula en la composición de nanopartículas puede estar entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 1,5 μm . Los valores contemplados incluyen cualquier valor, subintervalo o intervalo dentro de cualquiera de los intervalos recitados, incluidos los puntos finales.

La composición de nanopartículas puede formularse para inyección directa en un tumor. La inyección directa incluye la inyección en o cerca de un sitio tumoral, la perfusión en un tumor y similares. Cuando se formula para inyección directa en un tumor, la nanopartícula puede comprender cualquier tamaño de partícula promedio. Sin estar atados a la teoría, se cree que las partículas más grandes (por ejemplo, mayores de 500 nm, mayores de 1 μm , y similares) tienen más probabilidades de inmovilizarse dentro del tumor, lo que proporciona un efecto beneficioso. Partículas más grandes se pueden acumular en el tumor u órganos específicos. *Ver por ej.*, la partícula de vidrio de 20-60 micras que se usa para inyectar en la arteria hepática que se introduce en un tumor del hígado, llamada "therasphere®" (en uso clínico para el cáncer de hígado). Por lo tanto, para la administración intravenosa, se usan partículas de menos de 1 μm . Las partículas de más de 1 μm , más típicamente, se administran directamente en un tumor ("inyección directa") o en una arteria que se introduce en el sitio del tumor.

Menos del 0,01% de las nanopartículas dentro de la composición pueden tener un tamaño de partícula mayor que 200 nm, mayor que 300 nm, mayor que 400 nm, mayor que 500 nm, mayor que 600 nm, mayor que 700 nm o mayor que 800 nm. Menos de aproximadamente el 0,001% de las nanopartículas dentro de la composición pueden tener un tamaño de partícula mayor que 200 nm, mayor que 300 nm, mayor que 400 nm, mayor que 500 nm, mayor que 600 nm, mayor que 700 nm o mayor que 800 nm. En una realización preferida de la invención, menos de aproximadamente el 0,01% de las nanopartículas dentro de la composición tienen un tamaño de partícula mayor de 800 nm. En una realización preferida de la invención, menos de aproximadamente el 0,001% de las nanopartículas dentro de la composición tienen un tamaño de partícula mayor de 800 nm.

En un aspecto preferido, los tamaños y los intervalos de tamaños mencionados en esta invención se refieren a tamaños de partículas de la composición de nanopartículas liofilizadas reconstituidas. Es decir, después de que las nanopartículas liofilizadas se resuspenden en una solución acuosa (por ejemplo, agua, otro excipiente farmacéuticamente aceptable, tampón, etc.), el tamaño de partícula o el tamaño de partícula promedio está dentro del intervalo mencionado en esta invención.

Al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de las nanopartículas pueden estar presentes en la composición reconstituida como nanopartículas individuales. Es decir, menos del 50%, 40%, 30%, etc. de las nanopartículas están dimerizadas o multimerizadas (oligomerizadas).

En algunas realizaciones, el tamaño de la nanopartícula puede controlarse ajustando la cantidad (por ejemplo, la relación) de proteína vehículo a anticuerpo. El tamaño de las nanopartículas y la distribución del tamaño también son importantes. Las nanopartículas de la invención pueden comportarse de manera diferente según su tamaño. En tamaños grandes, una aglomeración puede bloquear los vasos sanguíneos. Por lo tanto, la aglomeración de nanopartículas puede afectar el rendimiento y la seguridad de la composición. Por otro lado, las partículas más grandes pueden ser más terapéuticas bajo ciertas condiciones (por ejemplo, cuando no se administran por vía intravenosa).

En un aspecto, la composición de nanopartículas comprende al menos un agente terapéutico adicional. En una realización, el al menos un agente terapéutico adicional está unido de forma no covalente a la superficie exterior de la nanopartícula. En una realización, el al menos un agente terapéutico adicional está dispuesto en la superficie exterior de la nanopartícula. En una realización, el al menos un agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en abiraterone, bendamustine, bortezomib, carboplatin, cabazitaxel, cisplatin, chlorambucil, dasatinib, docetaxel, doxorubicin, epirubicin, erlotinib, etoposide, everolimus, gemcitabine, gefitinib, idarubicin, imatinib, hydroxyurea, imatinib, lapatinib, leuprorelin, melphalan, methotrexate, mitoxantrone, nedaplatin, nilotinib, oxaliplatin, pazopanib, pemetrexed, picoplatin, romidepsin, satraplatin, sorafenib, vemurafenib, sunitinib, teniposide, triplatin, vinblastine, vinorelbine, vincristine y ciclofosfamida. En una realización, el al menos un agente terapéutico adicional es un

anticuerpo anticancerígeno.

Procedimientos de Preparación de Nanopartículas

- 5 En algunos aspectos, la descripción actual se refiere a procedimientos para preparar composiciones de nanopartículas como se describe en esta invención.

Las nanopartículas de la composición de nanopartículas se forman poniendo en contacto la proteína vehículo o la partícula del agente terapéutico de la proteína vehículo con el anticuerpo en una relación de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 10:30 partícula de la proteína vehículo o partícula del agente terapéutico de la proteína vehículo con respecto al anticuerpo. En una realización, la relación es de aproximadamente 10:2 a aproximadamente 10:25. En una realización, la relación es de aproximadamente 10:2 a aproximadamente 1:1. En una realización preferida de la invención, la relación es de aproximadamente 10:2 a aproximadamente 10:6. En una realización especialmente preferida de la invención, la relación es de aproximadamente 10:4. Las proporciones contempladas incluyen cualquier valor, subintervalo o intervalo dentro de cualquiera de los intervalos recitados, incluidos los puntos finales.

La cantidad de solución u otro medio líquido empleado para formar las nanopartículas es particularmente importante. No se forman nanopartículas en una solución demasiado diluida de la proteína vehículo (o agente terapéutico de la proteína vehículo) y los anticuerpos. Una solución demasiado concentrada dará como resultado agregados no estructurados. La cantidad de solución (por ejemplo, agua estéril, solución salina, solución salina tamponada con fosfato) empleada puede estar entre aproximadamente 0,5 mL de solución y aproximadamente 20 mL de solución. La cantidad de proteína vehículo puede estar entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 100 mg/mL. La cantidad de anticuerpo puede estar entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 30 mg/mL. Por ejemplo, la proporción de proteína vehículo:anticuerpo:solución puede ser de aproximadamente 9 mg de proteína vehículo (por ejemplo, albúmina) a 4 mg de anticuerpo (por ejemplo, BEV) en 1 ml de solución (por ejemplo, solución salina). También se puede agregar una cantidad de agente terapéutico (por ejemplo, taxol) a la proteína vehículo. Por ejemplo, se pueden agregar 1 mg de taxol 9 mg de proteína vehículo (10 mg de proteína vehículo terapéutica) y 4 mg de anticuerpo en 1 ml de solución. Cuando se usa una bolsa intravenosa típica, por ejemplo, con la solución de aproximadamente 1 litro, se necesitaría usar 1000 veces la cantidad de proteína vehículo/agente terapéutico de proteína vehículo y anticuerpos en comparación con la utilizada en 1 ml. Por lo tanto, no se pueden formar las nanopartículas presentes en una bolsa i.v. estándar. Además, cuando los componentes se agregan a una bolsa i.v. estándar en las cantidades terapéuticas de la presente invención, los componentes no se autoensamblan para formar nanopartículas.

La proteína vehículo o la partícula del agente terapéutico de la proteína vehículo puede ponerse en contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8. La proteína vehículo o la partícula del agente terapéutico de la proteína vehículo pueden ponerse en contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4. La proteína vehículo o la partícula del agente terapéutico de la proteína vehículo pueden ponerse en contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH de aproximadamente 5. La proteína vehículo o la partícula del agente terapéutico de la proteína vehículo pueden ponerse en contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH de aproximadamente 6. La proteína vehículo o la partícula del agente terapéutico de la proteína vehículo pueden ponerse en contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH de aproximadamente 7. La proteína vehículo o la partícula del agente terapéutico de la proteína vehículo pueden ponerse en contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH de aproximadamente 8. La proteína vehículo o la partícula del agente terapéutico de la proteína vehículo puede ponerse en contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7.

La partícula de proteína vehículo o la partícula del agente terapéutico de proteína vehículo se puede incubar con el anticuerpo a una temperatura de aproximadamente 5°C a aproximadamente 60°C, o cualquier intervalo, subintervalo o valor dentro de ese intervalo, incluidos los puntos finales. La partícula de proteína vehículo o la partícula de agente terapéutico de proteína vehículo se puede incubar con el anticuerpo a una temperatura de aproximadamente 23°C a aproximadamente 60°C.

Sin estar limitado por la teoría, se cree que la estabilidad de las nanopartículas dentro de la composición de nanopartículas depende, al menos en parte, de la temperatura y/o el pH al que se forman las nanopartículas, así como de la concentración de los componentes (es decir, proteína vehículo, anticuerpo y opcionalmente agente terapéutico) en la solución. El K_d de las nanopartículas puede estar entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 2×10^{-5} M. El K_d de las nanopartículas puede estar entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 2×10^{-8} M. El K_d de las nanopartículas puede estar entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 7×10^{-9} M. El K_d de las nanopartículas puede estar entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 3×10^{-8} M. Los valores contemplados incluyen cualquier valor, subintervalo o intervalo dentro de cualquiera de los intervalos recitados, incluidos los puntos finales.

Liofilización

Las composiciones liofilizadas de esta invención se preparan mediante técnicas de liofilización estándar con o sin la presencia de estabilizadores, tampones, etc. Sorprendentemente, estas condiciones no alteran la estructura relativamente frágil de las nanopartículas. Además, en el mejor de los casos, estas nanopartículas conservan su distribución de tamaño tras la liofilización y, lo que es más importante, pueden reconstituirse para administración *in vivo* (por ejemplo, administración intravenosa) en sustancialmente la misma forma y proporciones que si estuviera recién hecha.

Formulaciones

La composición de nanopartículas puede formularse para inyección directa en un tumor. La inyección directa incluye la inyección en o cerca de un sitio tumoral, la perfusión en un tumor y similares. Debido a que la composición de nanopartículas no se administra sistémicamente, una composición de nanopartículas que se formula para inyección directa en un tumor puede comprender cualquier tamaño de partícula promedio. Sin estar atados a la teoría, se cree que las partículas más grandes (por ejemplo, mayores de 500 nm, mayores de 1 μ m, y similares) tienen más probabilidades de inmovilizarse dentro del tumor, proporcionando así lo que se cree que es un mejor efecto beneficioso.

También se proporciona en esta invención una composición que comprende un compuesto proporcionado en esta invención, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En general, los compuestos proporcionados en esta invención pueden formularse para la administración a un paciente por cualquiera de los modos de administración aceptados. Diversas formulaciones y sistemas de administración de fármacos están disponibles en la técnica. Ver, *p.ej.*, Gennaro, A.R., ed. (1995) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co..

En general, los compuestos proporcionados en esta invención se administrarán como composiciones farmacéuticas por cualquiera de las siguientes rutas: administración oral, sistémica (por ejemplo, transdérmica, intranasal o por supositorio) o parenteral (por ejemplo, intramuscular, intravenosa o subcutánea).

Las composiciones están compuestas, en general, de un compuesto de la presente invención en combinación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes aceptables no son tóxicos, ayudan a la administración y no afectan negativamente el beneficio terapéutico de los compuestos reivindicados. Tal excipiente puede ser cualquier sólido, líquido, semisólido o, en el caso de una composición de aerosol, excipiente gaseoso que generalmente está disponible para un experto en la materia.

Los excipientes farmacéuticos sólidos incluyen almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche descremada en polvo y similares. Los excipientes líquidos y semisólidos pueden seleccionarse de entre glicerol, propilenglicol, agua, etanol y diversos aceites, incluidos los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, etc. Los vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables, incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y glicoles. Otros excipientes farmacéuticos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, editado por E. W. Martin (Mack Publishing Company, 18a ed., 1990).

Las presentes composiciones pueden, si se desea, presentarse en un paquete o dispositivo dispensador que contiene una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. Tal paquete o dispositivo puede, por ejemplo, comprender una lámina de metal o plástico, como un blíster, o vidrio, y tapones de goma como en viales. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración. También se pueden preparar composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un vehículo farmacéuticamente compatible, estas se pueden colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada, como se describió con mayor detalle anteriormente.

Métodos de Tratamiento

Las composiciones de nanopartículas como se describen en esta invención son útiles en el tratamiento de células cancerosas y/o tumores en un mamífero. El mamífero puede ser un humano (es decir, un paciente humano). Preferiblemente, la composición de nanopartículas liofilizadas se reconstituye (se suspende en un excipiente acuoso) antes de la administración.

También se proporciona un procedimiento para tratar una célula cancerosa, el procedimiento comprende poner en contacto la célula con una cantidad efectiva de composición de nanopartículas como se describe en esta invención para tratar la célula cancerosa. El tratamiento de una célula cancerosa incluye, sin limitación, la reducción de la proliferación, matar la célula, evitar la metástasis de la célula y similares.

5 También se proporciona un procedimiento para tratar un tumor en un paciente que lo necesita, el procedimiento comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de nanopartículas como se describe en esta invención para tratar el tumor. El tamaño del tumor puede ser reducido. El tamaño del tumor puede no aumentar (es decir, progresar) durante al menos un período de tiempo durante y/o después del tratamiento.

10 La composición de nanopartículas puede administrarse por vía intravenosa. La composición de nanopartículas puede administrarse directamente al tumor. La composición de nanopartículas puede ser administrada mediante inyección directa o perfusión en el tumor.

15 El procedimiento puede comprender:

a) administrar la composición de nanopartículas una vez por semana durante tres semanas;

b) cesar la administración de la composición de nanopartículas durante una semana; y

20 c) opcionalmente, repetir las etapas a) y b) según sea necesario para tratar el tumor.

4.

25 La cantidad terapéuticamente efectiva de las nanopartículas descritas en esta invención puede comprender aproximadamente 50 mg/m² hasta aproximadamente 200 mg/m² de proteína vehículo o proteína vehículo y agente terapéutico. La cantidad terapéuticamente efectiva puede comprender aproximadamente 75 mg/m² a aproximadamente 175 mg/m² de proteína vehículo o proteína vehículo y agente terapéutico. Los valores contemplados incluyen cualquier valor, subintervalo o intervalo dentro de cualquiera de los intervalos recitados, incluidos los puntos

30 finales.

La cantidad terapéuticamente efectiva puede comprender aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 90 mg/m² de anticuerpo. La cantidad terapéuticamente efectiva puede comprender 30 mg/m² hasta aproximadamente 70 mg/m² de anticuerpo. Los valores contemplados incluyen cualquier valor, subintervalo o intervalo dentro de cualquiera de los

35 intervalos recitados, incluidos los puntos finales.

Los cánceres o tumores que pueden tratarse mediante las composiciones y procedimientos descritos en esta invención incluyen, pero no se limitan a: cáncer del tracto biliar; cáncer de cerebro, incluidos glioblastomas y meduloblastomas; cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer de esófago; 40 cáncer gástrico; neoplasias hematológicas, que incluyen leucemia linfocítica aguda y mielógena; mieloma múltiple; leucemias asociadas al SIDA y linfoma de leucemia de células T en adultos; neoplasias intraepiteliales, incluidas la enfermedad de Bowen y la enfermedad de Paget; cáncer de hígado (hepatocarcinoma); cáncer de pulmón; linfomas, incluida la enfermedad de Hodgkin y linfomas linfocíticos; neuroblastomas; cáncer oral, incluido el carcinoma de células escamosas; cáncer de ovario, incluidos los que surgen de células epiteliales, células del estroma, células germinales 45 y células mesenquimales; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer de recto; sarcomas, que incluyen leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma y osteosarcoma; cáncer de piel, incluido melanoma, sarcoma de Kaposi, cáncer basocelular y cáncer de células escamosas; cáncer testicular, incluidos tumores germinales (seminoma, no seminoma[teratomas, coriocarcinomas]), tumores del estroma y tumores de células germinales; cáncer de tiroides, que incluye adenocarcinoma de tiroides y carcinoma medular; y cáncer renal incluyendo 50 adenocarcinoma y tumor de Wilms. Los cánceres o tumores pueden incluir cáncer de mama, linfoma, mieloma múltiple y melanoma.

En general, los compuestos de esta invención se administrarán en una cantidad terapéuticamente efectiva por cualquiera de los modos de administración aceptados para agentes que sirven utilidades similares. La cantidad real 55 del compuesto de esta invención, es decir, las nanopartículas, dependerá de numerosos factores, como la gravedad de la enfermedad a tratar, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto utilizado, la ruta y forma de administración y otros factores bien conocidos por el experto en la materia.

Una cantidad efectiva de tales agentes puede determinarse fácilmente mediante experimentación de rutina, al igual 60 que la vía de administración más efectiva y conveniente, y la formulación más apropiada. Diversas formulaciones y sistemas de administración de fármacos están disponibles en la técnica. Ver, *p.ej.*, Gennaro, A.R., ed. (1995) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing Co..

Una cantidad efectiva o una cantidad o dosis terapéuticamente efectiva de un agente, por ejemplo, un compuesto de la invención, se refiere a esa cantidad del agente o compuesto que produce una mejoría de los síntomas o una prolongación de la supervivencia en un sujeto. La toxicidad y eficacia terapéutica de dichas moléculas pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de la dosis de efectos tóxicos a terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se prefieren los agentes que exhiben altos índices terapéuticos.

- 10 La cantidad efectiva o la cantidad terapéuticamente efectiva es la cantidad del compuesto o composición farmacéutica que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que está buscando el investigador, veterinario, médico u otro clínico. Las dosificaciones pueden variar dentro de este intervalo en función de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación deben elegirse, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, en vista de los detalles de la condición de un sujeto.

La cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos de la fracción activa que sean suficientes para lograr los efectos deseados; es decir, la concentración efectiva mínima (MEC). La MEC variará para cada compuesto pero puede estimarse a partir de, por ejemplo, de datos y experimentos con animales *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para lograr la MEC dependerán de las características individuales y de ruta de administración. En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local efectiva del fármaco puede no estar relacionada con la concentración plasmática.

EJEMPLOS

- 25 La presente descripción se ilustra usando nanopartículas compuestas de paclitaxel unido a albúmina (es decir, Abraxane®) o cisplatino como núcleo, y bevacizumab (es decir, Avastin®) o Rituximab (es decir, Rituxan®) como anticuerpos.
- 30 Un experto en la materia entenderá que la preparación y el uso de las nanopartículas de los Ejemplos tienen el único propósito de ilustrar.

Cualquier abreviatura utilizada en esta invención tiene un significado científico normal. Todas las temperaturas son en °C a menos que se indique lo contrario. En esta invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se defina lo contrario:

- 40 ABX = Abraxane®/(paclitaxel unido a albúmina)
AC = ABX unido a cisplatino
ACN = acetonitrilo
ADC = quimioterapia dependiente de anticuerpos
BEV = bevacizumab
BSA = albúmina de suero bovino
dH₂O = agua destilada
DMEM = Medio de Eagle modificado de Dulbecco
45 nM = nano molar
EdU = 5-etinil-2'-desoxiuridina
EM = microscopía electrónica
FCB = tampón de citometría de flujo
FITC = Fluorescina
50 kD = kilo-dalton
K_d = constante de disociación
kg = kilogramo
KV = kilovoltios
L/h = litro/hora
55 LC-MS = cromatografía líquida - espectrometría de masas
M = molar
mCi = milicurios
mg = miligramo
ml o mL = mililitro
60 m² = metros cuadrados
mm³ = milímetro cúbico
µg = microgramo

µl = microlitro
 µm = micrómetro/micrón
 PBS = Solución salina tamponada con fosfato
 pK = farmacocinética
 RT = temperatura ambiente
 rpm = rotaciones por minuto
 V = voltios
 x g = veces la gravedad

5

10 **Ejemplo 1: Preparación de Nanopartículas**

Abraxane (ABX) (10 mg) se suspendió en bevacizumab (BEV) (4 mg [160 µl] a menos que se indique lo contrario), y se agregaron 840 µl de solución salina al 0,9% para dar una concentración final de 10 mg/ml y 2 mg/ml de ABX y BEV, respectivamente. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (o a la temperatura indicada) para permitir la formación de partículas. Para los experimentos de Mastersizer para medir el tamaño de partícula de los complejos ABX:BEV, se suspendieron 10 mg de ABX en BEV a concentraciones de 0 a 25 mg/ml. Se formaron complejos de ABX con rituximab (0-10 mg/ml) o trastuzumab (0-22 mg/ml) en condiciones similares.

15

Para uso en humanos, los complejos ABX:BEV pueden prepararse obteniendo el número de dosis apropiado de viales de 4 ml de 25 mg/mL de BEV y diluyendo cada vial según las siguientes instrucciones a 4 mg/mL. La cantidad apropiada de dosis de viales de 100 mg de ABX puede prepararse reconstituyendo a una concentración final que contenga nanopartículas de ABX de 10 mg/mL. Usando una jeringa estéril de 3 ml, 1,6 ml (40 mg) de bevacizumab (25 mg/mL) puede extraerse e inyectarse lentamente, durante un mínimo de 1 minuto, en la pared interior de cada uno de los viales que contienen 100 mg de ABX. La solución de bevacizumab no debe inyectarse directamente sobre la torta liofilizada, ya que esto generará espuma. A continuación, con una jeringa estéril de 12 ml, se pueden extraer e inyectar lentamente 8,4 ml de inyección de cloruro de sodio al 0,9%, USP, durante un mínimo de 1 minuto, 8,4 ml en la pared interior de cada vial que contiene ABX 100 mg y BEV 40 mg. Una vez que se completa la adición de BEV 1,6 mL y la inyección de cloruro de sodio al 0,9%, USP 8,4 mL, cada vial se puede girar suavemente y/o invertir lentamente durante al menos 2 minutos hasta que se produzca la disolución completa de cualquier torta/polvo. Se debe evitar la generación de espuma. En este punto, la concentración de cada vial debe ser de 100 mg/10 mL de ABX y 40 mg/10 mL de BEV. Los viales que contienen ABX y BEV deben reposar durante 60 minutos. Los viales se deben girar suavemente y/o invertir cada 10 minutos para continuar mezclando el complejo. Después de que hayan transcurrido 60 minutos, el volumen de dosificación calculado de ABX y BEV debe retirarse de cada vial y agregarse lentamente a una bolsa de viaflex vacía. A continuación se agrega un volumen igual de inyección de cloruro de sodio al 0.9%, USP para obtener la concentración final de ABX 5 mg/mL y BEV 2 mg/mL. A continuación, la bolsa debe girar suavemente y/o invertirse lentamente durante 1 minuto para mezclar. Las nanopartículas ABX:BEV se pueden almacenar hasta 4 horas a temperatura ambiente después de la dilución final.

20

25

30

35

Ejemplo 2: Enlace de ABX y BEV in vitro

40

Para determinar si ABX y BEV interactúan, las nanopartículas formadas en el Ejemplo 1 se analizaron por citometría de flujo y microscopía electrónica.

Procedimientos

45

Citometría de Flujo: AB160 se produjo como se describe en el Ejemplo 1 anterior. Para determinar la unión de BEV a ABX, la visualización de AB160 se realizó en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Franklin Lakes, NJ) y el análisis de datos se realizó utilizando el software Accuri C6. La IgG anti-ratón de cabra biotinilada (5 µg) (Abcam, Cambridge, MA) se marcó con 5 µg de estreptavidina PE (Abcam, Cambridge, MA). La IgG anti-ratón de cabra se eligió para etiquetar AB160 porque la porción Fab del BEV se deriva del ratón. ABX y AB160 se incubaron con la IgG anti-ratón de cabra marcada con PE durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron y se visualizaron por citometría de flujo.

50

Microscopía Electrónica: Se añadieron cinco µl de ABX, disuelto en PBS a 6 mg/ml, a una rejilla de cobre revestida con carbono parlodiano de 300 mallas y se dejó reposar durante 1 minuto. Se tocó un pedazo puntiagudo de papel de filtro hasta la gota para eliminar el exceso de líquido, dejando una película delgada en la rejilla. Las rejillas se dejaron secar. Para disolver los cristales de tampón que quedaron en la rejilla seca, la muestra se lavó tres veces en dH₂O. Se añadió a la rejilla una pequeña gota de ácido fosfotúngstico al 1% (PTA), pH 7,2. A continuación, la rejilla se volvió a tocar con un pedazo de papel de filtro para eliminar el exceso de líquido, dejando una película delgada en la rejilla y se dejó secar. BEV (Genentech) a 25 mg/ml en solución de cloruro de sodio al 0,9% se diluyó con PBS a una relación de 1:10. Se cargaron cinco µl de BEV en una rejilla de níquel recubierta de formvar y se dejaron secar al aire durante 30 minutos a 1 hora. Para el AB160, 10 mg/ml de ABX, disuelto en PBS, y 4 mg/ml de BEV, en solución de cloruro de

55

60

sodio al 0,9%, se mezclaron en una proporción de 2,5:1. El complejo se diluyó adicionalmente con PBS a 1:5. Se cargaron cinco µl del complejo en una rejilla de níquel recubierta de formvar y se dejaron secar al aire durante 30 minutos a 1 hora. Ambas muestras fueron incubadas durante 1 hora en IgG anti-ratón de cabra con partículas conjugadas con oro de 6 nm (Electron Microscopy Sciences), diluidas 1:30 con 10% de FCB/PBS, lavadas 6 veces con PBS (cada 2 minutos), 6 veces con dH₂O, a continuación se tiñó con la mezcla de metilcelulosa al 2% y UA al 4% (9:1) durante 5 minutos. Se usó papel de filtro para drenar la mancha y la rejilla se secó al aire durante 1 hora. Ambas muestras se incubaron durante la noche en IgG anti-ratón de burro con partículas conjugadas con oro de 6 nm (Jackson ImmunoResearch) diluidas 1:25 con FCB/PBS al 10%, lavadas 6 veces con PBS (cada 2 minutos), 6 veces con dH₂O agua, teñida con PTA al 1% durante 5 minutos, secada al aire, cubierta con metilcelulosa al 2% y secada al aire durante 1 hora. Las micrografías se tomaron en un JEOL1400 en funcionamiento a 80 KV.

Resultados

ABX (10 mg/ml) se incubó conjuntamente con 4 mg/ml de BEV *in vitro* y se descubrió que formaban nanopartículas de 160 nm (a las que se hace referencia en esta invención como AB160). Debido a que la porción Fab de la IgG1 (BEV) es de origen de ratón, las partículas que contienen BEV se marcaron selectivamente con IgG anti-ratón de cabra purificada seguido de PE anti-cabra como anticuerpo secundario. Como control negativo, las muestras se tiñeron solo con PE anti-cabra. Las partículas se visualizaron por citometría de flujo y demostraron una señal brillante de unión de IgG1 anti-ratón a AB160 (41,2% positivo) con respecto a ABX (6,7% positivo) solo (FIG. 1A). Para validar la unión de BEV a ABX, los BEV se marcaron con IgG antihumana de ratón marcada con oro y las partículas se visualizaron con microscopía electrónica (FIG. 1B). Sorprendentemente, las imágenes EM sugieren una monocapa de BEV que rodea las nanopartículas ABX.

Para determinar a qué proteína (albúmina o BEV) se une el paclitaxel cuando el complejo se descompone, se hicieron AB160 y se recogieron fracciones: las partículas (nanoAB160), proteínas mayores de 100 kD y proteínas menores de 100 kD. El paclitaxel se midió en cada fracción por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). Aproximadamente el 75% del paclitaxel permaneció dentro de las partículas, y la mayoría del paclitaxel restante se asoció con la fracción que contenía proteínas de 100 kD o más (FIG. 1C, arriba), lo que sugiere que cuando las partículas se disocian, el paclitaxel se une solo a BEV o un BEV y un heterodímero de albúmina. Esto indica que los complejos disociados contienen el fármaco quimioterapéutico con el anticuerpo, que aún transitaría hacia el microambiente tumoral de alto VEGF. Estos hallazgos fueron confirmados por el análisis Western blot de los sobrenadantes de AB160, que mostró que BEV y paclitaxel se localizan conjuntamente a aproximadamente 200 kD, un tamaño consistente con un complejo de proteína paclitaxel-BEV-albúmina (FIG. 1C, parte inferior).

Ejemplo 3: Función de AB160 *in vitro*

Se demostró la confirmación de que los dos elementos clave en los complejos, el anticuerpo y el paclitaxel, conservaron su función cuando estaban presentes en los complejos.

Procedimientos

Toxicidad *in vitro*: La línea celular de melanoma humano A375 (ATCC Manassa, VA) y la línea de linfoma de células B Daudi (ATCC Manassa, VA) se cultivaron en DMEM con 1% de PSG y 10% de FBS. Las células se cosecharon y se plaquearon a $0,75 \times 10^6$ células por pocillo en placas de 24 pocillos. Las células se expusieron a ABX o AB160 a concentraciones de paclitaxel de 0 a 200 µg/ml durante la noche a 37°C y 5% de CO₂. Para medir la proliferación, se utilizó el kit Click-iT EdU (Molecular Probes, Eugene, OR). Brevemente, se añadió EdU 10 mM a los pocillos y se incubó durante la noche con las células y ABX o AB160. Las células se permeabilizaron con saponina al 1% y la EdU intercalada se marcó con un anticuerpo conjugado con FITC. El índice de proliferación se determinó dividiendo las células positivas para FITC de cada tratamiento por la proliferación máxima de células marcadas con EdU no tratadas.

VEGF ELISA: Para determinar si BEV todavía puede unirse a su ligando, VEGF, cuando se une a ABX, se empleó un VEGF ELISA estándar (R & D Systems, Minneapolis, MN). AB160 se preparó como se describe y se agregaron 2000 pg/ml de VEGF al complejo AB160 o ABX solo. El VEGF se incubó con las nanopartículas durante 2 horas a temperatura ambiente. La suspensión se hizo girar a 6000 rpm durante 15 minutos, se recogieron los sobrenadantes y se midió el VEGF libre por ELISA. Brevemente, las placas ELISA se revistieron con anticuerpo de captura durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron, bloquearon y se agregaron patrones y muestras. Después del lavado, se añadió anticuerpo de detección y se desarrollaron placas con sustrato (R & D Systems, Minneapolis, MN). La absorbancia se midió a 450 nm utilizando un lector de placas ELISA Versamax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La concentración de VEGF no unido se determinó con una curva estándar de 0 a 2000 pg/ml.

Resultados

AB160 tiene una toxicidad similar en relación con ABX solo en un ensayo de toxicidad *in vitro* con la línea celular de melanoma humano, A375, lo que sugiere que el paclitaxel funciona igualmente en cualquiera de las formulaciones (FIG. 1D).

- 5 Para probar la unión de VEGF a BEV en el complejo AB160, AB160 o ABX se incubaron conjuntamente con VEGF, se eliminaron las partículas y se analizó el contenido de VEGF en el sobrenadante. La falta de VEGF en el sobrenadante medido a partir de AB160 (<10% de VEGF sin unir) indicó que el VEGF estaba unido por el BEV en el complejo AB160, mientras que permaneció libre cuando se incubó con el ABX (> 80% de VEGF sin unir) solo (FIG. 1E).

10

Es importante destacar que estos ensayos demostraron que el paclitaxel en AB160 conserva su toxicidad para las células tumorales y el BEV unido mantiene la capacidad de unirse a su ligando, VEGF.

Ejemplo 4: Tamaño de Partícula y Afinidad de Proteínas

15

Para comprender las características de las nanopartículas formadas al unir BEV a ABX, se determinó el tamaño de los complejos ABX: BEV en relación con ABX.

Procedimientos

20

Mastersizer y Nanosight: El tamaño de partícula de los complejos de fármacos ABX y anticuerpo-ABX se midió por dispersión dinámica de luz en un Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Westborough, MA). Para medir el tamaño de partícula, se añadieron 2 ml (5 mg/ml) de Abraxane o complejo a la cámara de muestra. Los datos se analizaron con el software Malvern y las distribuciones de tamaño de partícula se mostraron por volumen. Los tamaños de partículas y la estabilidad se validaron más tarde utilizando el Sistema Nanosight (Malvern Instruments, Westborough, MA). Las partículas ABX o complejas se diluyeron en el intervalo apropiado para medir con precisión los tamaños de partícula. Los datos se mostraron por distribución de tamaño de partícula; sin embargo, el análisis de seguimiento de nanopartículas utiliza el movimiento browniano para determinar el tamaño de partícula.

25

- 30 **Ensayo de Unión:** BEV biotinilado, rituximab o trastuzumab a 100 µg/ml se unieron a la sonda de estreptavidina (ForteBio Corp. MenloPark, CA). La unión de ABX se midió por absorbancia de luz en el sistema BLItz (ForteBio Corp. MenloPark, CA) a 1000, 500 y 100 mg/ml. Las constantes de asociación y disociación se calcularon utilizando el software BLItz.

- 35 La tecnología de interferometría de biocapa (BLItz) se utilizó para evaluar la afinidad de unión de BEV a ABX. BEV biotinilado se unió a la sonda de estreptavidina y se expuso a ABX (1000, 500 y 100 µg/ml). La constante de disociación (K_d) de BEV y ABX es $2,2 \times 10^{-8}$ M a temperatura ambiente y pH 7, consistente con una fuerte interacción no covalente. La afinidad de unión de BEV y ABX está dentro del intervalo de constantes de disociación observadas entre la albúmina y los dominios de unión a la albúmina naturales o modificados genéticamente de algunas proteínas bacterianas.

- 40 Nilvebrant, J. y col. (2013) Comput Struct Biotechnol J 6:e201303009.

Resultados

- 45 Las nanopartículas ABX:BEV fueron consistentemente más grandes (aproximadamente 160 nm) que el ABX de 130 nm solo (Fig. 2a). El tamaño de la nanopartícula creada se correlacionó directamente con la concentración de BEV utilizada, con tamaños medios que oscilan entre 0,157 y 2,166 µm. (FIG. 2A). Con el objetivo de estos estudios como un ensayo clínico de Fase I, la partícula ABX:BEV más pequeña (AB160) se enfocó porque es la más similar a la ABX de 130 nm. El tamaño de la partícula AB160 era consistente con ABX más una monocapa de BEV que lo rodeaba y con la imagen EM de la partícula (ver FIG. 1B).

50

Para determinar si las condiciones de administración intravenosa afectan las distribuciones de tamaño de nanopartículas, se evaluaron las distribuciones de tamaño de partícula de AB160 (o ABX) incubadas en solución salina durante hasta 24 horas a temperatura ambiente. La distribución de tamaño de AB160 no cambia significativamente durante hasta 24 horas (FIGs. 9A y 9B). Sin embargo, a las 4 horas a temperatura ambiente, hay alguna evidencia de la descomposición de AB160 por ELISA (FIG. 9C).

55

Para determinar la estabilidad de AB160 en plasma, se incubó ABX o AB160 en solución salina o plasma humano heparinizado a relaciones de volumen relativo de 9:1 o 1:1. Notablemente, no se detectaron partículas (0,01 a 1 µm) cuando se incubó ABX (FIG. 10, panel superior) o AB160 (FIG. 10, panel inferior) en plasma a volúmenes iguales (1:1).

60

Western blot (datos no mostrados) indicó que, en solución salina o plasma humano heparinizado, el AB160 se disocia

en conjugados de proteínas más pequeños que todavía contienen el anticuerpo dirigido al tumor, la albúmina y el agente citotóxico, paclitaxel. Estos conjugados de proteínas conservan su capacidad para apuntar al tumor y, una vez en el sitio del tumor, pueden disolverse rápidamente y liberar la carga útil citotóxica para iniciar efectivamente la regresión del tumor sin la internalización de la nanopartícula completa por las células tumorales.

5 A continuación, el ABX se suspendió en BEV y la mezcla se diluyó con solución salina a pH 3, 5, 7 o 9 antes de la incubación a varias temperaturas (RT, 37°C y 58°C) para permitir la formación de partículas para comprobar si la afinidad de unión dependía del pH y/o la temperatura. La afinidad de unión de ABX y BEV depende tanto del pH como de la temperatura, observándose la mayor afinidad de unión cuando las partículas se forman a pH 5 y 58°C (figura 10 2B).

Para determinar si la unión de mayor afinidad de BEV y ABX a 58°C y pH 5 se tradujo en la estabilidad del complejo, se compararon varias preparaciones mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (Nanosight). La estabilidad de AB160 preparada a 58°C y pH 5 (AB1600558), temperatura ambiente y pH 7 (AB16007), o 58°C y pH 7 (AB1600758) se comparó con ABX expuesto a las mismas condiciones (ABX0558, ABX07, y ABX0758, respectivamente) después de la incubación en suero AB humano durante 0, 15, 30 o 60 minutos.

Las partículas producidas en condiciones de mayor afinidad (pH 7 y 58°C) también fueron más estables, como lo indica el número de partículas presentes por mg de ABX después de la exposición al suero AB humano. Las partículas 20 AB160 exhibieron una mayor estabilidad en el suero humano que se correlacionó con sus afinidades de unión. En particular, AB16007 y AB1600558 fueron más estables tanto en suero salino como humano que ABX solo, según lo determinado por el tamaño y el número de partículas medidas por mg de ABX (FIG. 2C y Tabla 3). Esto muestra que la estabilidad de las partículas de AB160 puede manipularse cambiando las condiciones bajo las cuales se forman las partículas AB160.

25

Tabla 3: Estabilidad de AB160 y ABX en suero AB humano

	Solución Salina	Suero AB Humano			
		0 min	15 min	30 min	60 min
ABX07	221,5	54,4	85.2	84	32.1
AB16007	2500	516	508	756	296
ABX0758	236	182.4	155.4	54	66
AB1600758	2460	436	236	260	176
ABX0558	348	510	86.8	90	64
AB1600558	7296	2200	1224	1080	960
Partículas por mg de ABX x 10 ⁸					

Estos datos demostraron que BEV se une a ABX con afinidad en el intervalo picomolar, lo que indica un enlace no 30 covalente fuerte, y demostró una distribución de tamaño de partícula consistente con ABX rodeado por una monocapa de moléculas de anticuerpos; el tamaño de las partículas creadas depende de la concentración de anticuerpos.

Ejemplo 5: Eficacia de AB160 en Ratones

35 Se empleó un modelo de xenoinjerto de células de melanoma humano A375 implantadas en ratones desnudos atímicos para evaluar la eficacia de AB160 *in vivo*.

Procedimientos

40 Experimentos *in vivo* se realizaron al menos 2 veces. El número de ratones necesarios para esos experimentos se determinó mediante análisis de potencia. Los tumores de ratón se midieron 2-3 veces/semana y los ratones se sacrificaron cuando el tumor tenía un 10% en peso. Los ratones que tenían respuestas tumorales completas se monitorizaron durante 60-80 días después del tratamiento. El punto final de los estudios con ratones fue la mediana de supervivencia. Se generaron curvas de Kaplan-Meier y se realizó la prueba de Mantle-Cox para determinar la 45 importancia de la supervivencia media entre los grupos de tratamiento. Los resultados *in vitro* resultados presentados son representativos de al menos 5 experimentos repetidos. Análisis estadísticos del cambio porcentual con respecto a los experimentos de referencia *in vitro* e *in vivo* se realizó utilizando la prueba t de Student.

Modelo de Ratón: Para probar la eficacia del tumor, 1×10^6 células de melanoma humano A375 se implantaron en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos (Harlan Sprague Dawley, Indianápolis, IN). Cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 700 mm^3 , los ratones fueron aleatorizados y tratados con PBS, ABX (30 mg/kg), BEV (12 mg/kg), BEV seguido de ABX o AB160 a las concentraciones anteriores. Para los experimentos con ratones que probaron partículas AB más grandes, la dosis más alta de BEV (45 mg/kg) necesaria para crear las partículas más grandes se usó en el grupo de tratamiento solo con BEV. El tamaño del tumor se controló 3 veces/semana y el volumen del tumor se calculó con la siguiente ecuación: $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$. Los ratones se sacrificaron cuando el tamaño del tumor equivalía al 10% del peso corporal del ratón o alrededor de 2500 mm^3 . El día 7 el por ciento de cambio desde el inicio se calculó de la siguiente manera: $[(\text{tamaño del tumor el día del tratamiento} - \text{tamaño del tumor el día 7}) / \text{tamaño del tumor el día del tratamiento}] \times 100$. La prueba *in vivo* del AR160 fue similar excepto que 5×10^6 células de Daudi fueron inyectadas en el flanco derecho de ratones atímicos desnudos.

Resultados

AB160 se probó en relación con PBS, los fármacos individuales solos y los fármacos administrados secuencialmente. Los ratones tratados con AB160 habían reducido significativamente el tamaño del tumor en comparación con todos los demás grupos de tratamiento ($p = 0,0001$ a $0,0089$) en el día 7 después del tratamiento, en relación con el valor basal (FIG. 3A). Los tumores en todos los ratones tratados con AB160 habían retrocedido en el día 7, y esta respuesta tumoral se tradujo en una mediana de supervivencia significativamente mayor del grupo AB160 en relación con todos los demás grupos (FIG. 3B), con una supervivencia de 7, 14, 14, 18 y 33 días para los grupos PBS ($p < 0,0001$), BEV ($p = 0,003$), ABX ($p = 0,0003$), BEV + ABX ($p = 0,0006$) y AB160, respectivamente.

Es probable que los tumores más grandes tengan una mayor concentración local de VEGF. Cuando los datos se analizaron en función del tamaño del tumor el día del tratamiento ($< 700 \text{ mm}^3$ y $> 700 \text{ mm}^3$), se demostró que los tumores más grandes tienen una mayor respuesta a AB160, lo que sugiere que una mayor concentración de VEGF tumoral atrae más ABX dirigido a BEV al tumor. La diferencia en el cambio porcentual desde el inicio fue significativa para los grupos de AB160 ($p = 0,0057$). Esta observación no se observó en el grupo ABX solamente ($p = 0,752$), donde el ABX no tiene capacidad de direccionamiento (FIG. 3C).

Partículas de tamaño creciente se prepararon usando relaciones BEV:ABX crecientes como se muestra en la FIG. 2A. La regresión tumoral y la supervivencia media se correlacionaron positivamente con el aumento del tamaño de partícula, lo que indica que la biodistribución de partículas más grandes puede alterarse en relación con las más pequeñas (FIGs. 3D y 3E). Se realizaron estudios completos de toxicidad en los ratones y no se observaron toxicidades.

Ejemplo 6: Farmacocinética de Paclitaxel en Ratones

Para comparar la farmacocinética (pk) de AB160 y ABX, se midieron las concentraciones plasmáticas de paclitaxel en ratones a los que se administró AB160 o ABX a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas.

Procedimientos

Farmacocinética de Paclitaxel: La separación cromatográfica líquida de paclitaxel y d5 paclitaxel se realizó usando una precolumna Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2,1 x 5 mm, 2,7 μm , Chrom Tech, Apple Valley, MN) unida a una columna analítica Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 μm Chrom Tech, Apple Valley, MN) a 40°C , eluido con una fase móvil gradiente compuesta de agua con 0,1% de ácido fórmico (A) y ACN con 0,1% de ácido fórmico (B) con una tasa de flujo constante de 0,5 ml/minuto. La elución se inició a 60% de A y 40% de B durante 0,5 minutos, a continuación B se incrementó linealmente de 40-85% durante 4,5 minutos, se mantuvo a 85% de B durante 0,2 minutos y se volvió a las condiciones iniciales durante 1,3 minutos. La temperatura del inyector automático fue de 10°C y el volumen de inyección de la muestra fue de 2 μl . La detección de paclitaxel y el estándar interno d5-paclitaxel se logró utilizando el espectrómetro de masas en modo ESI positivo con voltaje capilar 1,75 kV, temperatura de fuente 150°C , temperatura de desolvatación 500°C , flujo de gas de cono 150 L/h, flujo de gas de desolvatación 1000 L/h, usando el modo de exploración de monitoreo de reacción múltiple (MRM) con un tiempo de permanencia de 0,075 segundos. Los voltajes de cono y las energías de colisión se determinaron mediante el software MassLynx-Intellistart, v4.1, y variaron entre 6-16 V y 12-60 eV, respectivamente. El precursor de MRM y los iones del producto se monitorizaron a m/z 854,3 $\rightarrow$ 105,2 para paclitaxel y 859,3 $\rightarrow$ 291,2 para d5 paclitaxel. Las soluciones madre primarias de paclitaxel (1 mg/ml en EtOH) y d5 paclitaxel (1 mg/ml en EtOH) se prepararon en viales de vidrio silanizado ámbar de 4 ml y se almacenaron a -20°C . Los estándares de trabajo se prepararon por dilución de la solución madre con ACN en viales de vidrio silanizado ámbar de 2 ml y se almacenaron a -20°C . Las muestras de plasma se extrajeron de la siguiente manera, se añadieron 100 μl de muestra de plasma a un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml que contenía d5 paclitaxel (116,4 nM o 100 ng/ml) y 300 μl de ACN, se agitó en vórtex, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para precipitar proteínas, y centrifugado (14.000 rpm) durante 3 minutos. El sobrenadante se filtró en una placa de

Agilent Captiva ND^{lipids} (Chrom Tech, Apple Valley, MN), recogida en una placa profunda de 96 pocillos, y secada con gas nitrógeno. Las muestras se reconstituyeron usando 100 µl de ACN y se agitaron en un agitador de placas (alta velocidad) durante 5 minutos. Curvas estándar de plasma se prepararon diariamente con paclitaxel (0,59-5855 nM o 0,5-5000 ng/ml) y d5 paclitaxel (116,4 nM) para la cuantificación de paclitaxel. Los tumores de ratón se descongelaron en hielo, se pesaron y se diluyeron 2 partes (peso a volumen) en 1x PBS. A continuación se homogeneizaron los tumores usando un homogeneizador de tejido PRO200 usando la sonda de diente de sierra (5 mm x 75 mm). El homogeneizado tumoral se procesó de la misma manera que las muestras de plasma humano.

Imágenes de Ratones: Se prepararon soluciones de control de Avastin e IgG y se marcaron I-125 por protocolo (Imanis Life Sciences). Brevemente, Tampón Tris (0.125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,15 M NaCl) y 5 mCi Na¹²⁵ se agregaron directamente a los tubos de yodación (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA). El yoduro se dejó activar y se agitó a temperatura ambiente. El yoduro activado se mezcló con la solución de proteína. Se añadieron 50 µl de Tampón Eliminador (10 mg de tirosina/ml en PBS, pH 7,4) y se incubaron durante cinco minutos. Después de la adición del tampón Tris/BSA y mezclar, las muestras se aplicaron en casetes de diálisis MWCO 10K contra PBS preenfriado durante 30 minutos, 1 hora, 2 horas y durante la noche a 4°C. La radiactividad se determinó mediante un contador Gamma, a continuación se calcularon las desintegraciones por minuto (DPM) y la actividad específica. Los ratones fueron inyectados en su vena de la cola con Avastin I-125, Abraxane-Avastin I-125, Abraxane-IgG humana I-125 o Abraxane solamente. Se tomaron imágenes de los animales a las 3, 10, 24 y 72 horas después de la administración mediante imágenes SPECT-CT utilizando el escáner U-SPECT-II/CT (MILabs, Utrecht, Países Bajos). La reconstrucción SPECT se realizó utilizando un algoritmo POSEM (subconjuntos ordenados pixelados por maximización de expectativas). Los datos de CT se reconstruyeron durante el algoritmo de Feldkamp. Las imágenes registradas conjuntamente se reprodujeron y visualizaron utilizando el software PMOD (PMOD Technologies, Zurich, Suiza). Los animales fueron sacrificados y disecados a las 72 horas después de la inyección. Se midieron tejidos y órganos de interés seleccionados usando un calibrador de dosis de radioisótopos (Capintec CRC-127R, Capintec Inc.).

Resultados

Los resultados del primer experimento pk se proporcionan en las FIGs. 4A y 4B. El área bajo la curva (AUC) y la concentración sérica máxima (C_{max}) se calcularon en ratones con y sin tumor A375. En el primer experimento pk el C_{max} y AUC fueron muy similares en los ratones no portadores de tumor para AB160 y ABX (63,3 +/- 39,4 vs. 65,5 +/- 14,4 y 129 vs. 133 µg/ml, respectivamente). Sin embargo, en los ratones con tumor, el C_{max} y el AUC para los grupos de tratamiento fueron diferentes (55,7 +/- 21,2 frente a 63,3 +/- 17,3 y 112 frente a 128 µg/ml, respectivamente) (FIG. 4C). Aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, es consistente con una focalización superior por AB160, en relación con ABX.

Se realizó un segundo experimento pk con puntos de tiempo tempranos adicionales y tamaños de tumor grandes versus pequeños (FIGs. 4D-4F). Los resultados de este experimento demostraron una AUC más pequeña en ratones con tumor en relación con ratones sin tumor, con los valores sanguíneos más bajos de paclitaxel en ratones con tumor grande en relación con ratones con tumor pequeño (80,4 +/- 2,7, 48,4 +/- 12,3, y 30,7 +/- 5,2 para ratones no tratados con ABX, tumor pequeño y tumor grande, respectivamente; 66,1 +/- 19,8, 44,4 +/- 12,1 y 22,8 +/- 6,9 para AB160 tratado). Del mismo modo, la C_{max} disminuyó en ambos grupos de tratamiento en ratones con tumores más grandes (47,2, 28,9 y 19,7 µg/ml para ABX y 40,1, 26,9 y 15,3 µg/ml para AB160) (FIG. 4G). Las AUC y C_{max} de paclitaxel en sangre fueron menores en los ratones tratados con AB160 en relación con los ratones tratados con ABX. Aunque no es estadísticamente significativo, estos datos son más consistentes con una mayor deposición de paclitaxel en los tumores tratados con AB160.

Para probar directamente esta hipótesis, se midieron las concentraciones tumorales de paclitaxel por LC-MS. La concentración tumoral de paclitaxel fue significativamente mayor en los tumores tratados con AB160 en relación con ABX a las 4 horas (3473 µg/mg de tejido +/- 340 frente a 2127 µg/mg de tejido +/- 3.5; p = 0,02) y 8 horas (3005 µg/mg de tejido +/- 146 frente a 1688 µg/mg de tejido +/- 146; p = 0,01) puntos de tiempo, lo que sugiere que el paclitaxel permanece en el tumor durante más tiempo cuando el anticuerpo lo dirige (FIG. 4H). Esto explica el pk de sangre y es consistente con la redistribución del fármaco a los tejidos, incluido el tumor.

Las imágenes en vivo *in vivo* de AB160 marcadas con I-125 (Abx-AvtI125) y ABX unido a isotipo IgG (Abx-IgG125) confirmaron los resultados de la LC-MS, con niveles más altos de I-125 en el tumor de ratones tratados con AB160 en relación con IgG- ABX a las 3 horas (32,2 uCi/g +/- 9,1 vs 18.5 uCi/g +/- 1,65; p = 0,06) y 10 horas (41,5 uCi/g +/- 6,4 vs 28.7 uCi/g +/- 2,66; p = 0,03) después de la inyección (FIGs. 4I y 4J). Tomados en conjunto, estos datos demuestran que la unión de BEV a ABX altera la pk de sangre, y esta alteración se debe a una redistribución del fármaco en el tejido tumoral, como lo muestran tanto LC-MS de paclitaxel como el etiquetado I-125 de BEV en relación con un isotipo IgG1 coincidente.

- Sin estar ligado a la teoría, se cree que al unir un anticuerpo dirigido a un tumor a ABX, el pk se altera de manera más dramática que ABX solo, disminuyendo la C_{max} y AUC en la sangre debido a la redistribución de AB160 al tejido tumoral. Estos resultados de paclitaxel pk en sangre de ratón, niveles de paclitaxel en el tejido tumoral y niveles de radioactividad I-125 en ratones tratados con AB160 en relación con ABX solo sugieren que el direccionamiento de anticuerpos de ABX altera la biodistribución de paclitaxel de modo que niveles elevados alcanzan el tumor y se retienen allí por un período de tiempo más largo, produciendo una regresión tumoral mejorada.

Ejemplo 7: Unión de Otros Anticuerpos Terapéuticos

- 10 La unión del anticuerpo anti-CD20 humano (rituximab) y el anticuerpo del receptor anti-HER2/neu (trastuzumab) a ABX se probó para determinar si otros anticuerpos terapéuticos IgG también exhiben unión a ABX cuando se combinan *ex vivo*

Procedimientos

- 15 Las nanopartículas que contienen rituximab o trastuzumab se prepararon y probaron como se describe en los ejemplos anteriores.

Resultados

- 20 El tamaño de partícula de los complejos con BEV y trastuzumab (HER) fue muy similar, con tamaños promedio que van desde 0,157 a 2,166 μm (FIG. 2A) y 0,148 a 2,868 μm (FIG. 5B), respectivamente. Por el contrario, las partículas formadas con rituximab se hicieron mucho más grandes en las proporciones más bajas de anticuerpo: ABX, con tamaños de partícula que varían de 0,159 a 8,286 μm (FIG. 5A).

- 25 Las afinidades de unión de rituximab y trastuzumab con ABX a pH variable se determinaron por BLItz. Ambos anticuerpos se unen con una afinidad relativamente alta en el intervalo picomolar (FIG. 5C). La afinidad de rituximab a ABX disminuyó con un pH más alto, pero la afinidad de trastuzumab a ABX no se vio afectada por el pH (FIG. 5C).

- 30 Se probó la eficacia de la partícula de 160 nm hecha con rituximab (AR160) *in vitro* y *in vivo*. *In vitro*, la línea celular de linfoma de células B de Daudi se trató con AR160, ABX o rituximab solo a concentraciones crecientes (0 a 200 $\mu\text{g/ml}$) de paclitaxel. AR160 ($IC_{50} = 10 \mu\text{g/ml}$) inhibió significativamente la proliferación de células de Daudi tratadas durante 24 horas ($p = 0,024$) en comparación con cualquiera de ABX ($IC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$) o rituximab ($IC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$) solo (figura 6A).

- 35 *In vivo*, se estableció un modelo de xenotrasplante de células de Daudi en ratones atímicos desnudos. Una vez que se establecieron los tumores, los ratones se trataron con PBS, ABX, rituximab, ABX y rituximab administrados secuencialmente, o AR160. El día 7 después del tratamiento, se midieron los tumores y se calculó el cambio porcentual en el tamaño del tumor desde el inicio. Los tumores tratados con AR160 retrocedieron o permanecieron estables, mientras que los tumores en todos los otros grupos de tratamiento progresaron (FIG. 6B). El cambio porcentual respecto al tamaño tumoral basal en el grupo AR160 en comparación con todos los demás grupos fue significativo ($p < 0,0001$). Los ratones tratados con AR160 tuvieron una supervivencia media significativamente más larga de más de 60 días en comparación con 12, 16 y 12 días para los ratones tratados con PBS ($p < 0,0001$), ABX ($p < 0,0001$) o rituximab ($p = 0,0002$), respectivamente (FIG. 6C). Sin embargo, la diferencia en la mediana de supervivencia no fue significativa entre AR160 y los grupos tratados de forma secuencial ($p = 0,36$). Esto puede deberse a que el rituximab se une a las células tumorales y permanece en la superficie celular, lo que permite que el ABX administrado posteriormente se una al anticuerpo cuando ingresa al sitio del tumor, a diferencia del BEV que se une a un objetivo soluble y no a un marcador de superficie celular.

Ejemplo 8: Enlace de Otros Fármacos Quimioterápicos a AB160

Se evaluó la eficacia de otros fármacos quimioterápicos para formar nanopartículas funcionales.

Procedimientos

- 50 Las nanopartículas que contienen cisplatino se prepararon y probaron como se describe en los ejemplos anteriores.

Resultados

- 60 Para probar si otro fármaco quimioterápico podría unirse a las partículas AB160, se incubaron conjuntamente cisplatino y ABX y se midió por HPLC la cantidad de cisplatino libre que quedaba en el sobrenadante. Aproximadamente el 60% (es decir, solo el 40% permanece en el sobrenadante) del cisplatino unido al ABX (FIG. 7A).

A continuación, se probó la toxicidad tumoral de AC con respecto a ABX y cisplatino solo usando células A375. Los complejos se centrifugaron para eliminar cisplatino no unido altamente tóxico, y se reconstituyeron en medios para asegurar que cualquier toxicidad adicional de AC en relación con ABX se deba solo al cisplatino unido a ABX. Por

- 5 paridad, el ABX solo se centrifugó de manera similar. AC ($IC_{50}=90 \mu\text{g/ml}$) inhibió la proliferación de células A375 en mayor medida que ABX solo ($IC_{50}>1000\mu\text{g/ml}$) (FIG. 7B). La disminución de la toxicidad en este experimento en relación con otros experimentos de toxicidad se debe a alguna pérdida de fármaco en la etapa de centrifugación, pero la comparación de ABX con AC sigue siendo relevante.
- 10 Para determinar la toxicidad tumoral de los complejos AB160 que contienen cisplatino, AB160 se incubó conjuntamente con cisplatino para formar partículas que contienen cisplatino (complejo ABC). El complejo ABC se probó en el modelo de xenotrasplante de melanoma A375 en relación con cada fármaco solo y AB160. Los tumores tratados con AB160, AB160 + cisplatino administrados secuencialmente, y el complejo ABC mostraron regresión en el tamaño del tumor a los 7 días después del tratamiento (FIG. 7C), pero el complejo ABC confirió la mediana de supervivencia más larga (35 días, en relación con AB160 y AB160 + cisplatino a los 24 y 26 días, respectivamente).
- 15 Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0,82$ y $0,79$) (FIG. 7D), los datos son consistentes con los beneficios del complejo ABC para las tasas de supervivencia a largo plazo.

Estos datos demostraron que la porción de albúmina del ABX proporciona una plataforma para que se unan otros anticuerpos terapéuticos, como rituximab y trastuzumab, así como otros agentes de quimioterapia (por ejemplo, Cisplatino), que tuvieron una eficacia similar *in vitro* y *in vivo* como AB160.

- Juntos, estos datos demuestran una forma simple de construir un conjugado nanoinmune versátil, que permite que múltiples proteínas o agentes citotóxicos se unan a un único andamio de albúmina. La eficacia mejorada del fármaco
- 25 dirigido en relación con los agentes individuales solos se demostró en el modelo de ratón, que se debe al menos en parte a la alteración de la *pk* del fármaco dirigido al anticuerpo. Además, sin limitarse a la teoría, se cree que la versatilidad del conjugado nanoinmune actualmente revelado que no requiere un conector o la internalización de la célula objetivo superará los obstáculos que enfrentan otras nanomedicinas para traducir los resultados de ratones a humanos.

30

Ejemplo 9: Liofilización de AB160

- AB160 se sintetizó añadiendo 8 mg (320 μl) de bevacizumab a 20 mg de Abraxane. A continuación se añadieron 1,66 ml de solución salina al 0,9% para un volumen final de 2 ml para una concentración final de 4 mg/ml de bevacizumab
- 35 y 10 mg/ml de Abraxane, y la mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml.

- Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, la mezcla se diluyó 1:2 en solución salina al 0,9% a 2 mg/ml y 5 mg/ml de bevacizumab y Abraxane, respectivamente. Estas son las concentraciones de los 2
- 40 fármacos cuando la farmacia los prepara para administrar a los pacientes.

AB160 se dividió en veinte partes alícuotas de 200 μl en eppendorfs de polipropileno de 1,5 ml y se congeló a -80°C .

- Una vez congeladas, las alícuotas se liofilizaron durante la noche con el liofilizador de mesa Virtis 3L (SP Scientific, Warmister, PA) con la refrigeración encendida. Se generó una preparación liofilizada.
- 45

- Las alícuotas secas se almacenaron a temperatura ambiente en los mismos eppendorfs de polipropileno de 1,5 ml. Estas muestras se reconstituyeron fácilmente en solución salina a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de centrifugación durante 7 minutos a 2000x g. La muestra resultante se resuspendió a continuación en el tampón
- 50 apropiado, según fue necesario.

En comparación, una muestra que se secó con calor y un vacío de velocidad fue imposible de reconstituir.

Ejemplo 10: Pruebas de Preparaciones Liofilizadas.

55

Las muestras se reconstituyeron en diferentes puntos de tiempo después de la liofilización y se analizaron sus propiedades físicas contra ABX, y AB160 recién hecho.

La distribución del tamaño de partícula se evaluó como se describió anteriormente.

60

La unión de VEGF se evaluó por incubación de la muestra con VEGF durante 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugó a 2000 x g durante 7 minutos. La cantidad de VEGF unida al sedimento (correspondiente a las

nanopartículas) o restante en el sobrenadante se midió con ELISA.

La actividad de paclitaxel se evaluó por citotoxicidad contra células A375 in vitro.

- 5 Sorprendentemente, la liofilización no afectó significativamente el tamaño de partícula, la unión de VEGF o la actividad de paclitaxel, como lo demuestra la capacidad de inhibir la proliferación de células cancerosas. Este resultado se mantuvo para muestras liofilizadas almacenadas durante 1 mes (FIGs. 8A-8C) o 10 meses (FIGs. 8D-8F).

Además sorprendente es que estos resultados se observaron con nanopartículas liofilizadas sin el uso de
10 crioprotectores u otros agentes que pueden afectar negativamente el uso terapéutico humano.

Ejemplo 11: Eficacia de AB160 en Humanos

AB160 se probó en un ensayo clínico de fase 1, el primero en el hombre, que prueba la seguridad de AB160
15 administrado a pacientes con melanoma maligno metastásico que han fallado en las terapias anteriores. El estudio utiliza un diseño clásico de ensayo clínico de fase 1, 3 +3, que prueba 3 dosis diferentes de AB160 en el siguiente esquema:

Tabla 4

20

Nivel de dosis	Complejo AB. Ambos fármacos DEBEN reducirse.	
	Dosis de ABX	Dosis complementaria de BEV
3	175 mg/m ²	70 mg/m ²
2	150 mg/m ²	60 mg/m ²
1*	125 mg/m ²	50 mg/m ²
-1	100 mg/m ²	40 mg/m ²
-2	75 mg/m ²	30 mg/m ²
* El nivel de dosis 1 se refiere a la dosis inicial.		

Las dosis se seleccionaron relevantes para las dosis de Abraxane actualmente utilizadas en la práctica clínica. AB160 se realizó antes de cada dosis de tratamiento. Los tratamientos se administraron como una infusión intravenosa de 30
25 minutos los días 1, 8 y 15 de un ciclo de tratamiento de 28 días. Los tratamientos continuaron hasta toxicidad intolerable, progresión tumoral o rechazo del paciente. Antes de cada ciclo de tratamiento, los pacientes fueron evaluados por toxicidad; las evaluaciones tumorales se realizaron cada dos ciclos (RECIST).

El estudio se acompaña de estudios farmacocinéticos formales (en pacientes) asociados con la dosis 1 de los ciclos
30 1 y 2 de terapia.

A cinco pacientes se les administró AB160, a 100 mg/m² de ABX y 40 mg/m² de BEV, de los cuales cuatro se analizaron.

35

Tabla 5: Curso de Enfermedad en estudio Fase I

Curso de enfermedad: Nivel de Dosis 100 mg/m ²					
Paciente	número de ciclos	respuesta	Tiempo SLP	fuera, razones de tratamiento	tiempo de seguimiento
1	8	estable	238	fuera, progresión	444+
2	6	estable	400+	fuera, toxicidad	400+
3	1	---	182+	fuera, toxicidad	182+
4	6	estable	181	fuera, progresión	203+

La SLP se refiere a la mediana de supervivencia libre de progresión, es decir, el número de días de tratamiento antes de que el cáncer reapareciera. Los eventos adversos se enumeran a continuación. No hubo toxicidad limitante de la
40 dosis (DLT), es decir, los eventos adversos no estaban relacionados con la dosis de AB160. Se proporcionan más detalles en la Tabla 6

Tabla 6: Eventos adversos en estudio Fase I

paciente	toxicidad	DLT
1	linfopenia de grado 2	NO
2	neutropenia grado 3 y leucopenia grado 2 hipertensión y anemia	NO
3	perforación de colon de grado 2, fatiga y aumento de bilirrubina en sangre	NO
4	neutropenia de grado 2	NO

TABLA 7 Curso de Tratamiento: Nivel de Dosis 100 mg/m²

paciente	cantidad de ciclos administrados	número de ciclos donde se omitió el día 15	ciclos donde se omitió el día 15	razones día 15 omitido	número de reducciones de dosis tomadas	ciclos donde se toma la reducción de dosis	motivo de reducciones de dosis	status
1	8	0			1	4	grd 2 neuropatía sensorial	fuera, progresión
2	6	3	1,2,4	grd 3 neutropenia y leucopenia - los 3 ciclos	2	3, 5	ciclo 3: neutropenia de grado 3 y leucopenia ciclo 5: neutropenia de grado 3, leucopenia, y fatiga y neuropatía sensorial grd 2	fuera toxicidad persistente grd 2 neuropatía sensorial
3	1							fuera toxicidad grd 2 perforación colónica
4	6				2	3, 5	grd 2 neuropatía sensorial - ambos ciclos	fuera, progresión

5

La SLP media fue de 7,6 meses y la mediana fue de 7,0 meses.

Comparación con otros ensayos clínicos.

- 10 La siguiente tabla muestra otros estudios clínicos publicados para la terapia con taxanos para el melanoma metastásico.

Tabla 8: Terapia con taxanos para el melanoma metastásico

Estudio o Autor	N	Regímenes de Rx	SLP	OS
<i>Hauschild</i>	135	C = AUC 6 (q21)	4.5	10.5
		P = 225mg/m ² ; D1 (q21)		
<i>Flaherty</i>	411	C = AUC 6 (q21)	4.9	11.3
		P = 225mg/m ² ; D1 (q21)		

Tabla 8: Terapia con taxanos para el melanoma metastásico				
Estudio o Autor	N	Regímenes de Rx	SLP	OS
N057E	41	C = AUC2; D1, 8 15 (q28)	4.5	11.1
	35	A = 100mg/m2; D1, 8, 15 (q28)	4.1	10.9
N047A	53	C = AUC 6; D1 (q28)	6.0	12.0
		P = 80mg/m2; D1, 8, 15 (q21)		
		B = 10mg/kg; D1,15 (q28)		
BEAM	71	C = AUC 5; D1 (q28)	4.2	8.6
		P = 175mg/m2; D1 (q21)		
	143	C = AUC5; D1 (q21)	5.6	12.3
		P = 175mg/m2; D1 (q21)		
		B = 15mg/kg; D1 (q21)		
N0775	51	C = AUC6 (5); D1 (q28)	6.2	13.9
		A= 100 (80)mg/m2; D1, 8, 15 (q28)		
		B = 10mg/kg; D1, 15 (q28)		
Spitler	50	A = 150mg/m2; D1, 8, 15 (q28)	7.6	15.6
		B = 10mg/kg; D1, 15 (q28)		
C = carboplatino, P = paclitaxel, A = nab-paclitaxel, B = bevacizumab				
Referencias:				
Hauschild: Hauschild y col., (2009) J Clin Oncol. 27(17):2823-30				
Flaherty: Flaherty y col., (2010) J Clin Oncol. 28:15s (supl; resumen 8511)				
N057E: Kottschade y col., (2010) Cancer 117(8):1704-10				
N057A: Perez y col., (2009) Cancer 115(1):119-27				
BEAM: Kim y col., (2012) J Clin Oncol. 30(1):34-41				
N0775: Kottschade y co., (2013) Cancer 119(3):586-92				
Spitler: Boasberg y col., (2011) J Clin Oncol. 29 (supl; resumen 8543)				

En el ensayo actual, la administración de partículas AB160 es equivalente a una dosis de 100 mg/m² de abraxano y 40 mg/m² de bevacizumab. El único estudio que utilizó BEV y ABX solo fue Spitler. Spitler, sin embargo, usó una dosis más alta de ABX. El presente estudio también utilizó menos del 10% de la dosis de BEV informada en estudios anteriores, si las dosis se ajustan al paciente promedio (se supone que tiene un área de superficie de 1.9 m² y una masa de 90 kg).

Spitler también examinó a pacientes que no habían sido tratados previamente, mientras que el estudio actual examinó a pacientes que habían fracasado en tratamientos anteriores. El tratamiento previo ineficaz no solo toma tiempo de la SLP esperada, sino que selecciona las células cancerosas que son más resistentes al tratamiento y, por lo general, deja a un paciente en peor condición física. Por lo tanto, se espera que la SLP para una población de pacientes en una terapia de "rescate" (como aquí, con AB160) tenga una SLP más baja que una población ingenua. Esto se puede ver en un ensayo clínico de fase 2 (Hersh y col., Cancer, enero de 2010, 116:155) que examinó a los pacientes de rescate e ingenuos con Abraxane solo. Para los pacientes tratados previamente con Abraxane solo, la SLP fue de 3,5 meses. Hersh y col. Ann. Oncol 2015, (epub 26 de septiembre de 2015), informaron una SLP de 4,8 meses para pacientes ingenuos tratados con ABX solo.

Tabla 9: Rendimiento de AB160 en un estudio limitado contra datos publicados

Estudio	Tratamiento previo	Dosis ABX en paciente promedio (dosis relativa)	Dosis BEV en paciente promedio (dosis relativa)	SLP (meses)
AB160	Sí	190 mg/paciente (100 mg/m ²)	76 mg/paciente (40 mg/m ²)	7,0
Spitler	No	285 mg/paciente (150 mg/m ²)	900 mg/paciente (10 mg/kg)	8.3
Hersh 2010	Sí	190 mg/paciente (100 mg/m ²)	-	3.5
Hersh 2010	No	285 mg/paciente (150 mg/m ²)	-	4.5
Hersh 2015	No	285 mg/paciente (150 mg/m ²)	-	4.8

Por lo tanto, los primeros resultados del ensayo clínico de fase I con AB160 indican un aumento en la SLP en el melanoma maligno metastásico en etapa tardía en pacientes tratados previamente. Este aumento es particularmente sorprendente dado que la SLP fue mayor que la de Spitler, que no recibió quimioterapia y recibió una dosis más alta de Abraxane, y una dosis de bevacizumab casi 12 veces mayor. La dosis de BEV utilizada en AB160 es muy inferior a la de cualquier otro estudio, por lo que la mejor comparación no es Spitler, sino Hersh.

Por lo tanto, el complejo ABX/BEV (AB160) es superior a la administración secuencial de ABX y BEV, o ABX solo, y logra este resultado superior con una dosis efectiva muy baja de BEV. Por lo tanto, los datos son consistentes con AB160 que tiene una orientación mejorada de los quimioterapéuticos para el tumor, y que esta orientación está mediada por BEV. Es posible que la nanopartícula ABX ayude a dirigir el BEV al tumor, ya que los tumores absorben selectivamente la albúmina. También es posible que la existencia del complejo BEV/ABX muestre una mayor estabilidad *in vivo* que Abraxane.

Ejemplo 12: Estudio de seguimiento para investigar si el pretratamiento con BEV mejora la focalización

Siguiendo el protocolo general anterior, se inyectó a ratones desnudos atímicos 1×10^6 células A375 de melanoma humano en el flanco derecho y a continuación tratadas con PBS, 12 mg/kg BEV, 30 mg/kg ABX, AB160, o pretratadas con 1,2 mg/kg BEV y, 24 horas después, AB160. Los datos se representan en el 7 y 10 días post-tratamiento como volumen tumoral en mm³. F 11A-E rastrea el tamaño del tumor durante 10 días. Solo los ratones tratados con AB160 (con o sin pretratamiento con BEV) mostraron una reducción en el volumen tumoral promedio. Ver también la FIG. 11F y la FIG. 11G.

Los datos del tratamiento del día 7 después del tratamiento, como se resume en la FIG. 11F, muestran que el pretratamiento con BEV se asoció con una reducción estadísticamente significativa en el volumen del tumor sobre el control o BEV solo ($p \leq 0,0001$), o ABX solo ($p \leq 0,0001$).

Los datos del día 10 después del tratamiento, como se resume en la FIG. 11G, muestran nuevamente que el pretratamiento con BEV se asoció con una reducción estadísticamente significativa en el volumen del tumor sobre el control o BEV solo ($p \leq 0,0001$), o ABX solo ($p \leq 0,0001$). El pretratamiento con BEV antes de AB160 también se asoció con una reducción en el volumen del tumor sobre AB160 solo ($p = 0,02$), con respuesta completa en dos ratones.

En este experimento, una dosis de 12 mg/kg de BEV no fue terapéutica. La cantidad de BEV añadida en el grupo de pretratamiento fue de solo 1,2 mg/kg, que es 1/10 de la dosis habitual en ratones. Sin embargo, el tratamiento previo con una dosis subterapéutica parece mostrar una eficacia mejorada de la nanopartícula AB160. Estos datos respaldan la idea de que el pretratamiento con una cantidad subterapéutica de BEV puede eliminar los niveles sistémicos de VEGF, dejando una mayor concentración relativa en el tumor, de modo que la orientación del VEGF asociado al tumor por las nanopartículas AB160 es más efectiva.

Ejemplo 13: Medios alternativos para administrar nanopartículas

Se contempla que las nanopartículas de esta invención pueden administrarse directamente al tumor. Por ejemplo, las nanopartículas se pueden administrar a través de una cánula intraarterial o mediante inyección directa en el tumor. Se contempla que las nanopartículas grandes (por ejemplo, 580 nm o 1130 nm) pueden administrarse mediante inyección directa o cerca de un tumor.

REIVINDICACIONES

1. Una composición liofilizada que comprende complejos de nanopartículas que tienen una superficie externa, donde cada uno de los complejos de nanopartículas comprende
 - a. una proteína vehículo que es albúmina,
 - b. entre aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 anticuerpos que tienen una porción Fc y una porción de unión a antígeno, y
 - c. al menos un agente terapéutico que es paclitaxel,
 donde la proteína vehículo, los anticuerpos y el al menos un agente terapéutico están unidos a través de enlaces no covalentes, dichos complejos de nanopartículas se liofilizan, y donde tras la reconstitución con una solución acuosa, las porciones de unión a antígeno de los anticuerpos permanecen dispuestas en la superficie externa de los complejos de nanopartícula, y además donde los complejos de nanopartícula siguen siendo capaces de unirse al antígeno *in vivo*.
2. La composición de nanopartículas liofilizadas de la reivindicación 1, donde cada uno de los complejos de nanopartículas comprende entre aproximadamente 400 y aproximadamente 800 anticuerpos.
3. La composición liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos un agente terapéutico está ubicado dentro de la nanopartícula, dispuesto en la superficie externa de los complejos de nanopartículas, o ambos.
4. La composición liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en ado-trastuzumab emtansine, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, denosumab, dinutuximab, ipilimumab, nivolumab, obinutuzumab, ofatumumab, panitumumab, pembrolizumab, pertuzumab, rituximab y trastuzumab
5. La composición liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los anticuerpos se disponen en una capa sustancialmente única de anticuerpos en la totalidad o parte de la superficie externa de los complejos de nanopartículas.
6. La composición liofilizada de la reivindicación 1, donde cada uno de los complejos de nanopartículas comprende:
 - a. un núcleo de paclitaxel unido a albúmina y
 - b. una cantidad de bevacizumab dispuesta en la superficie externa del núcleo de paclitaxel unido a la albúmina de tal manera que la porción de unión del anticuerpo se dirige hacia afuera desde la superficie externa, donde los anticuerpos retienen su asociación con la superficie externa de la nanopartícula tras la reconstitución con una solución acuosa solución, y los complejos de nanopartículas reconstituidos son capaces de unirse al VEGF *in vivo*.
7. La composición liofilizada de la reivindicación 6, donde la relación en peso de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab está entre aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:1.
8. La composición liofilizada de la reivindicación 7, donde la relación en peso de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab es de aproximadamente 10:4.
9. La composición liofilizada de la reivindicación 1, donde la albúmina es albúmina de suero humano.
10. La composición liofilizada de la reivindicación 1, donde cada uno de los complejos de nanopartículas comprende:
 - a. albúmina,
 - b. entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000 anticuerpos contra bevacizumab, cada uno con una porción de Fc hidrófoba y una porción de unión a VEGF, donde la porción de unión a VEGF está dispuesta en la superficie externa externa de los complejos y
 - c. paclitaxel,
 dichos complejos de nanopartículas se liofilizan y donde, tras la reconstitución con una solución acuosa, las porciones de unión a VEGF de los anticuerpos permanecen dispuestas en la superficie exterior externa de los complejos de nanopartículas, y siguen siendo capaces de unirse a VEGF *in vivo* y las porciones Fc se asocian con dicha albúmina,

y además donde dichos complejos tienen un tamaño promedio de aproximadamente 130 nm a aproximadamente 800 nm.

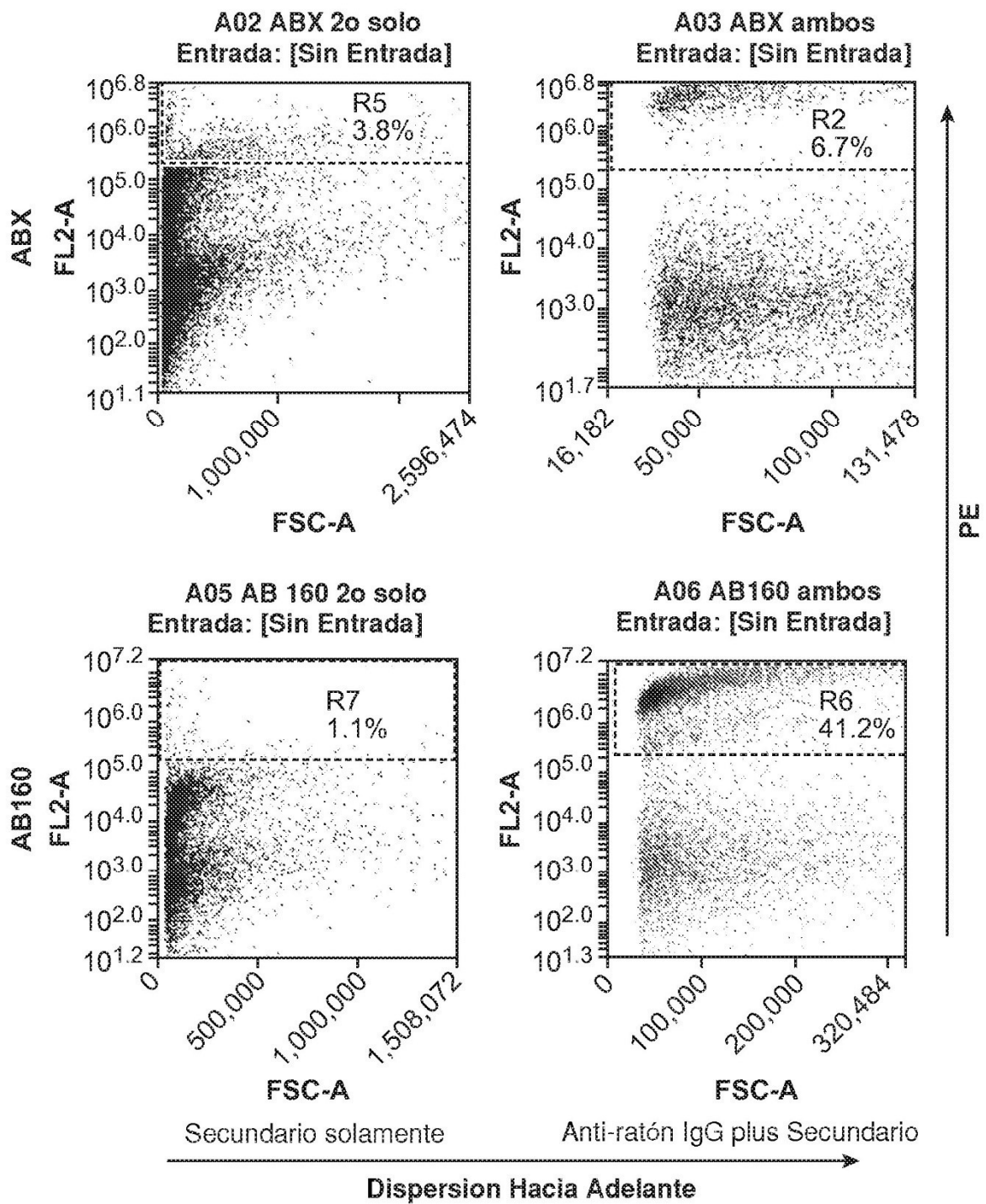
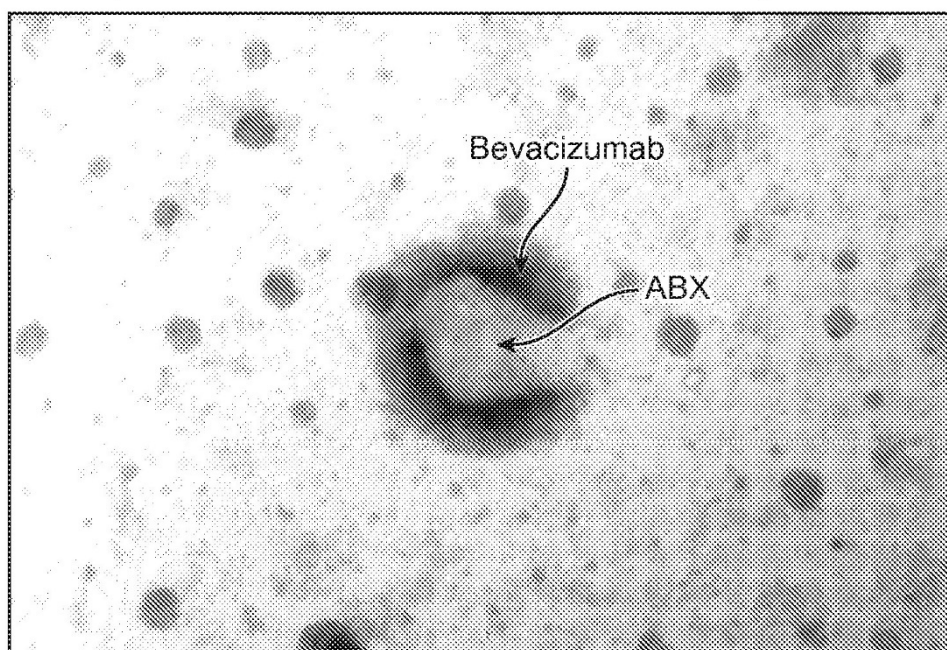


FIG. 1A

Microscopía electrónica de AB160 marcada con oro IgG anti-humano



Abraxane-avastin_2
Complejo abraxane-avastin
JEOL1400
X150000

200 nm
80 kV
10/1/2013
BQ

FIG. 1B

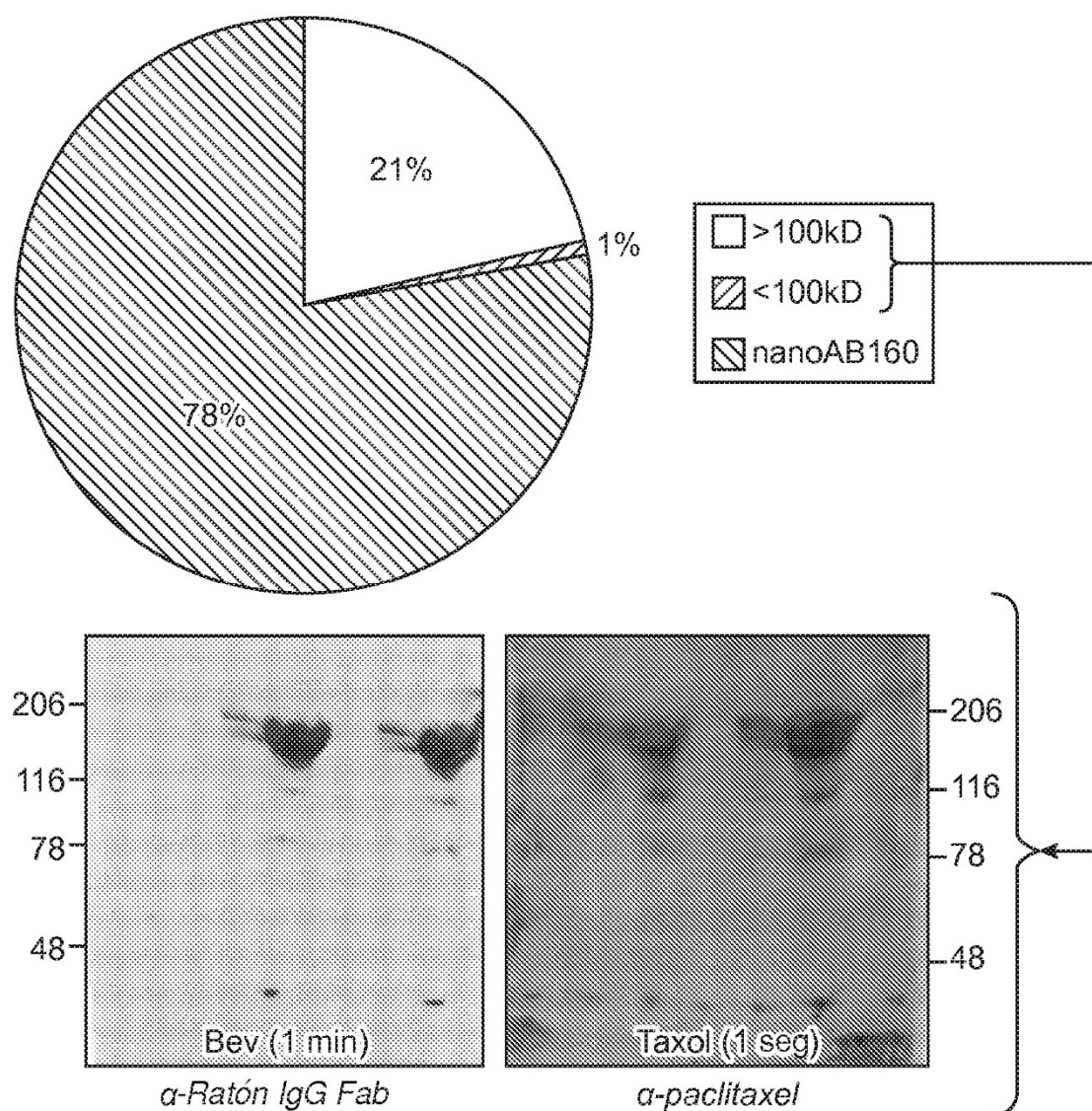


FIG. 1C

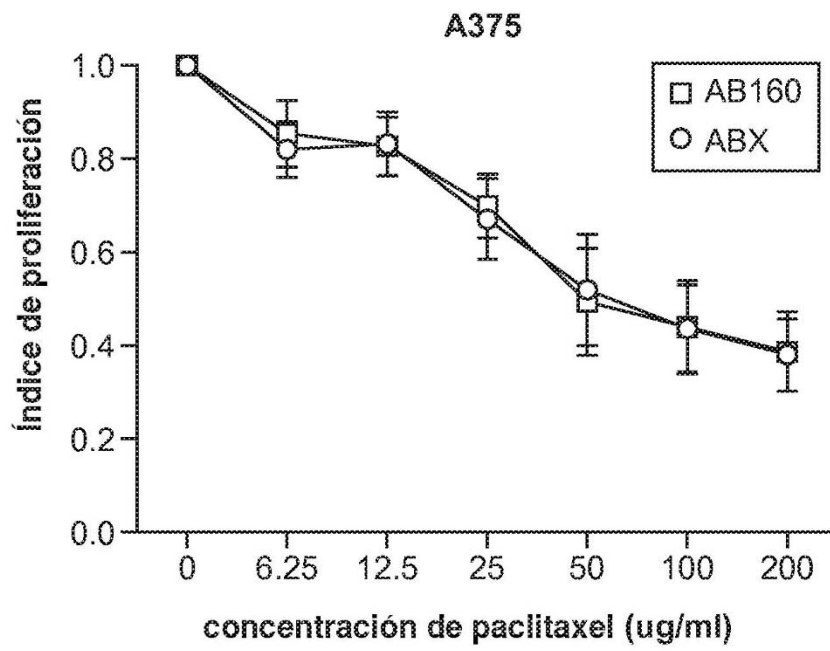


FIG. 1D

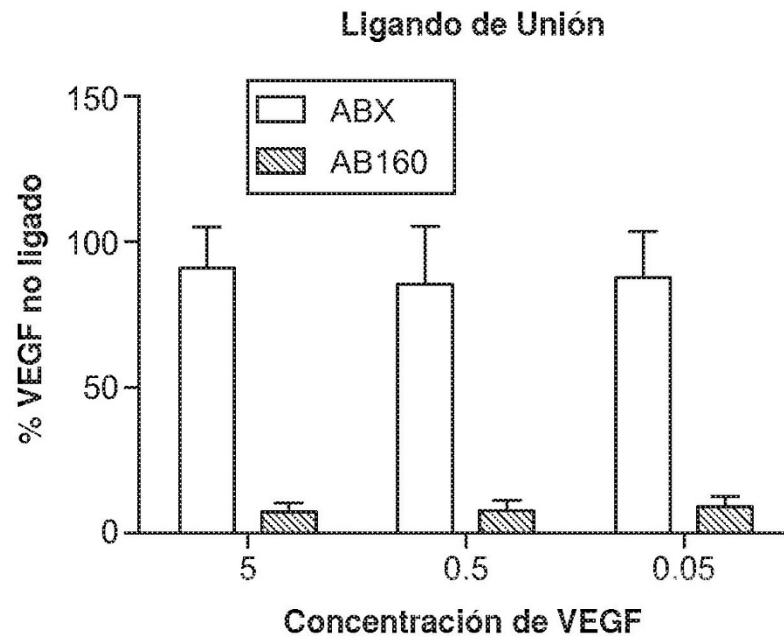
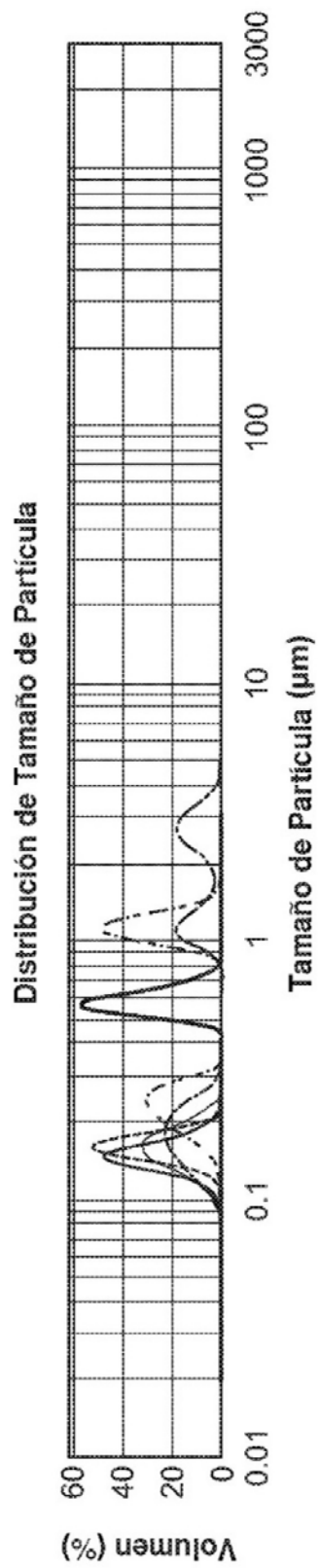


FIG. 1E



ABX (mg/ml)	BEV (mg/ml)	$d(0.1)$ µm	$d(0.5)$ µm	$d(0.9)$ µm
— 10	0	0.125	0.146	0.174
- - - 10	2	0.122	0.157	0.196
— 10	4	0.138	0.159	0.182
- - - 10	6	0.124	0.174	0.235
- - - 10	8	0.171	0.226	0.278
— 10	10	0.516	0.577	0.67
- - - 10	15	0.981	1.129	1.31
— 10	25	1.036	2.166	3.233

FIG. 2A

AB160Kd		Temperatura		
		RT	37C	58C
pH	3	$8.2 \times 10(-10)$	$1.51 \times 10(-11)$	Sin encuadernación
	5	$1.45 \times 10(-10)$	$6.17 \times 10(-9)$	$1.75 \times 10(-11)$
	7	$2.2 \times 10(-8)$	$1.51 \times 10(-8)$	$8.21 \times 10(-10)$
	9	$1.3 \times 10(-9)$	$1.39 \times 10(-5)$	$2.0 \times 10(-9)$

FIG. 2B

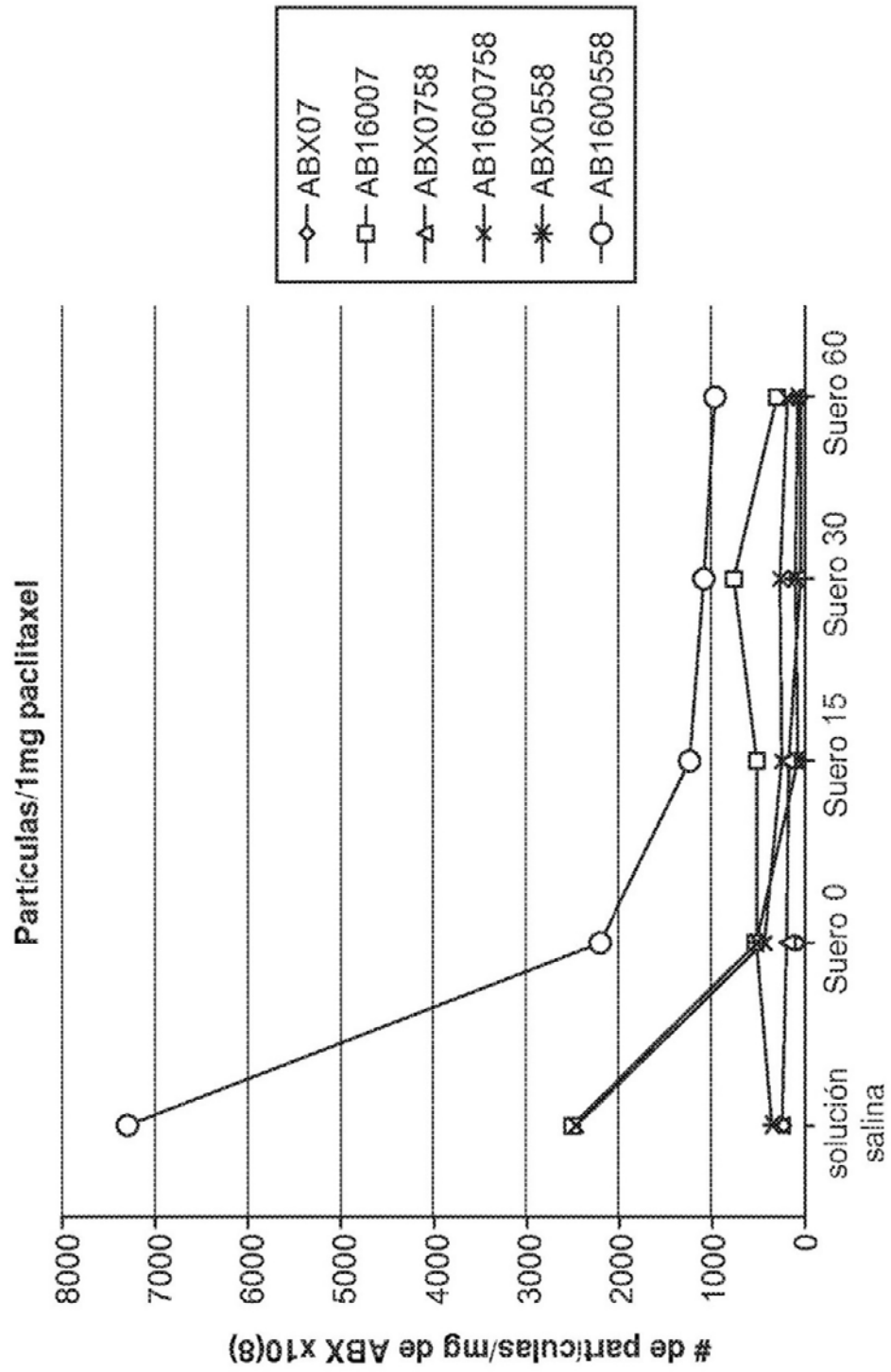


FIG. 2C

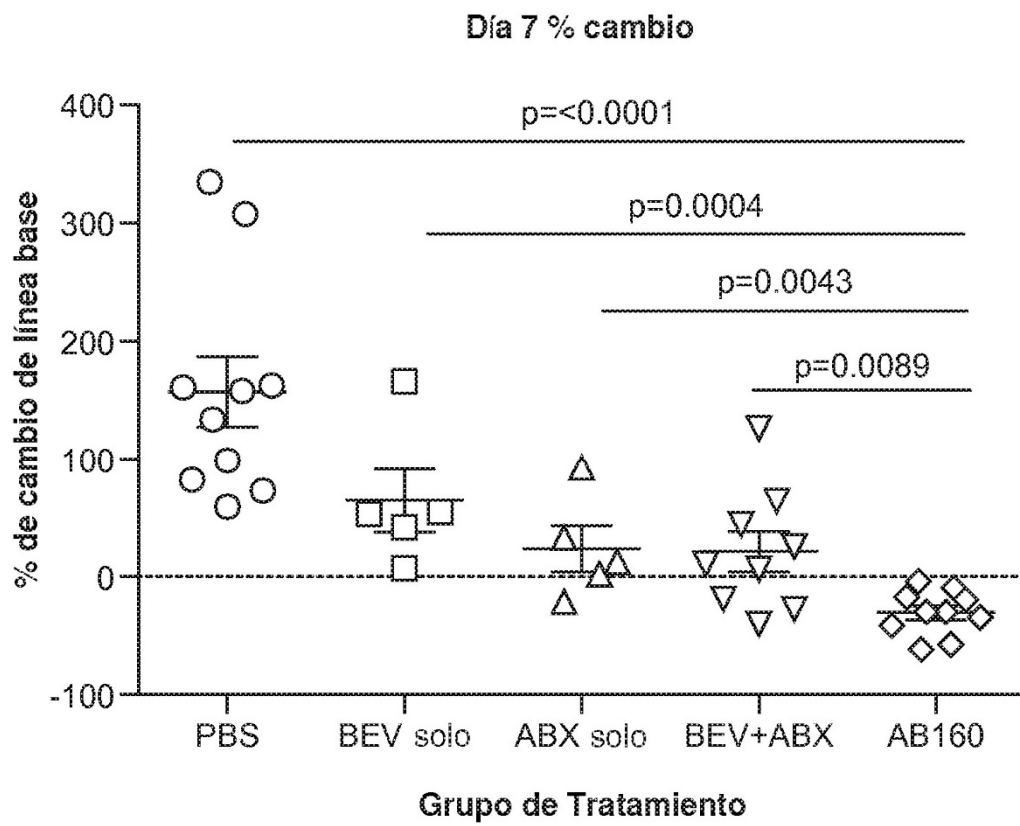
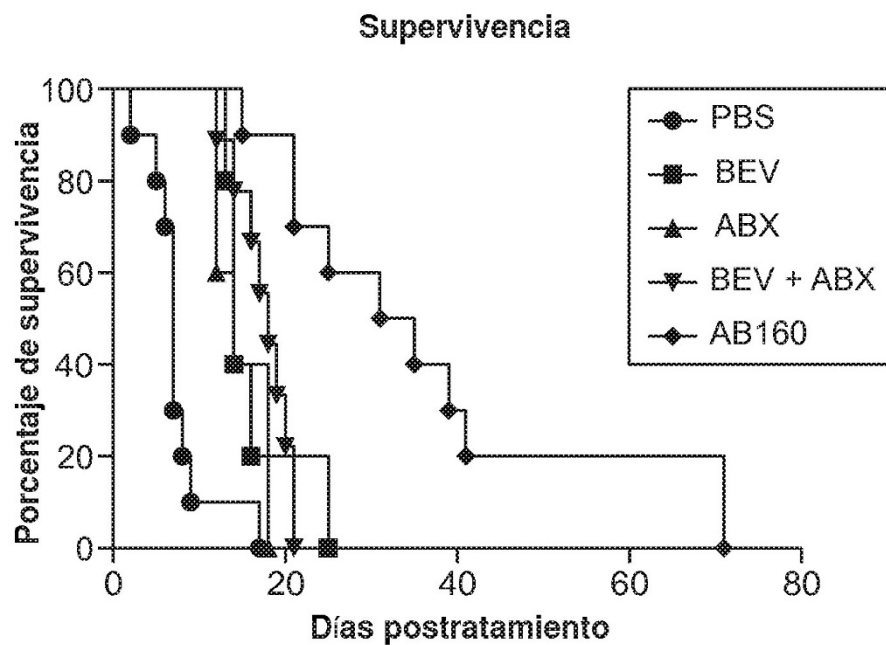


FIG. 3A



	PBS	BEV	ABX	BEV+ABX	AB160
Supervivencia media	7	14	14	18	33

$p=0.0006$

$p=0.0003$

$p=0.003$

$p<0.0001$

FIG. 3B

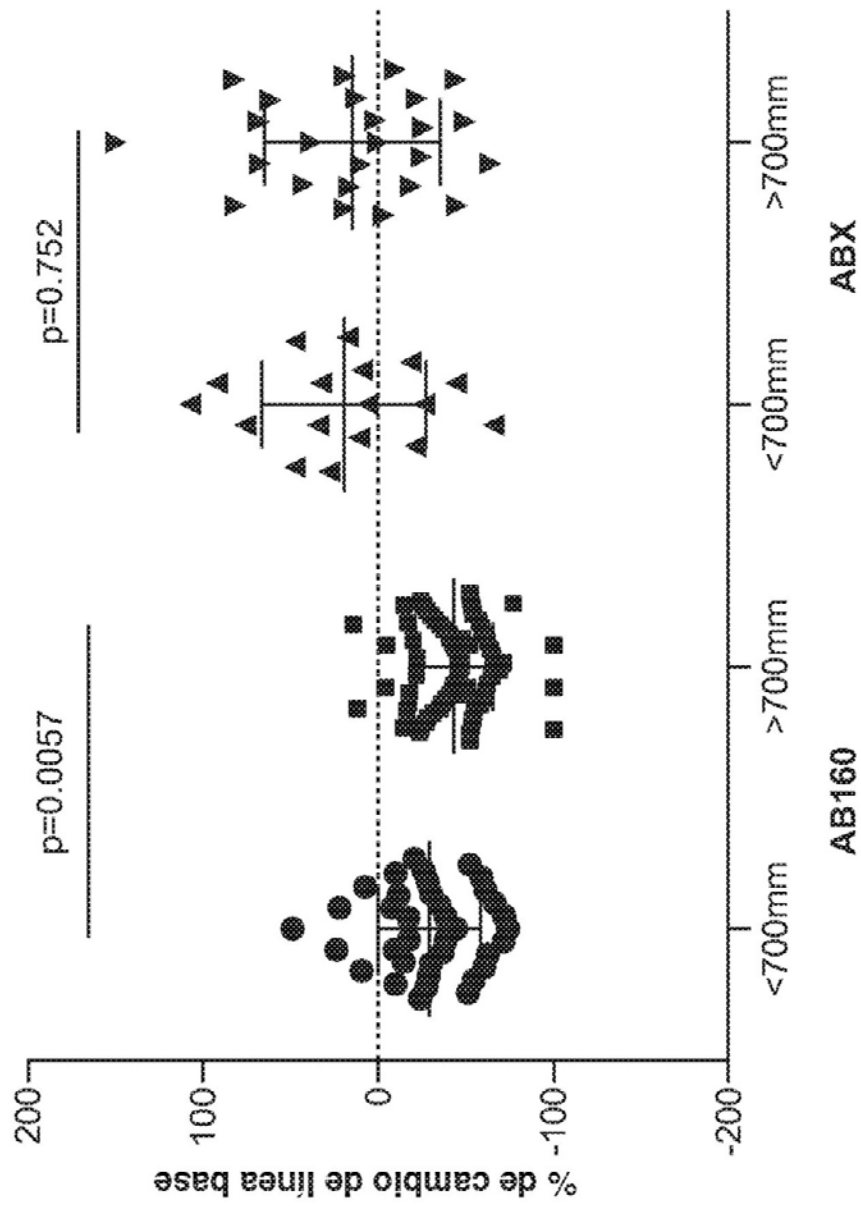


FIG. 3C

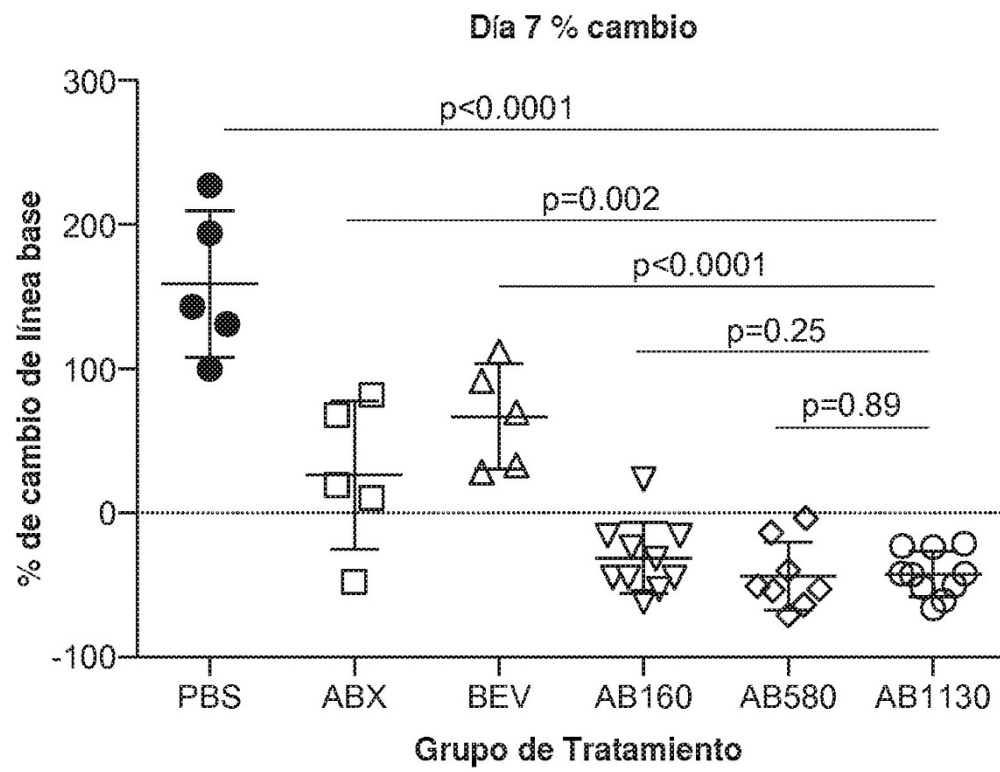
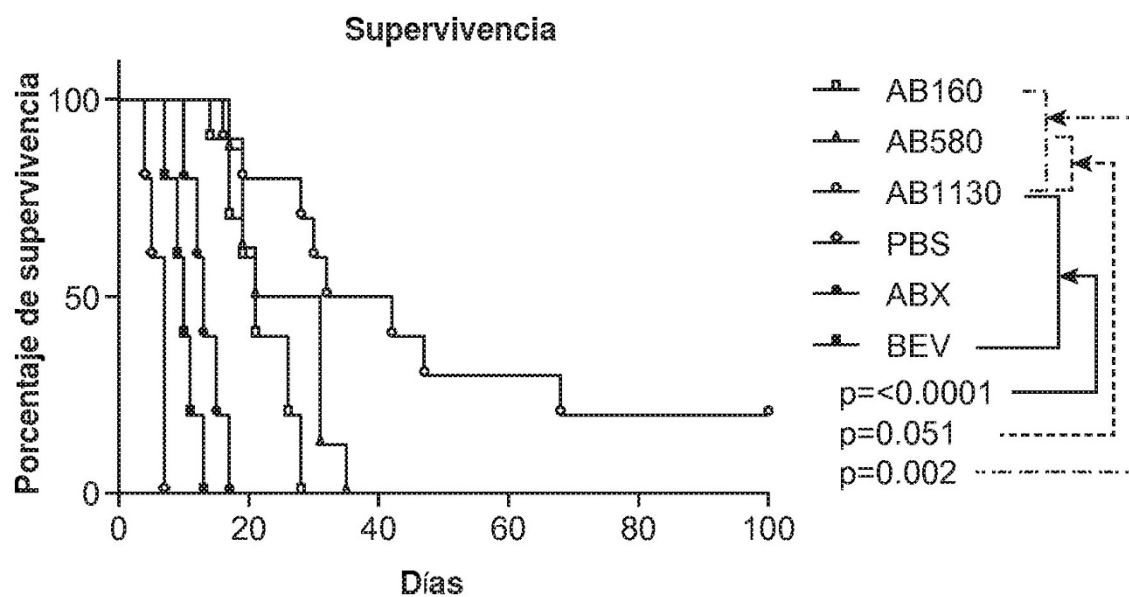


FIG. 3D



AB160	AB580	AB1130	PBS	ABX	BEV
21	26	37	7	13	10

FIG. 3E

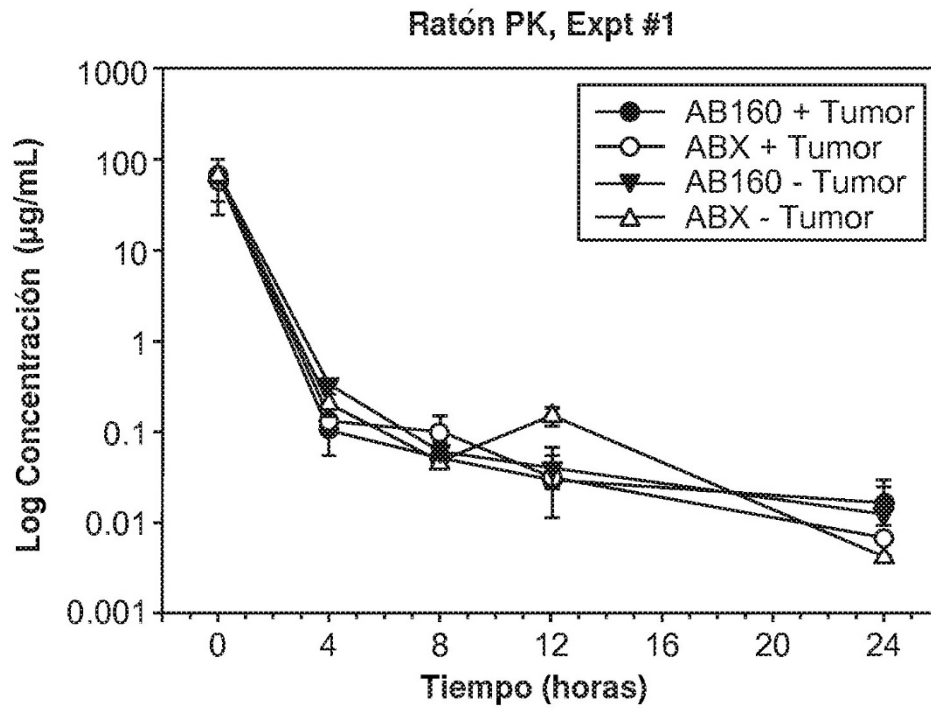


FIG. 4A

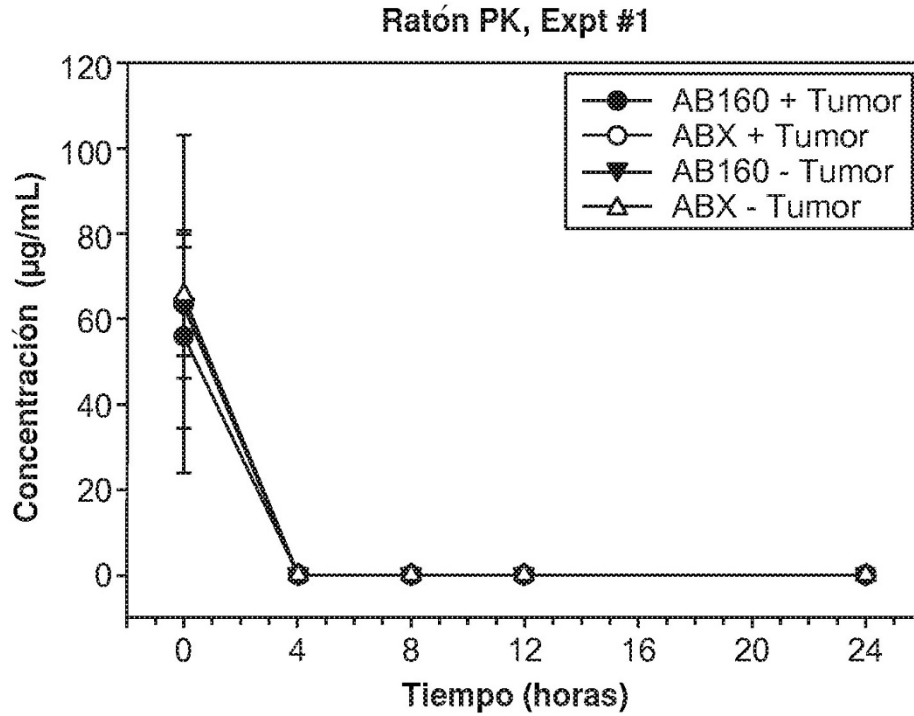


FIG. 4B

	SinTumor		Tumor	
	AB160 ± SD	ABX ± SD	AB160 ± SD	ABX ± SD
C_{max} (µg/mL)	63.3 ± 39.4	65.5 ± 14.4	55.7 ± 21.2	63.3 ± 17.3
Vida media (hrs)	4.7	3.8	8.0	4.5
AUC_{0-24h} (µg/ml x h)	129	133	112	128
$AUC_{0-\infty}$ (µg/ml x h)	129	133	112	128

FIG. 4C

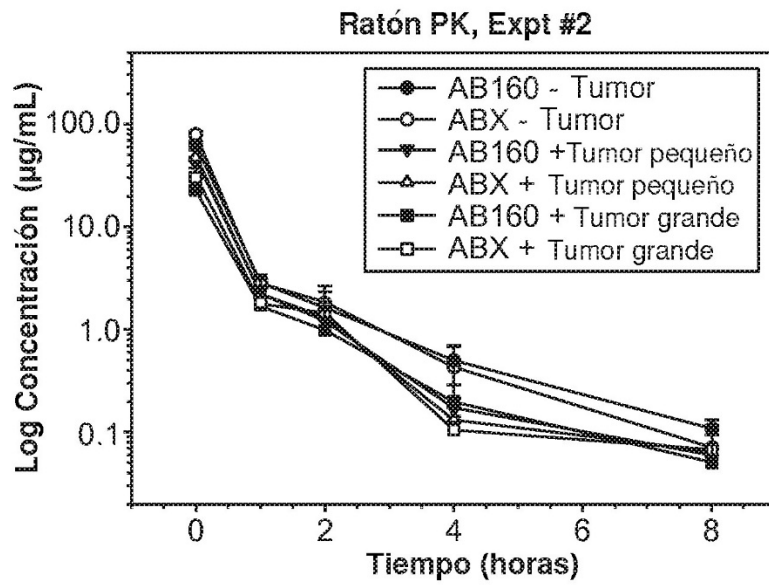


FIG. 4D

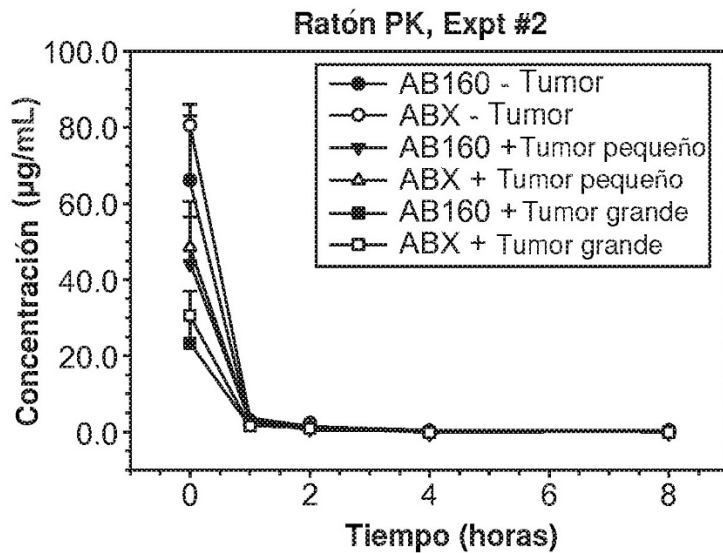


FIG. 4E

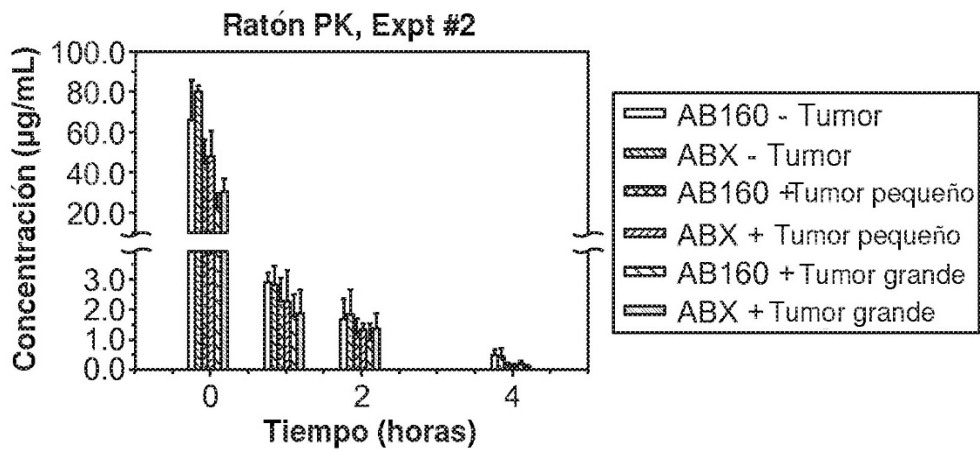
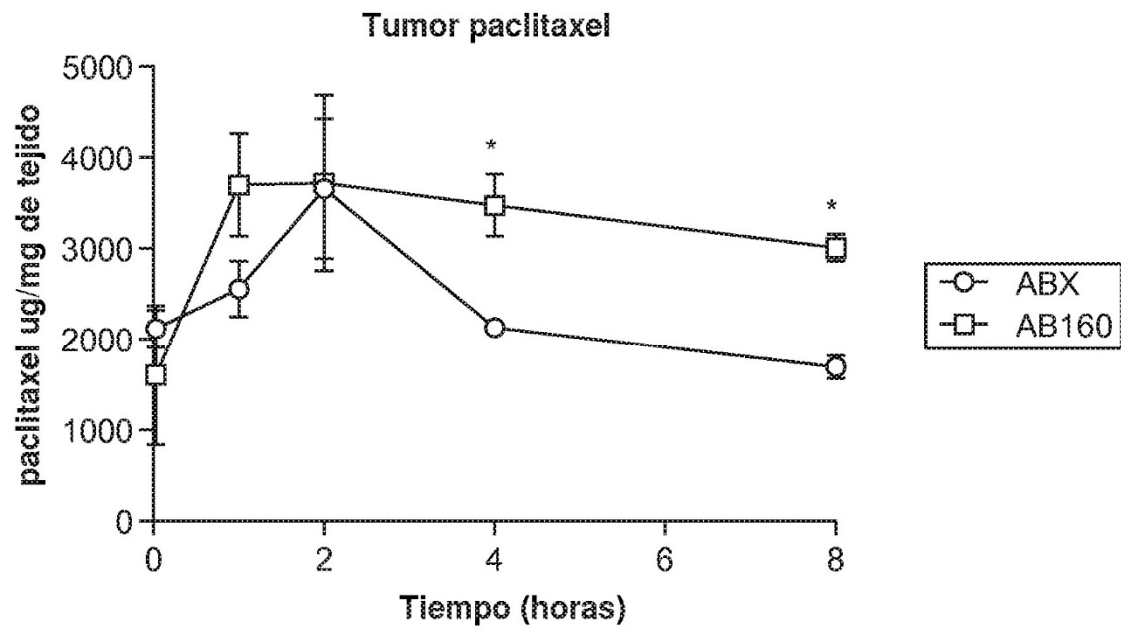


FIG. 4F

	$C_{\max}$ $\mu\text{g/mL} \pm \text{SD}$	$\text{AUC}_{0-8\text{h}}$ $\mu\text{g/mL} \times \text{h}$
AB160, SinTumor	66.1 ± 19.8 (30%)	40.1
ABX, SinTumor	80.4 ± 2.7 (3%)	47.2
AB160, Tumor pequeño	44.4 ± 12.1 (27%)	26.9
ABX, Tumor pequeño	48.4 ± 12.3 (25%)	28.9
AB160, Tumor grande	22.8 ± 6.9 (30%)	15.3
ABX, Tumor grande	30.7 ± 5.2 (17%)	19.7

FIG. 4G



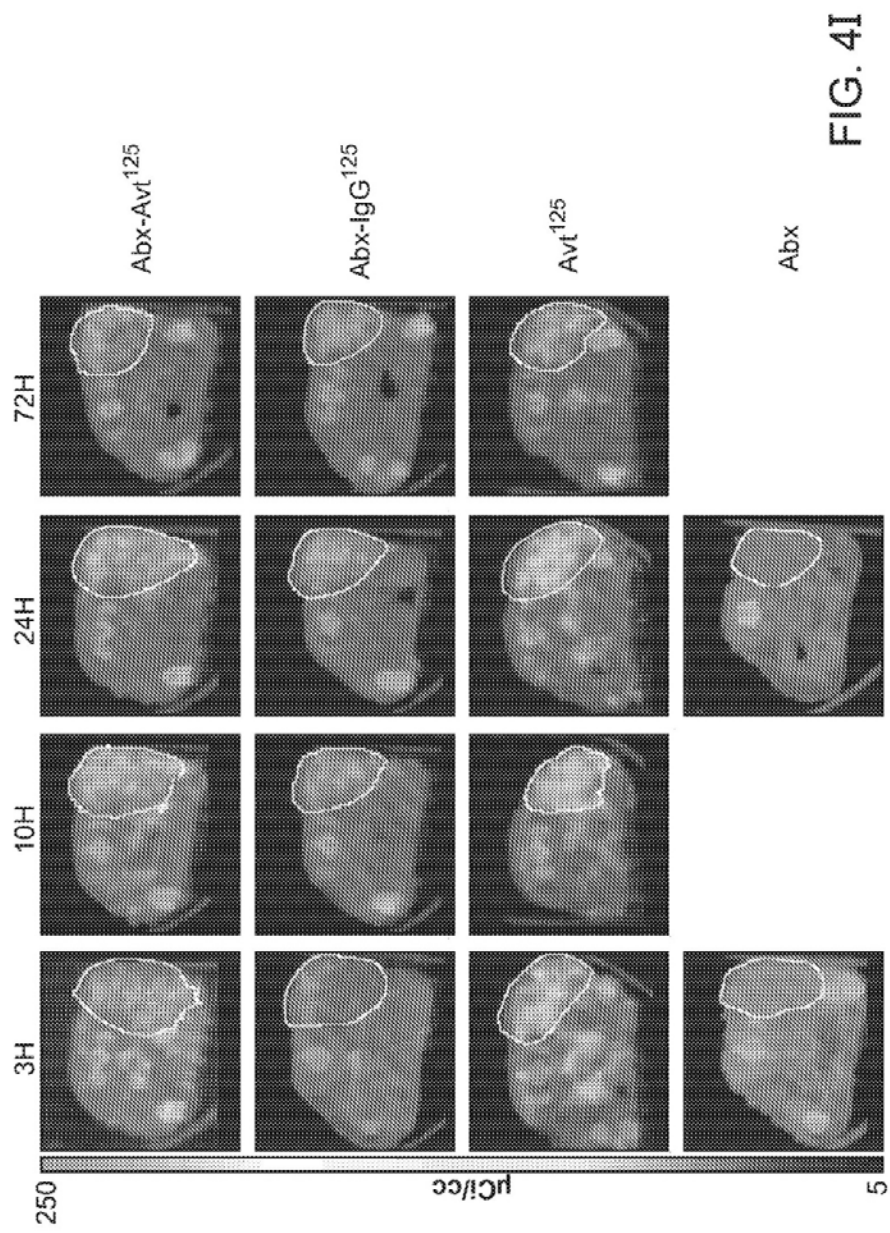


FIG. 4I

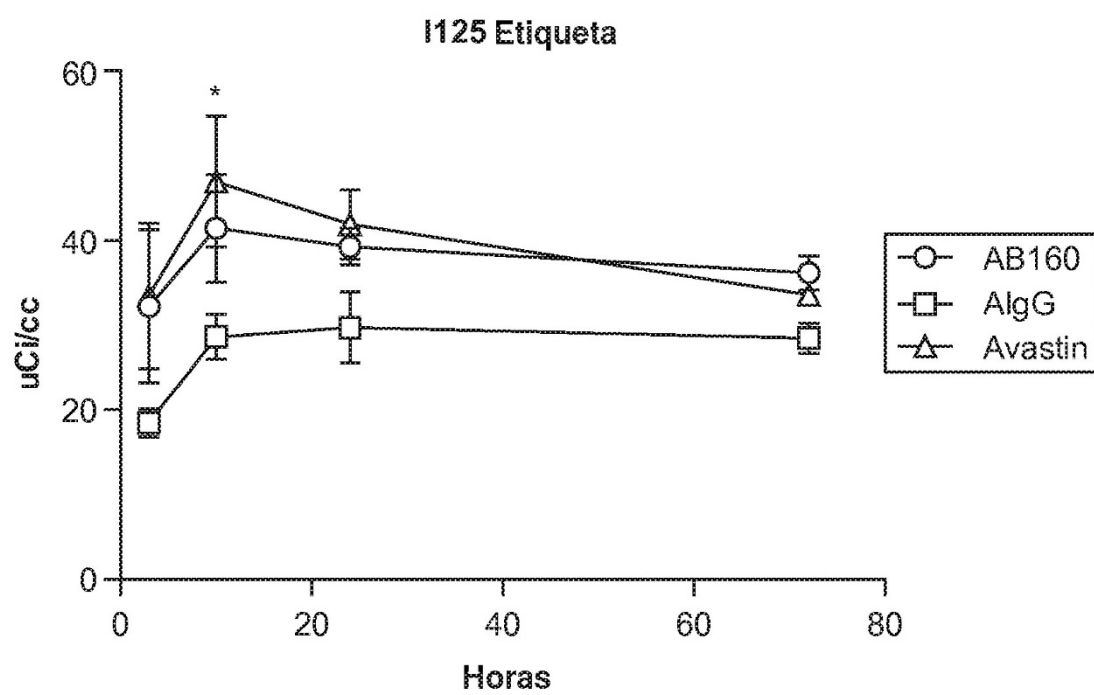
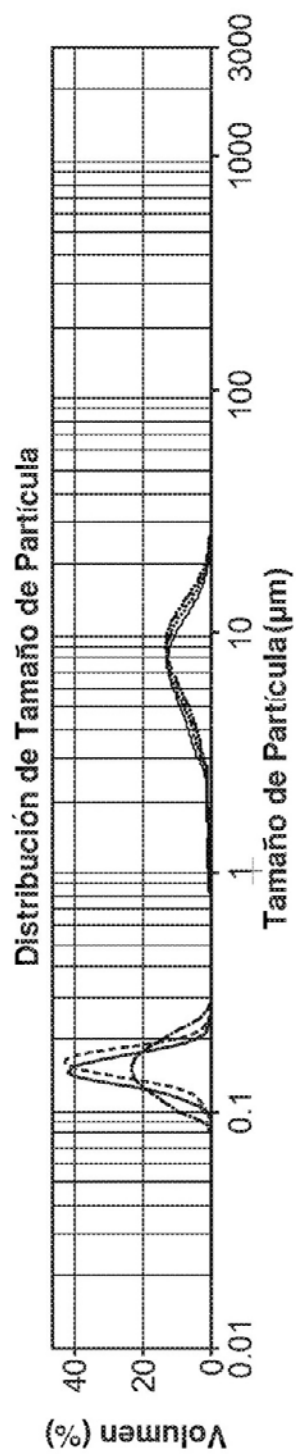
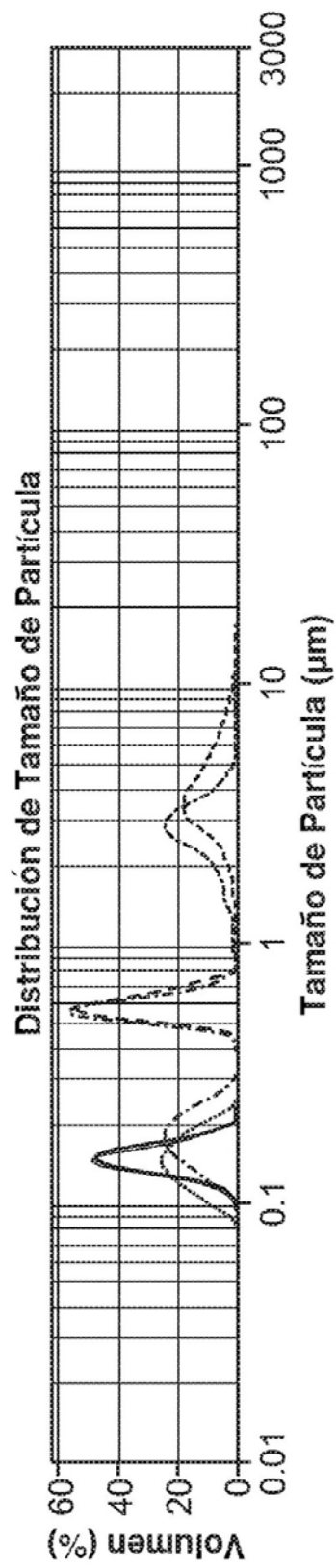


FIG. 4J



ABX (mg/ml)	RIT (mg/ml)	d (0.1)	d (0.5)	d (0.9)
— 10	0	0.123	0.147	0.176
- - - 10	2	0.132	0.159	0.187
· · · 10	4	0.11	0.15	0.205
— 10	6	3.367	6.98	12.312
- - - 10	8	3.619	7.621	13.152
· · · 10	10	3.863	8.286	14.214

FIG. 5A



ABX (mg/ml)	HER (mg/ml)	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
..... 10	0	0.110	0.147	0.195
—— 10	2	0.127	0.148	0.175
----- 10	4	0.130	0.151	0.175
- - - - - 10	6	0.131	0.179	0.239
- - - - - 10	8	0.507	0.566	0.652
- - - - - 10	10	0.517	0.583	0.687
—— 10	15	2.55	3.864	6.872
----- 10	22	1.753	2.858	3.897

FIG. 5B

Rituximab	pH3	pH5	pH7	pH9
Kd	$4.49 \times 10(-10)$	$2.93 \times 10(-9)$	$3.78 \times 10(-9)$	$2.50 \times 10(-8)$
Trastuzumab	pH3	pH5	pH7	pH9
Kd	$2.61 \times 10(-9)$	$1.23 \times 10(-9)$	$2.59 \times 10(-9)$	$1.91 \times 10(-9)$

FIG. 5C

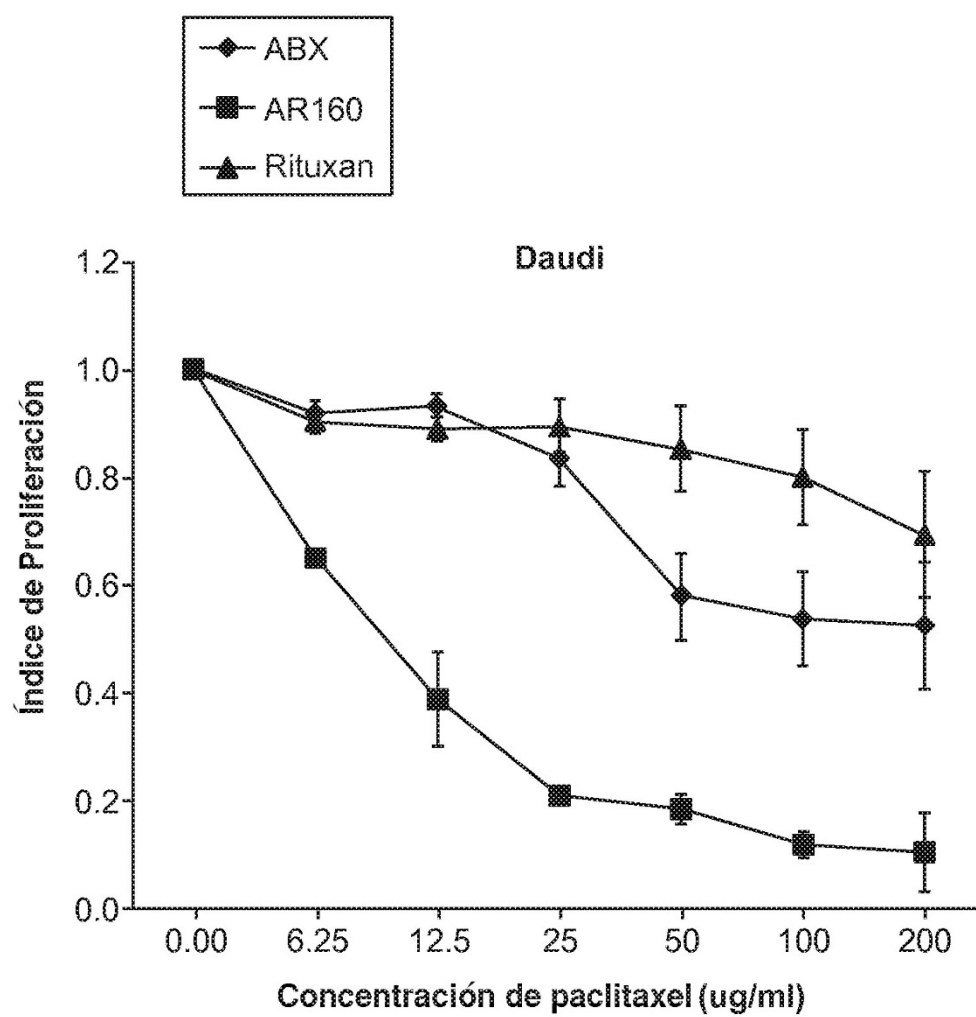


FIG. 6A

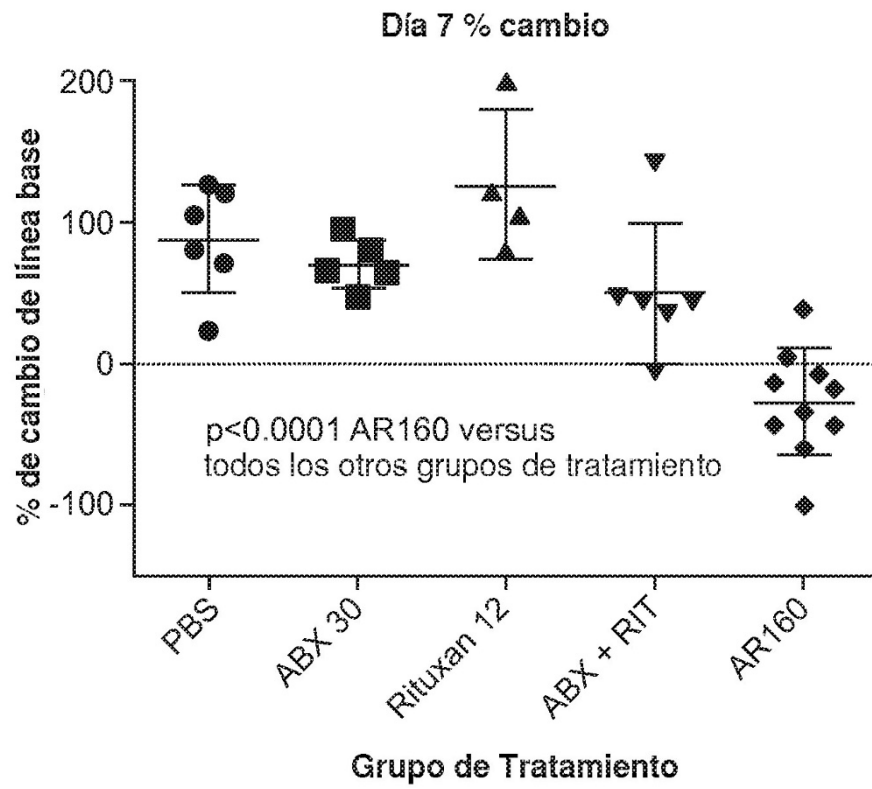
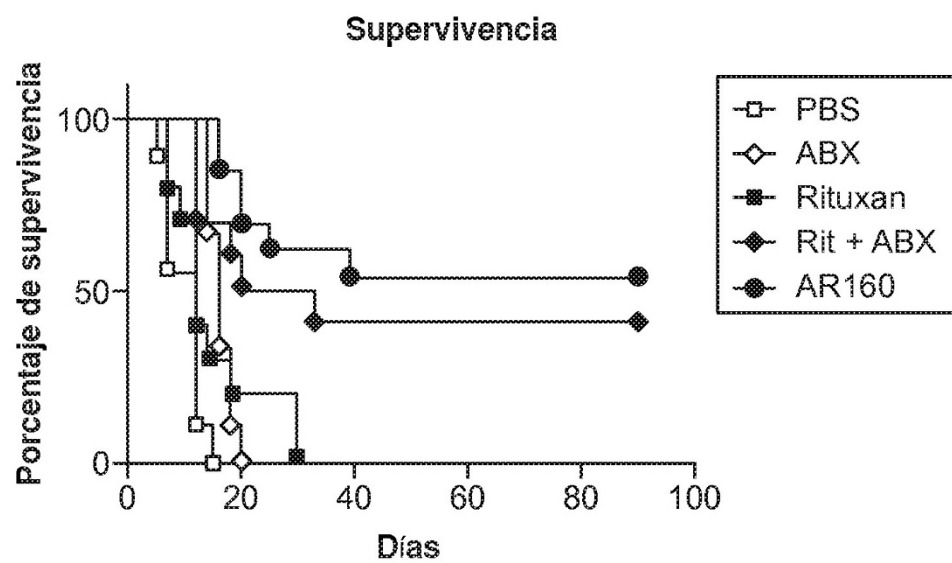


FIG. 6B



	PBS	ABX	Rituxan	Rit + ABX	AR160
Supervivencia media	12	16	12	26.5	Indefinido

p=0.36

p=0.0002

p<0.0001

p<0.0001

FIG. 6C

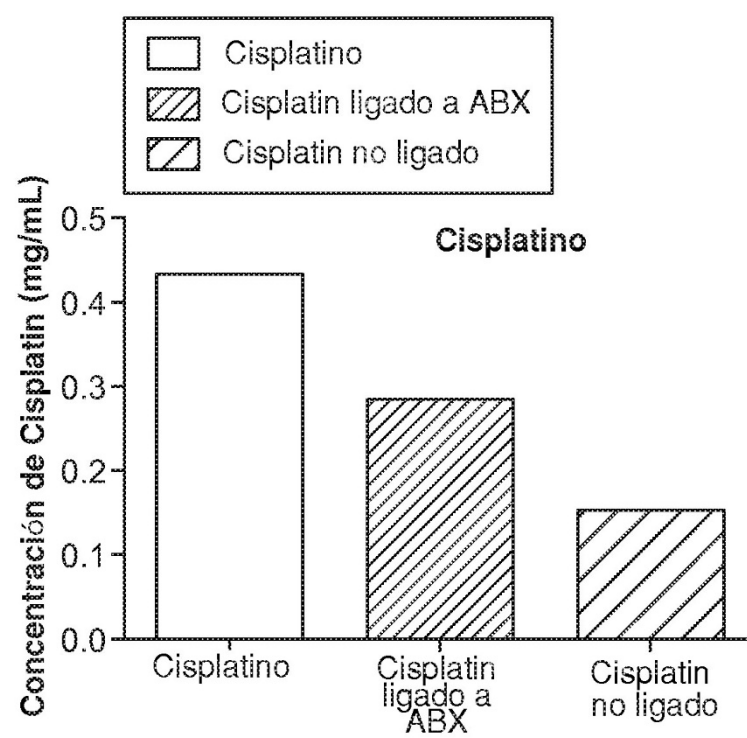


FIG. 7A

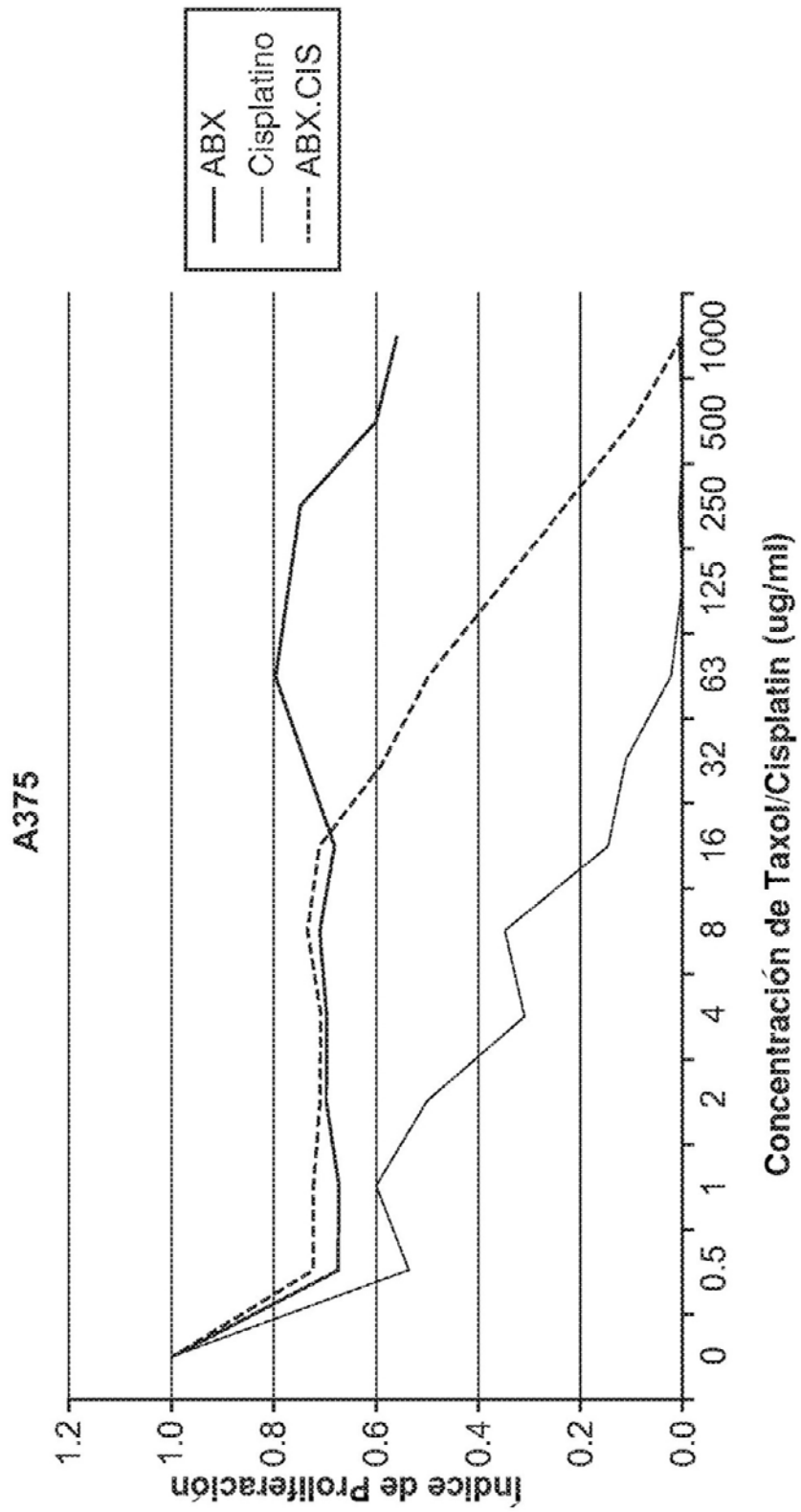


FIG. 7B

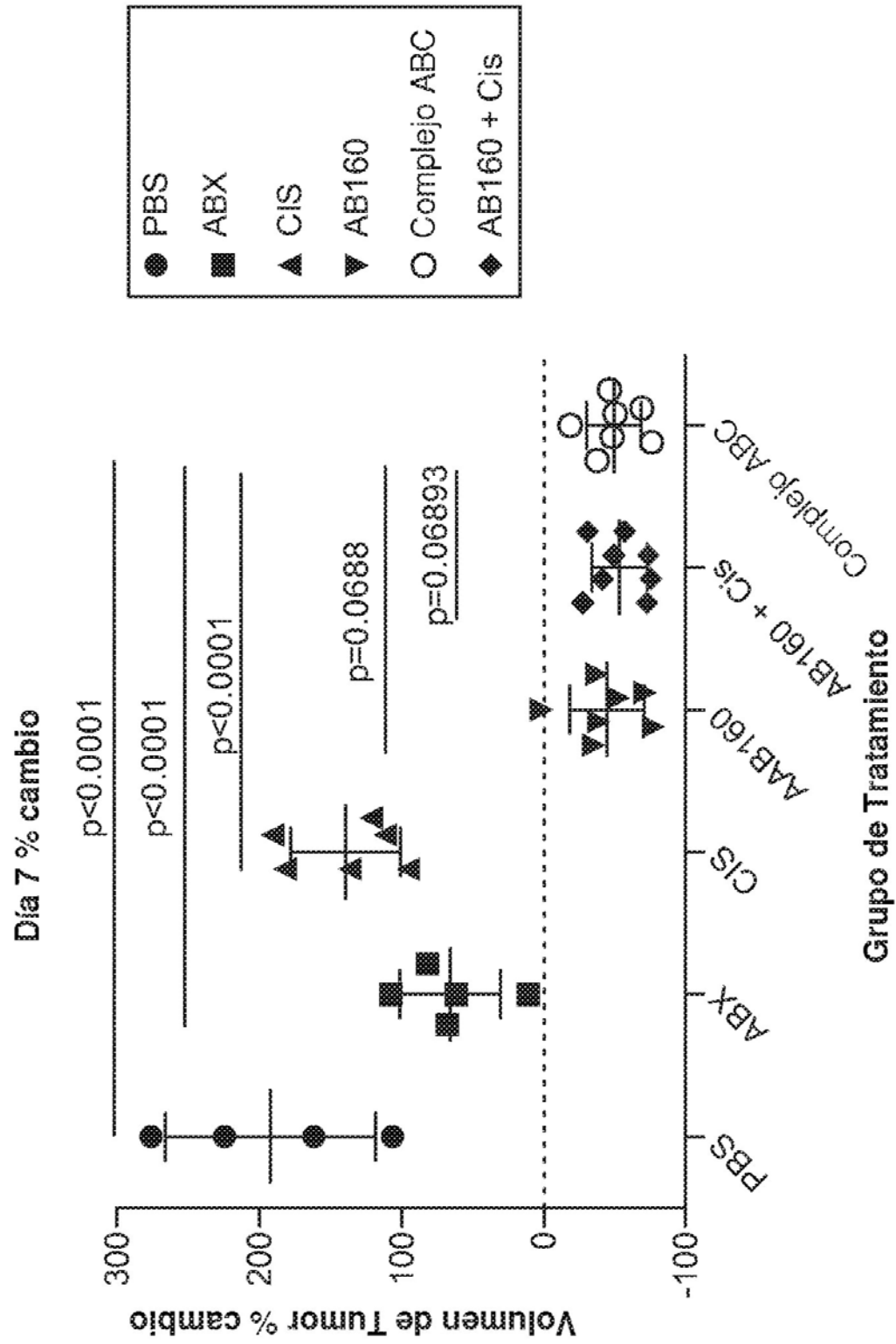


FIG. 7C

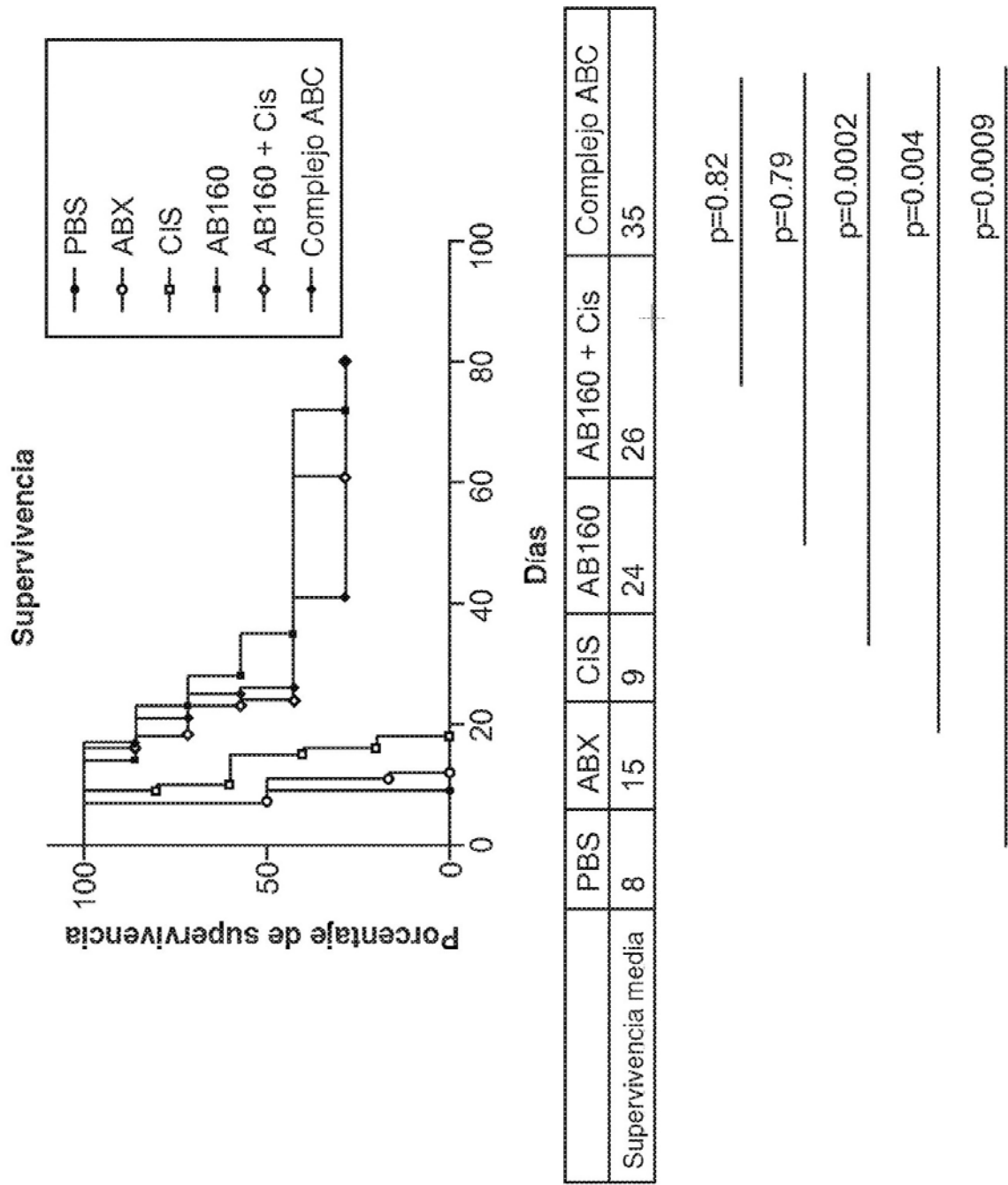


FIG. 7D

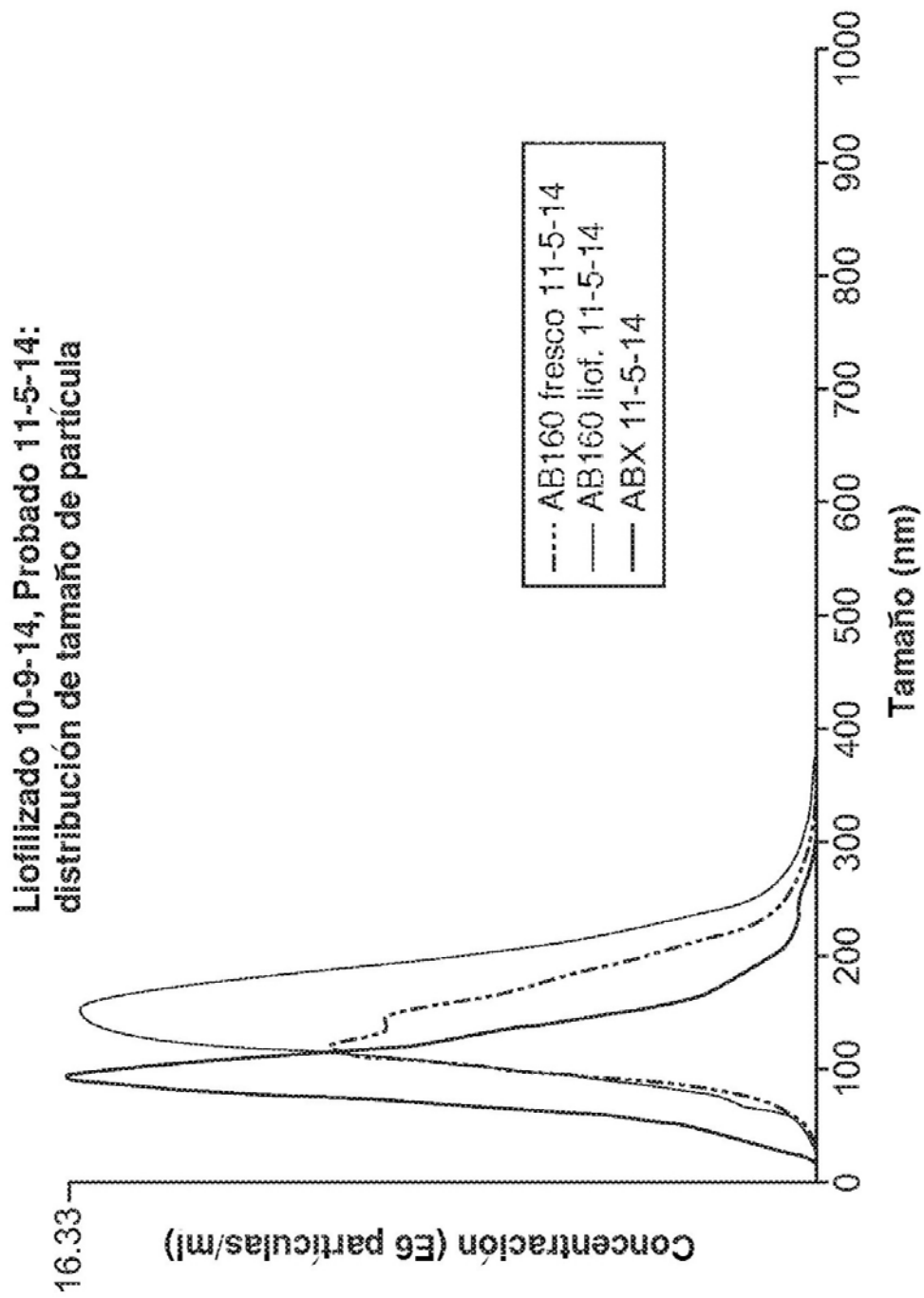


FIG. 8A

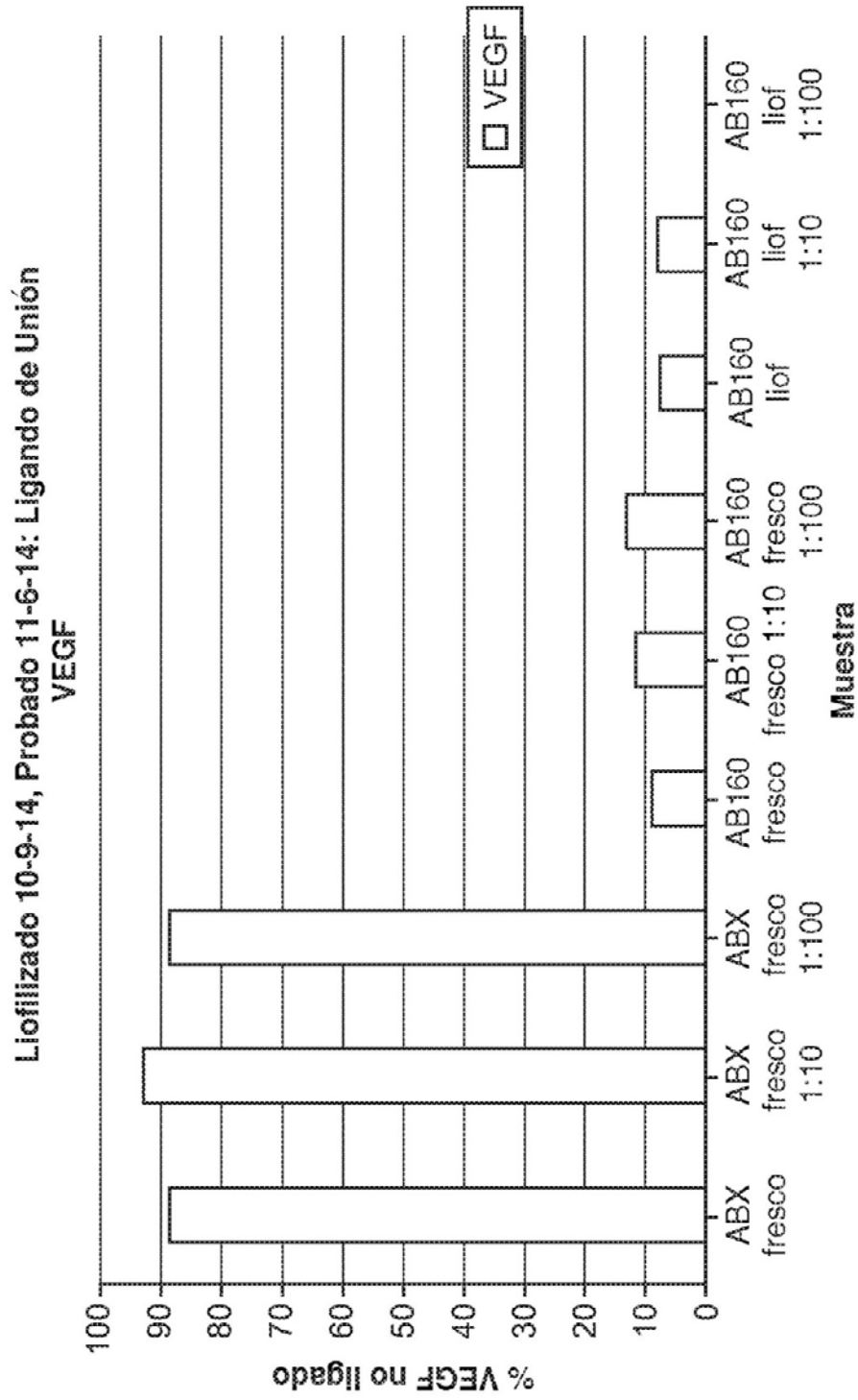


FIG. 8B

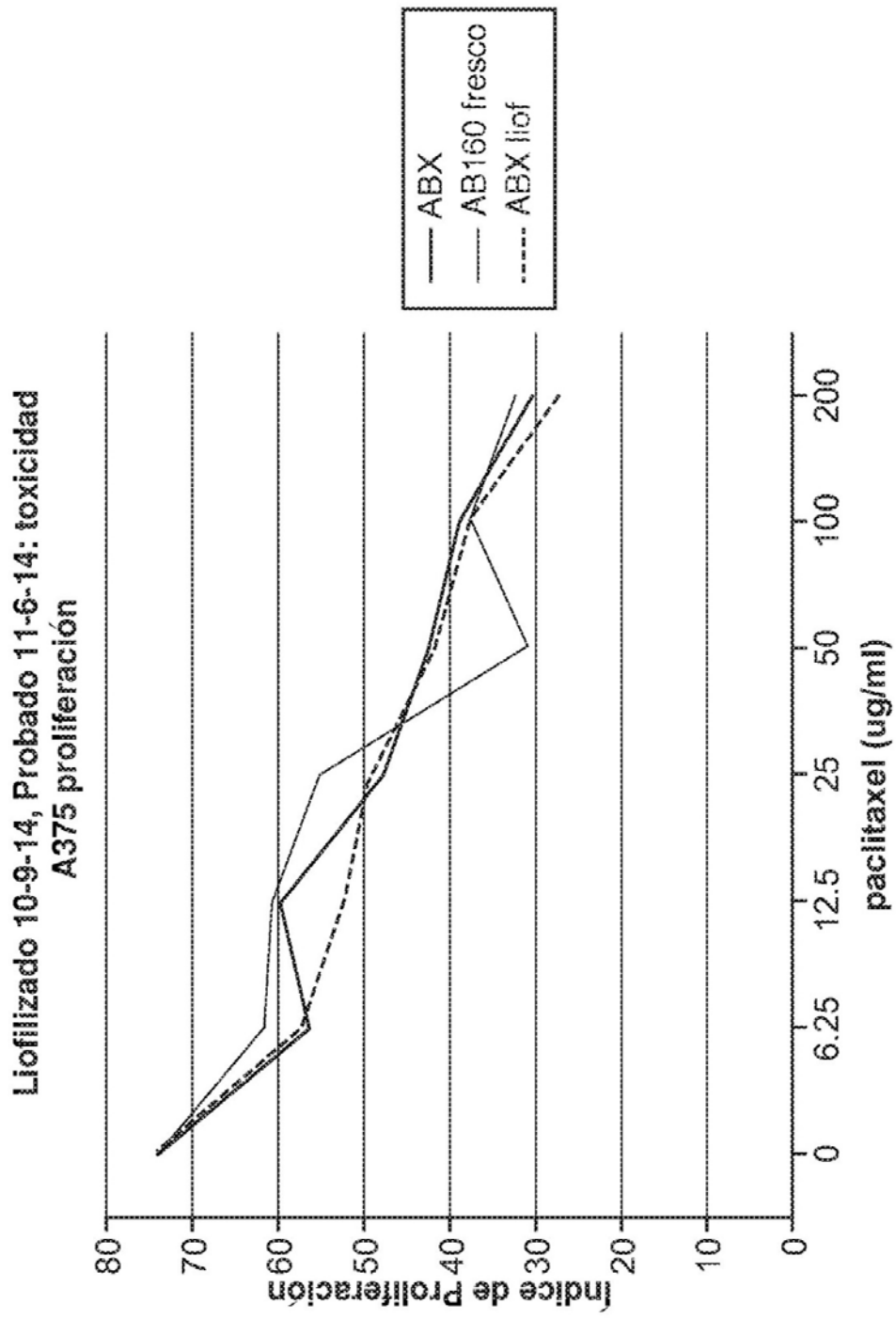


FIG. 8C

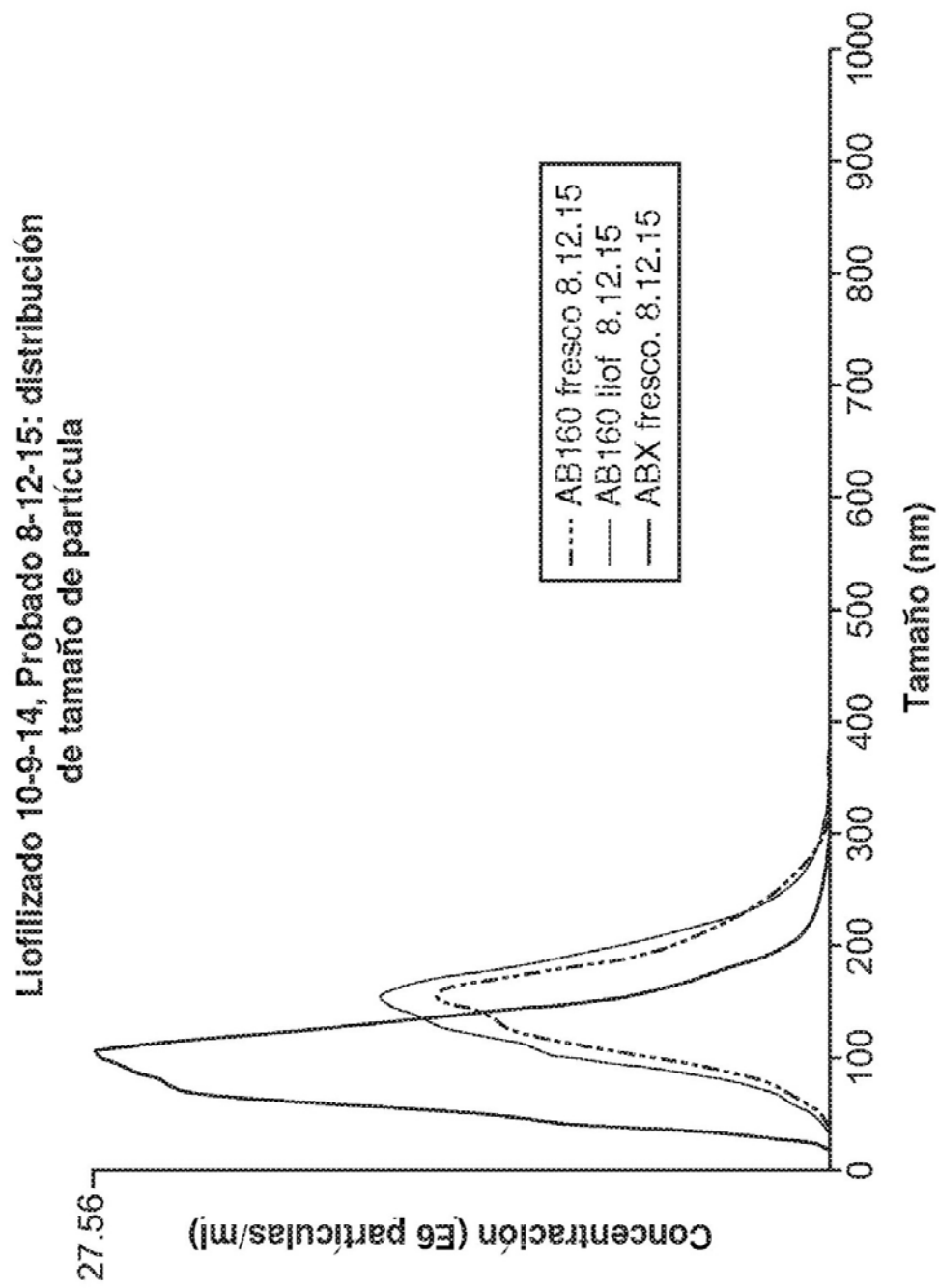


FIG. 8D

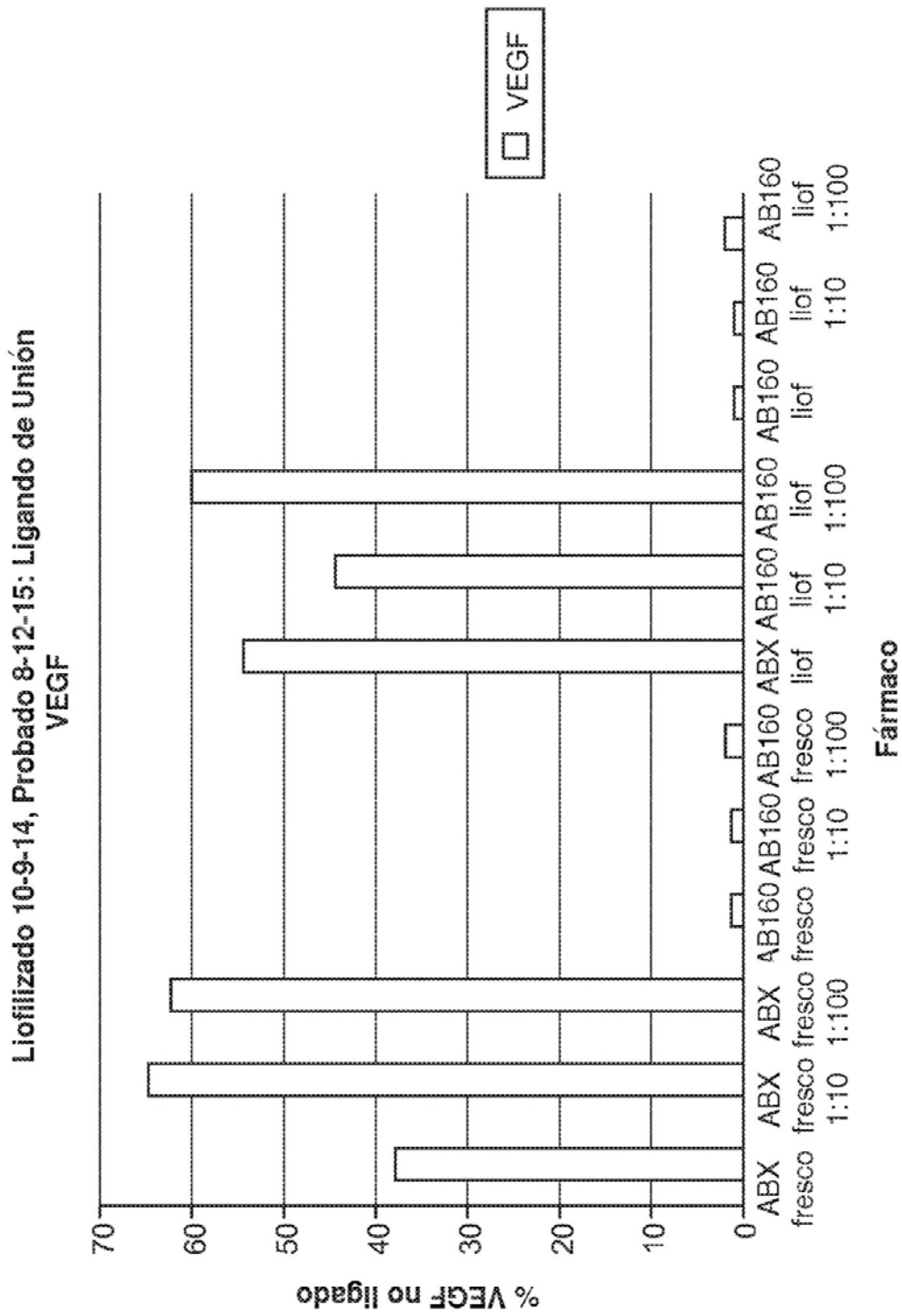


FIG. 8E

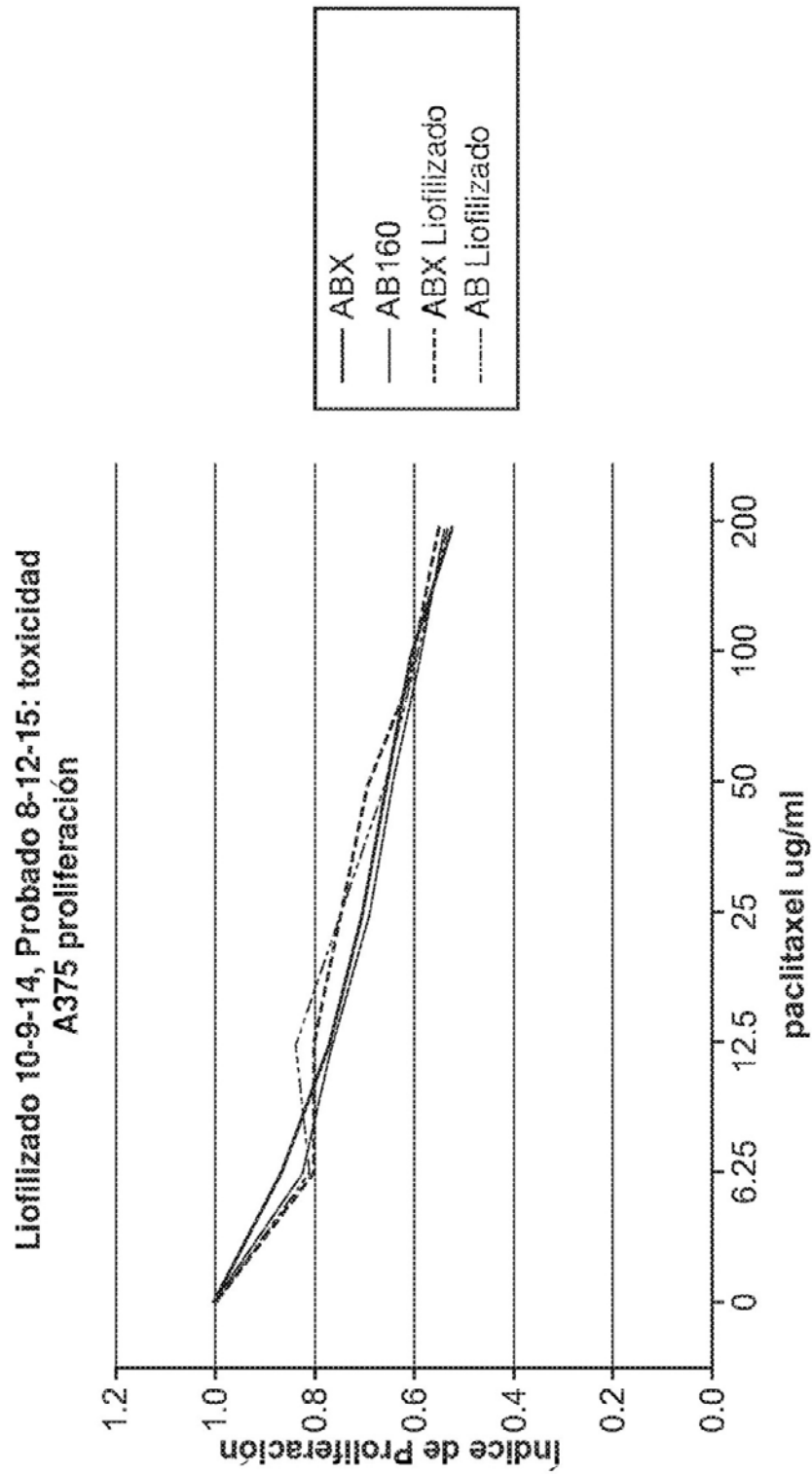


FIG. 8F

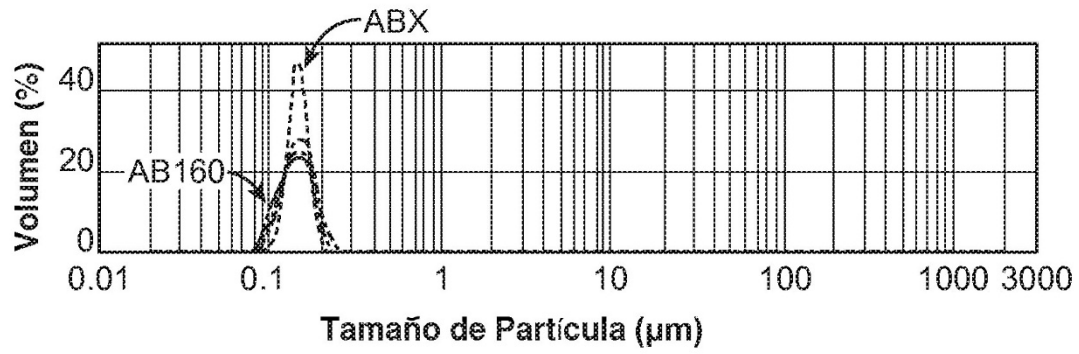


FIG. 9A

	d (0.1)	d (0.5)	d (0.9)
ABX	0.125	0.146	0.174
1 hora	0.108	0.144	0.193
2 horas	0.107	0.145	0.195
4 horas	0.113	0.146	0.187
6 horas	0.108	0.147	0.199
8 horas	0.114	0.147	0.189
24 horas	0.111	0.148	0.197

FIG. 9B

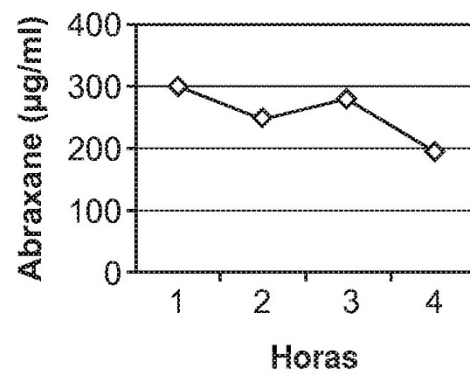


FIG. 9C

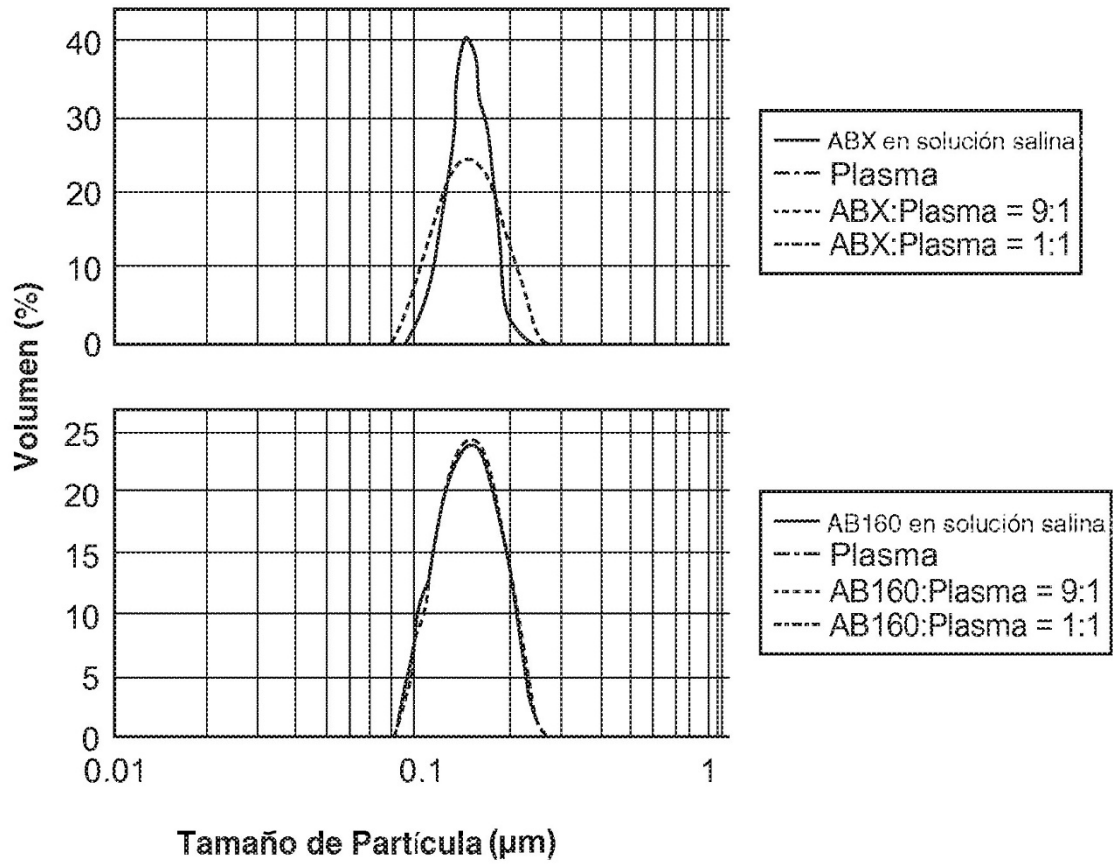


FIG. 10

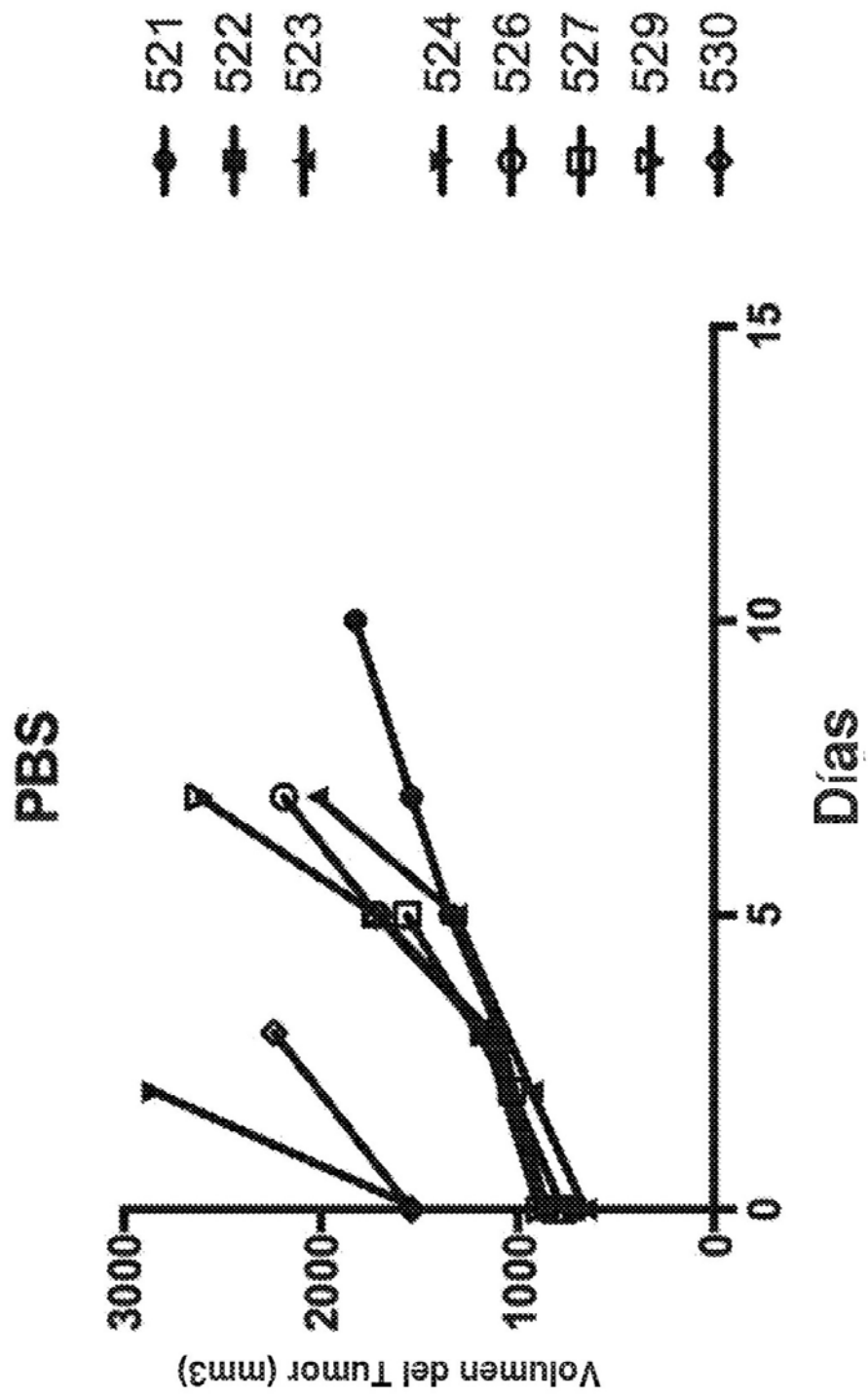


FIG. 11A

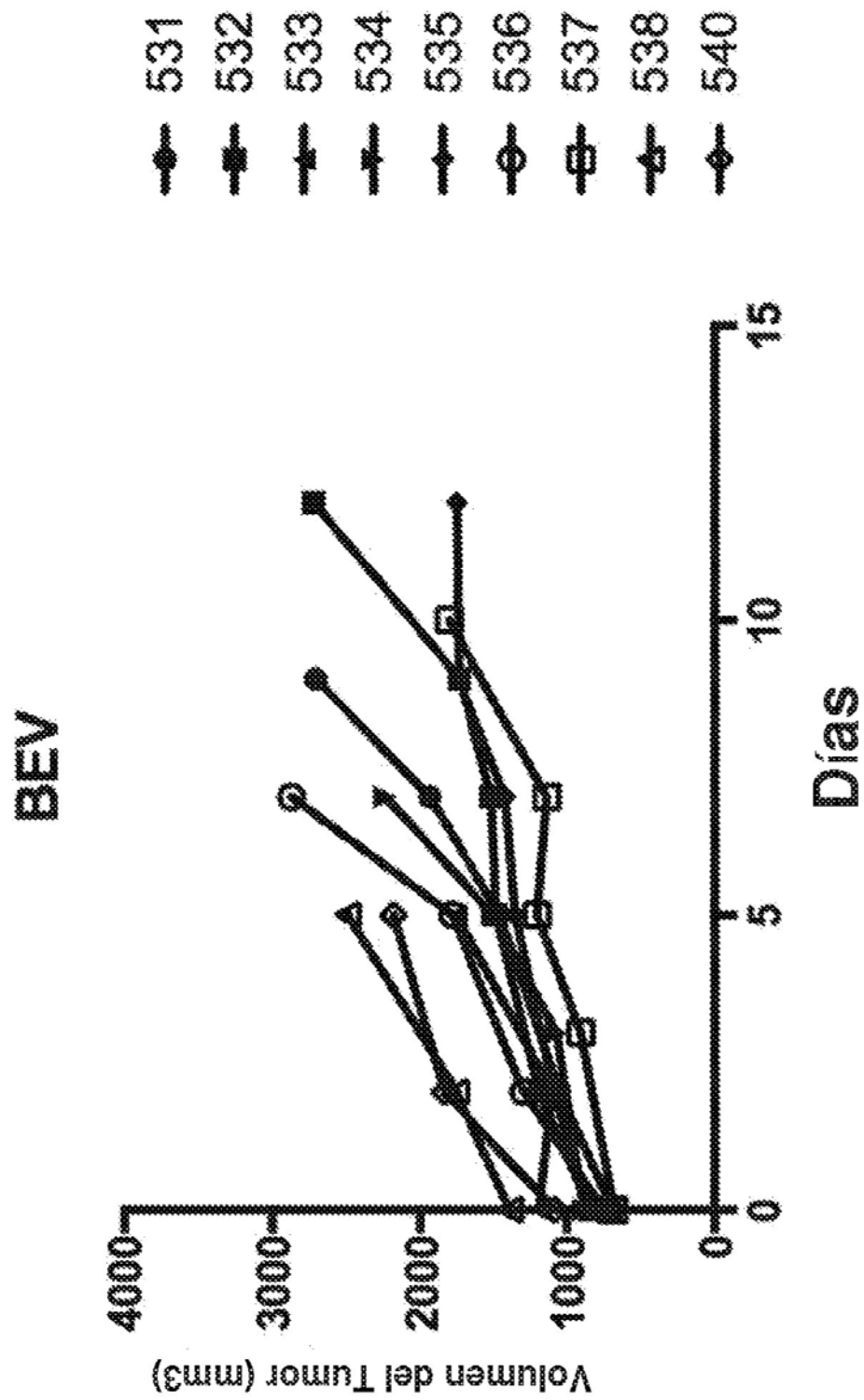


FIG. 11B

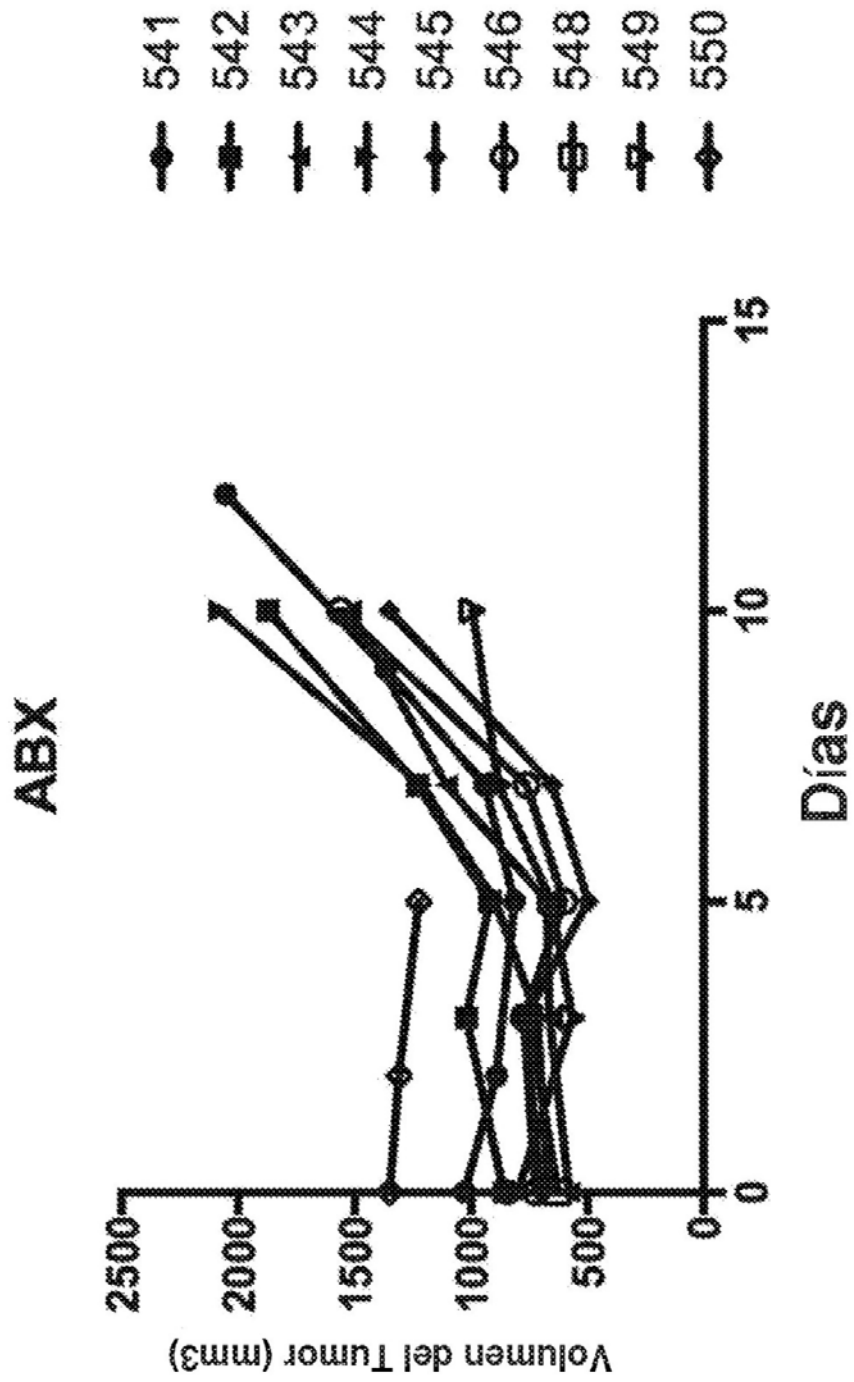


FIG. 11C

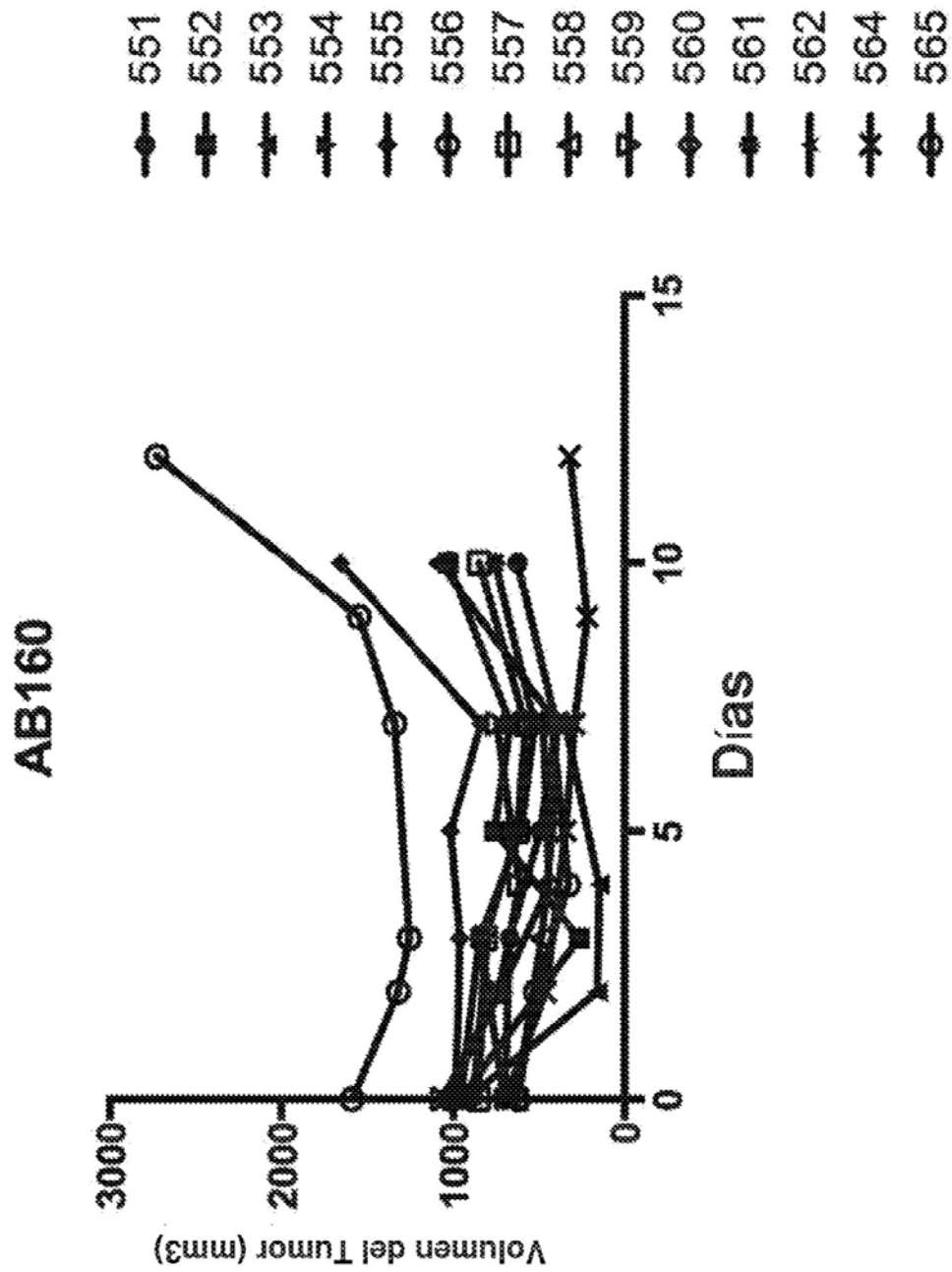


FIG. 11D

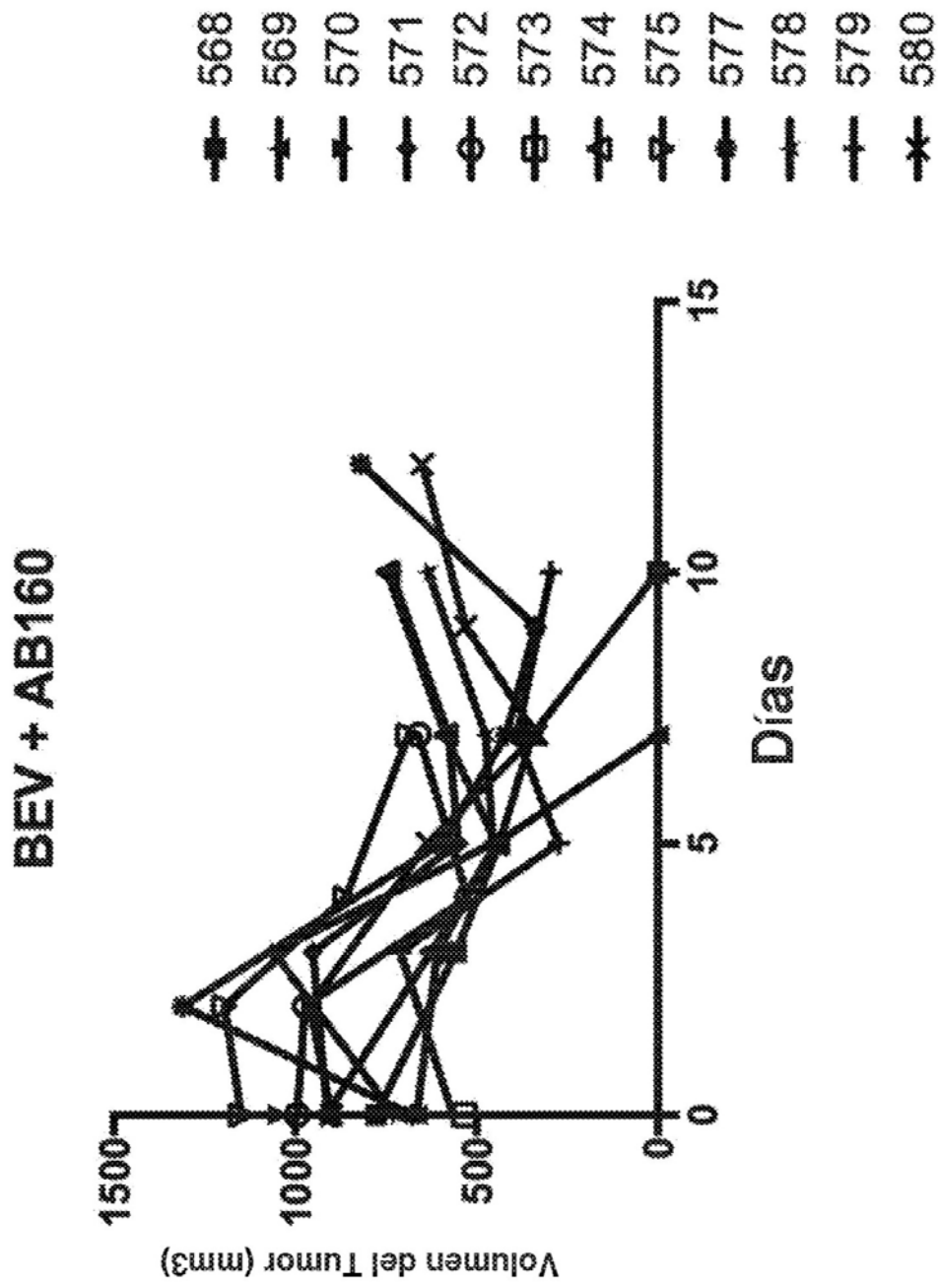
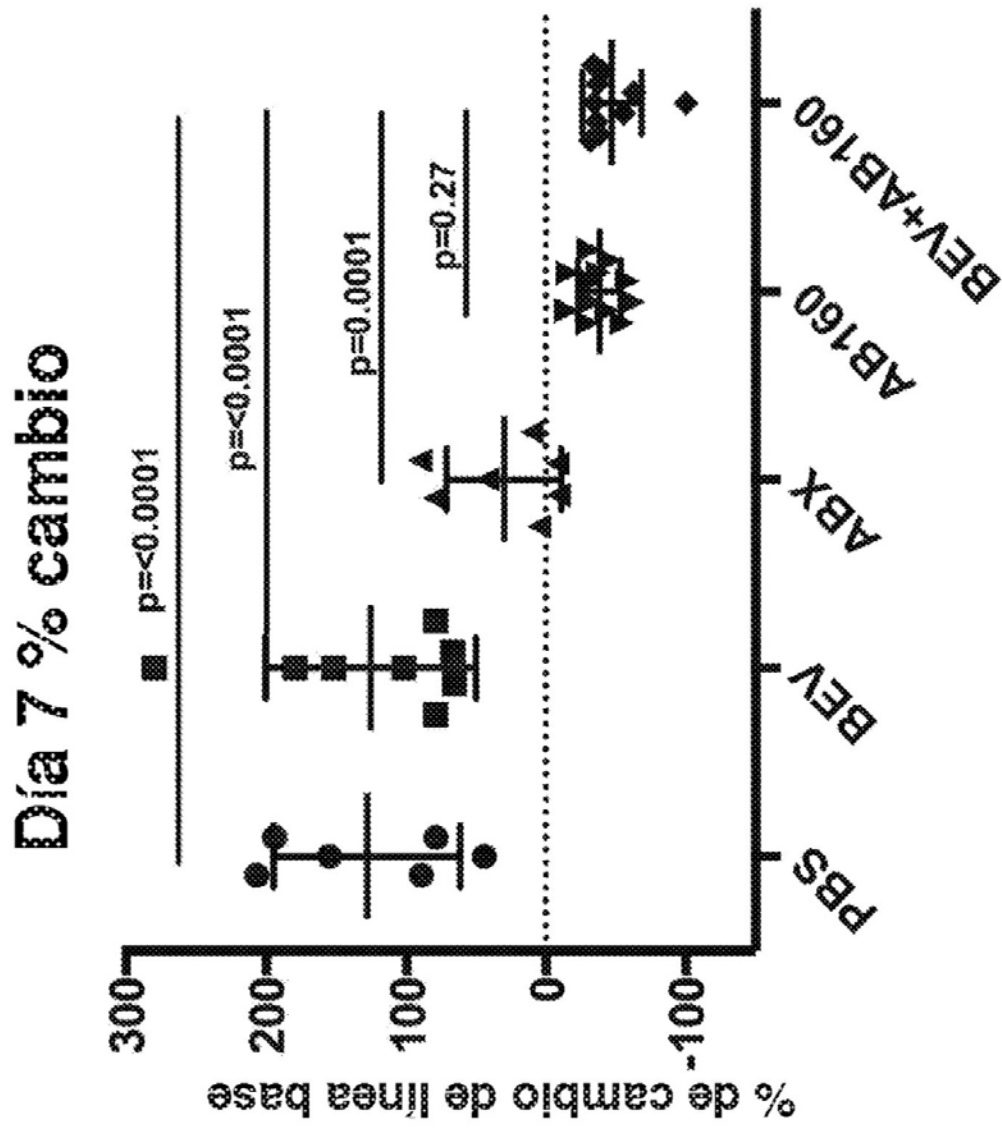


FIG. 11E



Grupo de Tratamiento

FIG. 11F

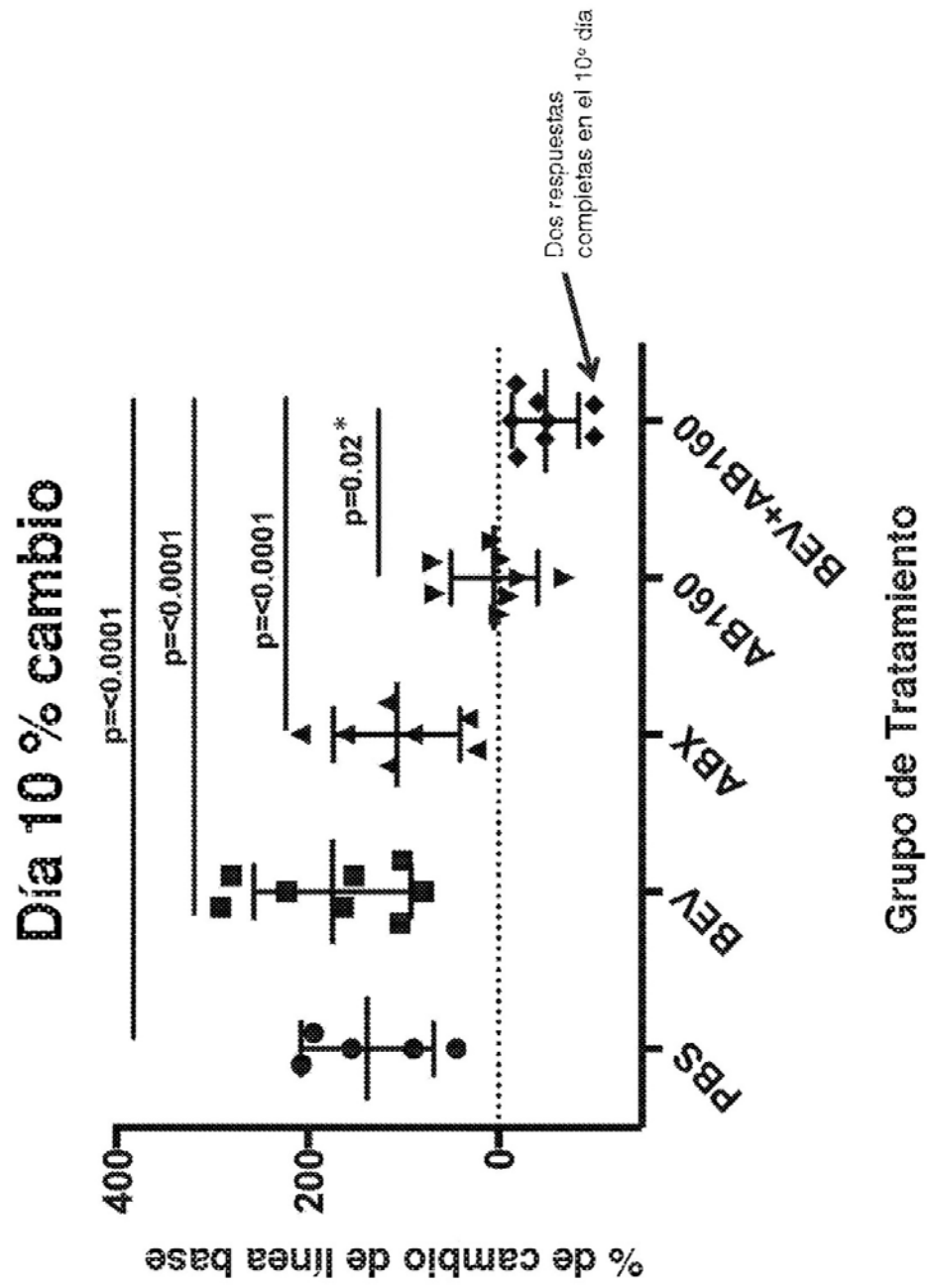


FIG. 11G