



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 267 741**

⑤1 Int. Cl.:  
**A61K 31/55** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **01918763 .2**  
⑧6 Fecha de presentación : **15.03.2001**  
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1263440**  
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **11.12.2002**

⑤4 Título: **Composiciones combinadas de alcaloides de cefalotaxina y de los mismos.**

③0 Prioridad: **15.03.2000 US 189699 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

⑦3 Titular/es: **ChemGenex Pharmaceuticals, Inc.**  
**3475 Edison Way, Suite M**  
**Menlo Park, California 94025, US**

⑦2 Inventor/es: **Brown, Dennis, M.**

⑦4 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

**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 combinadas de alcaloides de cefalotaxina y de los mismos.

5 **Campo de la invención**

El campo técnico de la presente invención es la utilización de alcaloides de cefalotaxina con agentes antiproliferativos para tratar un huésped con una enfermedad proliferativa celular.

10 **Antecedentes de la invención**

Existe un considerable interés en modular la eficacia de agentes antiproliferativos utilizados actualmente para incrementar las velocidades y la duración de los efectos antitumorales asociados con agentes antineoplásicos convencionales.

15 Los agentes antiproliferativos convencionales utilizados en el tratamiento del cáncer se agrupan de forma amplia como compuestos químicos que (1) afectan la integridad de polímeros de ácidos nucleicos mediante la unión, alquilación, inducción de la rotura de cadenas, intercalación entre pares de bases o acción sobre enzimas que mantienen la integridad y la función de ADN y ARN; (2) agentes químicos que se unen a proteínas para inhibir la acción enzimática (por ejemplo, antimetabolitos) o la función de proteínas estructurales necesarias para la integridad celular (por ejemplo, agentes antitubulina). Otros compuestos químicos que se han identificado que son útiles en el tratamiento de algunos cánceres se incluyen fármacos que bloquean la acción de las hormonas esteroides para el tratamiento de cáncer de mama y próstata, agentes activados fotoquímicamente, sensibilizadores de la radiación y protectores.

25 De especial interés para la presente invención son aquellos compuestos que afectan directamente a la integridad de la estructura genética de las células cancerígenas. Los polímeros de ácidos nucleicos, tales como ADN y ARN, son dianas principales para fármacos anticancerígenos. Los agentes alquilantes, tales como compuestos que contienen gas nitrógeno, nitrosoureas, aziridina atacan directamente el ADN. Los compuestos de coordinación metálicos, tales como 30 cisplatino y carboplatino, de forma similar atacan directamente la estructura de ácido nucleico dando lugar a lesiones que son difíciles de reparar para las células que, a su vez, pueden dar lugar a la muerte celular. Entre otros compuestos que afectan los ácidos nucleicos se incluyen moléculas de antraciclina, tales como doxorubicina, que se intercala entre los pares de bases de ácidos nucleicos de polímeros de ADN, bleomicina que provoca la rotura de las cadenas de ácido nucleico, y nucleósidos fraudulentos. Entre los nucleósidos fraudulentos se incluyen análogos de nucleósidos de 35 pirimidina y purina que se incorporan de forma inadecuada en las estructuras de polímeros de ácidos nucleicos y en último lugar provocan la terminación prematura de la cadena de ADN. Ciertas enzimas que afectan a la integridad y funcionalidad del genoma también se pueden inhibir en células cancerígenas mediante agentes químicos específicos y dan lugar a la muerte de las células cancerígenas. Entre éstos se incluyen enzimas que afectan a ribonucleótido reductasa (por ejemplo, hidroxiurea; gemcitabina), topoisomerasa I (por ejemplo, camptotecina) y topoisomerasa II 40 (por ejemplo, etopósido).

Uno de los fármacos anticancerígenos dirigidos al ADN más ampliamente utilizados es cisplatino (cis-diammin-dicloroplatino II, CDDP). Este compuesto es activo frente a varios cánceres humanos incluyendo cáncer testicular, de pulmón de células pequeñas, vejiga, cervical y cabeza y cuello.

45 A pesar de que se puede observar la actividad clínica de agentes antiproliferativos actualmente aprobados contra muchas formas de cáncer, aún se buscan mejoras en velocidades de respuesta en tumores, duración de respuesta y en último lugar la supervivencia del paciente. La presente invención demuestra la utilización novedosa de los alcaloides de cefalotaxina y análogos de los mismos, incluyendo homoharringtonina (HUT), que pueden potenciar los efectos antitumorales de los fármacos quimioterapéuticos, en particular, agentes que afectan la integridad de polímeros de 50 ácidos nucleicos, tales como ADN.

Visan *et al.* (Leucemia, 11; 624-628, 1997) da a conocer las combinaciones de homoharringtonina y citosina arabinosa (citabarina) o IFN- $\alpha$  en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica.

55 Yuzhu *et al.* (resumen EMBASE, No. Acceso: 1998384948, 1998) da a conocer las combinaciones de homoharringtonina y citosina arabinosa (citabarina) o aclarubicina en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica.

60 Laster *et al.* (resumen EMBASE, No. Acceso: 82182588, 1982) da a conocer las combinaciones de homoharringtonina 5-fluorouracilo en el tratamiento de la leucemia.

Zhang, *et al.* (Asia Pacific J. Pharma, 7:191-19, 1992) da a conocer la utilización de homoharringtonina en combinación con metotrexato y veraparamilo para inhibir el crecimiento de células de leucemia P388 o células tumorales en ascitis.

65

**Descripción resumida de la invención**

En un aspecto, la presente invención proporciona la utilización de una cefalotaxina y un agente antiproliferativo para la preparación de un medicamento para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor sólido, en el que la cefalotaxina proporciona un efecto quimiopotenciador.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas o medicamentos que comprenden una cefalotaxina y un agente antiproliferativo, en los que el agente antiproliferativo se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, camptotecina, vinblastina, etopósido, amonafida, colquicina o genisteína.

**Descripción detallada de las figuras**

La figura 1 representa la estructura general de un análogo de cefalotaxina. R1 y R2 representan grupos de sustitución. Se muestran las estructuras para R1 y R2 del análogo de cefalotaxina, Homoharringtonina.

La figura 2 representa la estructura del análogo de cefalotaxina, Homoharringtonina.

La figura 3 muestra el retraso en el crecimiento tumoral, como el volumen del tumor durante los días después del tratamiento con HHT, HHT seguido por CDDP o CDDP solo.

**Descripción detallada de la invención**

Se proporcionan utilizaciones médicas y composiciones para el tratamiento de un huésped con un tumor sólido. En las utilizaciones médicas de la presente invención, se administra una cefalotaxina farmacéuticamente aceptable, preferiblemente sistémicamente, conjuntamente con un agente antiproliferativo para mejorar los efectos anticancerígenos. La cefalotaxina proporciona un efecto quimiopotenciador.

Los agentes se proporcionan en cantidades suficientes para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor sólido. En una realización, el tratamiento del tumor sólido proporciona un incremento en el tiempo de cuádruplo del volumen del tumor (descrito a continuación). En otra realización, la modulación de una enfermedad comprende un efecto quimiosensibilizador. En otras realizaciones, la modulación de una enfermedad comprende la citostasis. En aún otras realizaciones, la modulación de una enfermedad comprende un efecto citotóxico.

Un agente químico es un “quimiopotenciador” cuando aumenta el efecto de un fármaco antiproliferativo conocido en una forma más que aditiva con respecto a la actividad del quimiopotenciador o el agente antiproliferativo utilizado solo. En algunos casos, se puede observar un efecto quimiosensibilizador. Esto se define como el efecto de utilización de un agente que si se utiliza solo no mostraría efectos antitumorales significativos pero mejoraría los efectos antitumorales de un agente antiproliferativo en comparación con la utilización del agente antiproliferativo por sí mismo.

Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “cefalotaxina” incluye todos los miembros de la familia química que incluye derivados de alcaloides de la aglaonema, *Cephalotaxus fortunei* y análogos de la misma. La familia de las cefalotaxinas se define mediante la estructura química como las estructuras anulares de la figura 1.

Un análogo de cefalotaxina se define adicionalmente pero no se limita a la estructura representada en la figura 1, teniendo sustituyentes o grupos sustituyentes en R1 y R2. Entre los ejemplos de R1 y/o R2 se incluyen ésteres, incluyendo harringtonina, isoharringtonina, homoharringtonina, desoxiharringtonina, acetilcefalotaxina, y similares. La Tabla 1 enumera estructuras de R1 y R2 para algunos de estos análogos. Las sustituciones R1 y R2 se utilizan habitualmente para mejorar la actividad biológica, características farmacéuticas, tales como la biodisponibilidad o la estabilidad, o el descenso de la toxicidad. En una realización, R1 y/o R2 incluyen sustituciones alquilo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, etc.). En otra realización, R1 y/o R2 incluyen ésteres (por ejemplo, metoxi, etoxi, butoxi, etc.). sin embargo, R1 y R2 no se limitan a los ejemplos anteriores en el alcance de la presente invención.

TABLA 1

|                    | R1                | R2  |
|--------------------|-------------------|---|
| isoharringtonina   | -OCH <sub>3</sub> | $  \begin{array}{c}  \text{OH} \quad \text{OH} \\    \quad   \\  \text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{C} - \text{CHCO}_2\text{CH}_3 \\    \\  \text{CO}_2^-  \end{array}  $                                   |
| harringtonina      | -OCH <sub>3</sub> | $  \begin{array}{c}  \text{OH} \quad \text{OH} \\    \quad   \\  \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C} - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3 \\    \quad   \\  \text{CH}_3 \quad \text{CO}_2^-  \end{array}  $ |
| acetilcefalotaxina | -OCH <sub>3</sub> | CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>  |
| homoharringtonina  | -OCH <sub>3</sub> | $  \begin{array}{c}  \text{OH} \quad \text{OH} \\    \quad   \\  \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{C} - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3 \\    \quad   \\  \text{CH}_3 \quad \text{CO}_2^-  \end{array}  $ |

Un análogo de cefalotaxina es un refinamiento químico adicional. Un ejemplo específico de un análogo de cefalotaxina es la homoharringtonina que es el éster butanodiocato de cefalotaxina, 4-metil-2-hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentil) (figura 2).

Tal y como se utiliza en la presente invención, los agentes antiproliferativos son compuestos que inducen a la citostasis o citotoxicidad. La "citostasis" es la inhibición del crecimiento de células mientras que la "citotoxicidad" se define como la matanza de células. Entre los ejemplos de agentes antiproliferativos se incluyen: antineoplásicos, tales como metotrexato, 5-fluorouracilo, gemcitabina, citarabina, pentostatina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, L-asparaginasa, hidroxiaurea, N-fosfonoacetil-L-aspartato (PALA), fludarabina, 2-clorodesoxiadenosina, y floxuridina; agentes de proteínas estructurales, tales como los alcaloides de vinca, incluyendo vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina paclitaxel, y colquicina; antibióticos, tales como dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, bleomicinas, plicamicina, y mitomicina; antagonistas de hormonas, tales como tamoxifeno y análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH); agentes que dañan el ácido nucleico, tales como los agentes alquilantes mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, dacarbacina, metilnitrosourea, semustina (metil-CCNU), clorozotocina, busulfan, procarbamina, melfalan, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), y tiotepa, los agentes intercalantes doxorubicina, dactinomicina, daurorubicina y mitoxantrona, los inhibidores de topoisomerasa etopósido, camptotecina y tenipósido, y complejos de coordinación metálicos cisplatino y carboplatino.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

#### Quimiopotenciación de cisplatino (CDDP) por homoharringtonina (HHT)

Se desarrollaron intradérmicamente en matraces fibrosarcomas murinos experimentales transplantables (2x10<sup>5</sup> células RIF-1) de ratones C3H hembras de 3 meses de vida (Charles River, Holister, CA). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, los ratones se asignaron aleatoriamente a cada grupo experimental (4 ratones por grupo).

## ES 2 267 741 T3

Las composiciones experimentales se prepararon según se describe en la Tabla 2.

TABLA 2

| Agente            | Dosis   | Disolvente          | Suministrador   |
|-------------------|---------|---------------------|-----------------|
| Homoharringtonina | 2 mg/kg | DMSO                | NCI             |
| Cisplatino        | 4 mg/kg | Agua para inyección | David Bull Labs |

El quimiopotenciador, homoharringtonina, se obtuvo de NCI y se ajustó a la concentración apropiada en DMSO. El cisplatino (David Bull Laboratorios-Mulgrave, Australia, lote 5201844x) se ajustó a la concentración apropiada en agua para la inyección. Las composiciones se inyectaron sistémicamente (es decir, intraperitonealmente, i.p.) en un volumen de 100 microlitros. Para el tratamiento del grupo 3, el quimiopotenciador, homoharringtonina, se inyectó 30 minutos antes de la inyección de cisplatino. Después del tratamiento, el crecimiento de los tumores se controló tres veces por semana mediante mediciones con calibrador de tres diámetros perpendiculares del tumor y el cálculo del volumen del tumor a partir de la fórmula:

$$V = \pi / 6 \times D_1 \times D_2 \times D_3,$$

en la que  $D_{1-3}$  está en mm.

Se hizo un seguimiento de los tumores hasta que alcanzaron un tamaño de cuatro veces el volumen en el día cero del tratamiento (TVQT) o hasta 30 días después del tratamiento, lo que venga primero. Los datos se expresan como el promedio del “tiempo de cuadruplicado del volumen del tumor” (TVQT) y como el “retraso”. El TVQT promedio son los días promedio necesarios para que un tumor crezca cuatro veces el volumen del tumor en el día inicial de tratamiento. El “retraso” es la mediana de días necesarios para que un tumor crezca cuatro veces el tamaño promedio del grupo tratado, menos la mediana de días necesarios para que un tumor crezca cuatro veces el tamaño promedio del grupo de control. Los datos se expresan también como la proporción del tiempo de cuadruplicado del volumen del tumor del tumor tratado sobre el grupo de control no tratado (TVQT/CTVQT). Los valores ascendentes de esta proporción indican una mayor respuesta antitumoral.

Los datos se presentan en la Tabla 3 siguiente y en la figura 3.

TABLA 3

| Grupo  | Tratamiento                       | Dosis (mg/kg) | TVQT<br>media $\pm$ S.E. | TVQT/CTVQT | Mediana (TVQT) | Retraso<br>(días) |
|--|-----------------------------------|---------------|--------------------------|------------|----------------|-------------------|
| 1  | Control no tratado                | -             | 8,3 $\pm$ 0,4            | 1,0        | 8,6            | 0,00              |
| 2  | Homoharringtonina                 | 2             | 10,1 $\pm$ 0,4           | 1,2        | 9,8            | 1,20              |
| 3  | Homoharringtonina<br>→ cisplatino | 2 → 4         | 14,9 $\pm$ 0,8           | 1,8        | 14,8           | 6,17              |
| 4  | Cisplatino                        | 4             | 12,9 $\pm$ 1,1           | 1,5        | 12,5           | 3,83              |
| La flecha (→) en el grupo 3 indica la administración 30 minutos después de la administración de homoharringtonina. |                                   |               |                          |            |                |                   |

Los resultados de la Tabla 3 indican que se aumenta la actividad antiproliferativa de cisplatino mediante la utilización del quimiopotenciador, homoharringtonina, en que se observó más que un efecto aditivo cuando ambos compuestos se utilizaron para tratar los ratones con tumores (grupo 3) en comparación con la utilización de cisplatino solo (grupo 4) o homoharringtonina sola (grupo 2).

## Ejemplo 2

*Efecto de la homoharringtonina, sola y combinada con otros productos quimioterapéuticos en el crecimiento del tumor RIF-1 en ratones C3H*

El modelo de tumor de fibrosarcoma murino RIF-1 se utilizó para evaluar la actividad antitumoral de homoharringtonina, sola y combinada con varios agentes antiproliferativos. Entre los agentes antiproliferativos utilizados se incluyen aquéllos que afectan a la integridad del ácido nucleico (por ejemplo, ADN) (por ejemplo, cisplatino, citarabina, camptotecina, etopósido, 5-fluorouracilo, o amonafida), agentes que afectan a las proteínas estructurales (por ejemplo, paclitaxel, vinblastina, o colquicina) o enzimas citoplasmáticos (por ejemplo, genisteína).

La homoharringtonina (HHT-NCI) se adquirió de NCI como un polvo. La homoharringtonina (HHT-Clin) se adquirió de Hangzhou Minsheng Pharmaceutical Group (Hangzhou, China), en viales de 1 ml, prediluidos con agua hasta 1 mg/ml. El cisplatino para la inyección, USP, se adquirió de David Bull Labs (Mulgrave, Australia), Lote No. 5201844x, como un polvo liofilizado. El paclitaxel se adquirió de Bristol Myers Squibb Co. (Princeton, NJ) Lote No. 9J16241, exp. Sep. 2001, prediluido hasta 6 mg/ml en Cremaphor/EL. La citarabina se adquirió de Bedford Labs (Bedford, OH), Lote No. 86968A, exp. 6/02, como un polvo liofilizado. La camptotecina se adquirió de Boehringer-Ingelheim, Lote No. 142088, como un polvo. La vinblastina se adquirió de Bedford Labs (Bedford, OH), Lote No. 112647, como un polvo liofilizado. El etopósido se adquirió de Pharmacia (Kalamazoo, MI), Lote No. ETA013, exp. 5/99, como líquido prediluido hasta 20 mg/ml. El 5-fluorouracilo se adquirió de Pharmacia (Kalamazoo, MI), Lote No. FFA191, exp. 7/00, como líquido prediluido hasta 50 mg/ml. La amonafida se adquirió de Penta Biotech (Union City, CA), Lote No. 039-01, como un polvo.

La colquicina se adquirió de Sigma (St. Luis, MO), Lote no. 55H55H0685, como un polvo. La genisteína se adquirió de ChemCon GMBH (Freiburg i. Br.), Lote No. CC-6700-26, como un polvo. El DMSO se adquirió de Sigma (St. Luis, MO), Lote no. 80K3695 cloruro sódico al 0,9% para inyección, USP (solución salina) se fabricó mediante Abbot Laboratories (Lote No. 55-199-DK). El agua estéril para inyección, USP (WFI) se fabricó mediante Lyphomed, Inc. (Lote No. 390849).

*Formulaciones:* Las preparaciones de prueba (grupos de tratamiento) se resumen en la Tabla 4.

Para la preparación de formulaciones 1-4, HHT-NCI se pesó en viales y se disolvió en DMSO en las concentraciones indicadas.

Para la formulación 5, el contenido de un vial de 10 mg de CDP liofilizado (cisplatino para inyección) se resuspendió con 10 ml de WFI para producir una suspensión de CCDP de 1 mg/ml.

Para la formulación 6, paclitaxel, prediluido en Cremaphor/EL y alcohol deshidratado hasta 6 mg/ml se diluyó adicionalmente hasta 3,3 mg/ml con WFI.

Para las formulaciones 7 y 8 se prepararon mediante dilución adicional de HHT-Clin hasta las concentraciones indicadas con WFI. La formulación 9 era HHT-Clin no diluida, se utilizó tal y como se recibió.

La formulación 10 se preparó añadiendo 1 ml de WFI a 100 mg de citarabina como polvo liofilizado.

La formulación 11 se preparó añadiendo DMSO a camptotecina a una concentración de 1 mg/ml.

La formulación 12 se fabricó adicionando cloruro sódico al 0,9% para inyección a un vial de 10 mg de polvo liofilizado de vinblastina.

Las formulaciones 13-17 se prepararon diluyendo la cantidad apropiada de cada agente de prueba en solución salina (13- 2,5 mg/ml etopósido, 14- 7,5 mg/ml 5-fluorouracilo, 15- 7,5 mg/ml amonafida, 16- 2,5 mg/ml colquicina, 17- 3,75 mg/ml 5-fluorouracilo).

La formulación 18 se preparó diluyendo 15 mg de genisteína en 1 ml de DMSO.

*Animales:* Para el estudio se utilizaron ratones C3H hembras (Charles River Laboratories, Holister, CA), de aproximadamente 3 meses de vida. El peso del cuerpo promedio era de aproximadamente 25 g. Los animales se mantuvieron en jaulas aisladas en un ciclo de 12 horas de luz y 2 horas de oscuridad. La comida y el agua estaban disponibles *ad libitum*.

*Tumores:* La línea de células de fibrosarcoma murina RIF-1 se mantuvo en un cultivo *in vitro* (medio Waymouth suplementado con un 20% de suero bovino fetal) a 37°C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%. Las células RIF-1 en fase log se tripsinizaron y se recogieron de los matraces de cultivo celular para proporcionar una concentración de 4 x 10<sup>6</sup> células/ml, a continuación se inyectaron intradérmicamente en un volumen de 50 µl (equivalente a 2 x 10<sup>5</sup> células por inyección) en ambos matraces de cada ratón. Nueve días después, cuando los tumores alcanzaron aproximadamente un volumen de 100 mm<sup>3</sup>, los animales se pusieron aleatoriamente en diferentes grupos de tratamiento.

*Grupos de tratamiento:* Los grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 4. De cuatro a cinco animales se asignaron a cada grupo de tratamiento. El volumen de inyección intraperitoneal fue de 100  $\mu$ l. Las inyecciones intratumorales (50  $\mu$ l) se aplicaron en uno de los dos tumores en cada animal utilizando el tumor contralateral como control no tratado. El volumen de administración oral fue de 100  $\mu$ l. Los tratamientos combinados que utilizan dos agentes de prueba se administraron como dos inyecciones separadas, con la segunda inmediatamente después de la primera o después de 30 minutos.

*Evaluación del tiempo de cuádruplicado del volumen del tumor:* Los tumores se midieron tres veces por semana durante hasta 22 días con calibradores Vernier. El volumen del tumor (milímetros cúbicos, mm<sup>3</sup>) se calculó según la fórmula:

$$V = \pi / 6 \times D_1 \times D_2 \times D_3,$$

en la que  $D_{1-3}$  son diámetros perpendiculares medidos en milímetros (mm).

El tiempo de cuádruplicado del volumen del tumor (TVQT), definido como el tiempo requerido para que un tumor crezca cuatro veces su volumen inicial (en el tiempo del tratamiento), se utilizó como punto final del estudio. El TVQT se determinó para cada grupo de tratamiento y se expresó en días como la media  $\pm$  error estándar (SE).

La actividad antitumoral o la modulación del crecimiento tumoral (medida el crecimiento tumoral retrasado, es decir, incrementos en los valores de TVQT) por homoharringtonina administrada como un único agente o combinado con otros productos quimioterapéuticos se presenta en la Tabla 5.

En este estudio se incluyen los resultados de ocho experimentos separados. En el experimento E010, los tumores en animales de control no tratados cuádruplicaron su tamaño en un promedio de 7,2 días. La administración intraperitoneal de homoharringtonina de NCI a 5 mg/kg tuvo un TVQT de 14,5 días y la administración intratumoral de homoharringtonina a esa dosis dio lugar a un TVQT de 15,6 días.

En el experimento E011, los tumores de animales de control no tratados cuádruplicaron su tamaño en un promedio de 8,3 días, mientras que la administración intraperitoneal de homoharringtonina de NCI a 2 mg/kg extendió el TVQT promedio hasta 10,1 días, y la administración intraperitoneal adicional de CDDP extendió adicionalmente el TVQT promedio hasta 14,9 días. Mientras que el paclitaxel (10 mg/kg), solo, mostró un TVQT de 8,8 días, la adición de homoharringtonina (2 mg/kg) no cambió el TVQT, convirtiendo el paclitaxel en el único agente con actividad combinatoria inferior a las de la homoharringtonina sola.

La homoharringtonina de Hangzhou Minsheng Pharmaceutical Group (Hangzhou, China), formulada en agua estéril a 2 mg/kg o 4 mg/kg, se utilizó para el resto de estudios de combinación.

A 2 mg/kg, la homoharringtonina tuvo un TVQT promedio de 10,4 días en E026 mientras que los controles no tratados se cuádruplicaron en 7,4 días. La administración combinada de cisplatino (4 mg/kg) con homoharringtonina (2 mg/kg) produjo un TVQT de 11,1 días, que era mayor que la homoharringtonina (TVQT = 10,4 días) o cisplatino (TVQT = 9,4 días), solos.

En el experimento E030, en el que los controles no tratados se cuádruplicaron en 6,7 días, el tratamiento con homoharringtonina (2 mg/kg) produjo un TVQT de 7,9 días y camptotecina o citarabina produjo TVQTs de 9,4 ó 7,6 días, respectivamente. La administración combinada de homoharringtonina (2 mg/kg) con camptotecina (6 mg/kg) o citarabina (400 mg/kg) aumentó los TVQTs hasta 10,1 y 8,6 días, respectivamente.

En E032, en el que los controles no tratados se cuádruplicaron en 6,5 días, la homoharringtonina a 4 mg/kg tuvo un TVQT promedio de 8,5 días. La administración de homoharringtonina (4 mg/kg) combinada con 5-fluorouracilo (30 mg/kg) dio lugar a un TVQT de 17,9 días frente a los 13,6 días para 5-fluorouracilo solo. La administración combinada de homoharringtonina (4 mg/kg) y vinblastina (2 mg/kg) produjo un TVQT de 10,9 días frente a los 8,6 días para vinblastina sola. La administración combinada de homoharringtonina (4 mg/kg) y cisplatino (4 mg/kg) o amonafida (30 mg/kg) produjo TVQTs de 10,4 y 10,2 días, respectivamente, frente a los 9,9 y 7,6 días para dichos agentes solos. La homoharringtonina combinada con etopósido (10 mg/kg) produjo un TVQT de 8,7 días mientras que para el etopósido solo fue de 8,5 días.

La colquicina administrada de forma oral (10 mg/kg), en E033, produjo un TVQT de 6,3 días, mientras que los controles no tratados y la homoharringtonina (4 mg/kg) produjeron TVQTs de 7,8 y 8,3 días. La homoharringtonina combinada con colquicina a estas dosis aumentó el TVQT hasta 9,4 días.

En E036, la genisteína (60 mg/kg) combinada con homoharringtonina (4 mg/kg) tuvo un TVQT de 9,2 días, que era superior al de genisteína sola (7,1 días).

Se produjo la muerte de animales en algunos grupos que se registraron tal y como se indica a continuación. Tres de cuatro ratones murieron tras el tratamiento de homoharringtonina adquirida de NCI y se formuló en DMSO a 1,25 mg/ml. Dos de cinco ratones murieron después de recibir esta formulación intratumoralmente. Cuatro de cuatro ratones murieron tras el tratamiento de esta misma homoharringtonina formulada a 2,5 mg/ml en DMSO. La combinación

de homoharringtonina (0,5 mg/ml) en DMSO con paclitaxel (2,5 mg/ml) fue letal para dos de cuatro ratones, y la combinación de homoharringtonina (0,5 mg/ml) en DMSO con cisplatino (1 mg/ml) fue letal para uno de cuatro ratones. La combinación de homoharringtonina (1 mg/ml) con vinblastina (0,5 mg/ml) fue letal para uno de cuatro ratones a los que se les administró el tratamiento, y la combinación de homoharringtonina (1 mg/ml) y genisteína (15 mg/ml) fue letal para dos de cinco ratones.

En resumen, la administración intraperitoneal de homoharringtonina tenía actividad antitumoral, es decir, modulaba el crecimiento tumoral en el modelo de tumor de fibrosarcoma murino RIF-1. La administración intraperitoneal de homoharringtonina combinada con cisplatino, citarabina, camptotecina, vinblastina, etopósido, 5-fluorouracilo, amonafida, colquicina y genisteína tenía niveles de actividad antitumoral superiores a las de la homoharringtonina sola o de los agentes de prueba individuales. La mejor actividad combinada utilizó 5-fluorouracilo, amonafida y vinblastina. La homoharringtonina combinada con paclitaxel tenía una actividad antitumoral inferior a la de la homoharringtonina sola. La homoharringtonina adquirida de NCI y formulada en DMSO mostró cierta toxicidad letal mientras que la homoharringtonina adquirida de Hangzhou Minsheng Pharmaceutical Group (Hangzhou, China) y se formuló en agua estéril para utilizar en humanos no mostró toxicidad letal a las dosis utilizadas.

TABLA 4

*Resumen de los grupos de tratamiento*

| Formulación | Tratamiento                           | Concentración<br>(mg/ml) | Vía de<br>administración | Volumen<br>de<br>inyección<br>(μl) |
|-------------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| 1           | HHT-NCI en DMSO                       | 1,25                     | IP                       | 100                                |
| 2           | HHT-NCI en DMSO                       | 2,5                      | IP                       | 100                                |
| 3           | HHT-NCI en DMSO                       | 2,5                      | IT                       | 100                                |
| 4           | HHT-NCI en DMSO                       | 0,5                      | IP                       | 100                                |
| 5           | CDDP en WFI                           | 1                        | IP                       | 100                                |
| 6           | Paclitaxel en WFI                     | 2,5                      | IP                       | 100                                |
| 7           | HHT-Clin en WFI                       | 0,5                      | IP                       | 100                                |
| 8           | HHT-Clin en WFI                       | 0,25                     | IP                       | 100                                |
| 9           | HHT-Clin en WFI                       | 1                        | IP                       | 100                                |
| 10          | Citarabina en WFI                     | 100                      | IP                       | 100                                |
| 11          | Camptotecina en<br>DMSO               | 2,5                      | IP                       | 100                                |
| 12          | Vinblastina en<br>solución salina     | 0,5                      | IP                       | 100                                |
| 13          | Etopósido en<br>solución salina       | 2,5                      | IP                       | 100                                |
| 14          | 5-fluorouracilo en<br>solución salina | 7,5                      | IP                       | 100                                |
| 15          | Amonafida en<br>solución salina       | 7,5                      | IP                       | 100                                |
| 16          | Colquicina en<br>solución salina      | 2,5                      | IP                       | 100                                |
| 17          | 5-fluorouracilo en<br>solución salina | 3,75                     | IP                       | 100                                |
| 18          | Genisteína en DMSO                    | 15                       | IP                       | 100                                |



# ES 2 267 741 T3

TABLA 5

*Efecto de la homoharringtonina y homoharringtonina combinada con otros productos quimioterapéuticos en el crecimiento del tumor RIF-1 en ratones C3H*

| Experimento# | Formulación | Tratamiento             | # de tumores | TVQT (días)<br>(media $\pm$ SE) |
|--------------|-------------|-------------------------|--------------|---------------------------------|
| E010         | -           | Control no tratado      | 8            | 7,2 $\pm$ 0,1                   |
| E010         | 1           | HHT-NCI (5 mg/kg)       | 2*           | 14,5 $\pm$ 0,9                  |
| E010         | 2           | HHT-NCI (10 mg/kg)      | 0*           | Todos murieron                  |
| E010         | 3           | HHT-NCI (5 mg/kg)       | 3*           | 15,6 $\pm$ 1,8                  |
| E011         | -           | Control no tratado      | 8            | 8,3 $\pm$ 0,4                   |
| E011         | 4           | HHT-NCI (2 mg/kg)       | 8            | 10,1 $\pm$ 0,4                  |
| E011         | 5           | CDDP (4 mg/kg)          | 8            | 12,9 $\pm$ 1,1                  |
| E011         | 4,5         | HHT-NCI-30'-CDDP        | 6*           | 14,9 $\pm$ 0,8                  |
| E011         | 6           | Paclitaxel (10 mg/kg)   | 8            | 8,8 $\pm$ 0,4                   |
| E011         | 4,6         | HHT-30'-Paclitaxel      | 4*           | 8,8 $\pm$ 0,4                   |
| E026         | -           | Control no tratado      | 8            | 7,4 $\pm$ 0,3                   |
| E026         | 7           | HHT-Clin (2 mg/kg)      | 8            | 10,4 $\pm$ 1,0                  |
| E026         | 5           | CDDP (4 mg/kg)          | 8            | 9,4 $\pm$ 0,5                   |
| E026         | 7,5         | HHT-Clin + CDDP         | 8            | 11,1 $\pm$ 0,4                  |
| E026         | 7,5         | HHT-Clin-30'-CDDP       | 8            | 10,1 $\pm$ 0,4                  |
| E028         | -           | Control no tratado      | 8            | 8,7 $\pm$ 0,5                   |
| E028         | 8           | HHT-Clin (1 mg/kg)      | 8            | 9,2 $\pm$ 0,7                   |
| E028         | 9           | HHT-Clin (4 mg/kg)      | 8            | 10,1 $\pm$ 0,4                  |
| E030         | -           | Control no tratado      | 8            | 6,7 $\pm$ 0,4                   |
| E030         | 7           | HHT-Clin (2 mg/kg)      | 8            | 7,9 $\pm$ 0,3                   |
| E030         | 10          | Citarabina (400 mg/kg)  | 8            | 7,6 $\pm$ 0,2                   |
| E030         | 7,10        | HHT-Clin + citarabina   | 8            | 8,6 $\pm$ 0,4                   |
| E030         | 11          | Camptotecina (6 mg/kg)  | 8            | 9,4 $\pm$ 0,4                   |
| E030         | 7,11        | HHT-Clin + Camptotecina | 8            | 10,1 $\pm$ 0,6                  |
| E032         | -           | Control no tratado      | 8            | 6,5 $\pm$ 0,6                   |
| E032         | 9           | HHT-Clin (4 mg/kg)      | 8            | 8,5 $\pm$ 0,5                   |
| E032         | 5           | CDDP (4 mg/kg)          | 8            | 9,9 $\pm$ 0,6                   |
| E032         | 9,5         | HHT-Clin + CDDP         | 8            | 10,4 $\pm$ 0,4                  |
| E032         | 12          | Vinblastina (2 mg/kg)   | 8            | 8,6 $\pm$ 0,4                   |
| E032         | 9,12        | HHT-Clin + Vinblastina  | 6*           | 10,9 $\pm$ 0,4                  |
| E032         | 13          | Etopósido (10 mg/kg)    | 8            | 8,5 $\pm$ 1,0                   |
| E032         | 9,13        | HHT-Clin +              | 8            | 8,7 $\pm$ 0,5                   |

## ES 2 267 741 T3

|      |      |                                |    |            |
|------|------|--------------------------------|----|------------|
|      |      | Etopósido                      |    |            |
| E032 | 14   | 5-fluorouracilo<br>(30 mg/kg)  | 8  | 13,6 ± 1,9 |
| E032 | 9,14 | HHT-Clin + 5-<br>fluorouracilo | 8  | 17,9 ± 0,7 |
| E032 | 15   | Amonafida (30<br>mg/kg)        | 8  | 7,6 ± 0,4  |
| E032 | 9,15 | HHT-Clin +<br>Amonafida        | 8  | 10,2 ± 0,5 |
| E033 | -    | Control no tratado             | 8  | 7,8 ± 0,6  |
| E033 | 9    | HHT-Clin (4 mg/kg)             | 8  | 8,3 ± 0,4  |
| E033 | 16   | Colquicina (10<br>mg/kg)       | 8  | 6,3 ± 0,3  |
| E033 | 9,16 | HHT-Clin +<br>colquicina       | 8  | 9,4 ± 0,5  |
| E033 | 17   | 5-fluorouracilo<br>(15 mg/kg)  | 8  | 6,7 ± 0,4  |
| E033 | 9,17 | HHT-Clin + 5-<br>fluorouracilo | 8  | 8,6 ± 0,3  |
| E036 | -    | Control no tratado             | 8  | 6,8 ± 0,4  |
| E036 | 18   | Genisteína (60<br>mg/kg)       | 8  | 7,1 ± 0,4  |
| E036 | 9,18 | HHT-Clin +<br>Genisteína       | 6* | 9,2 ± 0,5  |

\* Muertes de animales ocurridas en estos grupos. Ver texto para detalles.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Utilización de una cefalotaxina y un agente antiproliferativo para la preparación de un medicamento para reducir o inhibir el crecimiento de un tumor sólido, en el que la cefalotaxina proporciona un efecto quimiopotenciador.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que la cefalotaxina comprende homoharringtonina.
3. Utilización según la reivindicación 1, en la que la cefalotaxina comprende un análogo de homoharringtonina.
- 10 4. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho agente antiproliferativo comprende un agente que interacciona con ácidos nucleicos.
- 15 5. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho agente antiproliferativo comprende un agente alquilante, un agente intercalante, un complejo de coordinación metálico, un nucleósido de pirimidina, un nucleósido de purina, un inhibidor de enzimas asociadas al ácido nucleico, o un inhibidor de proteínas asociadas a ácido nucleico.
- 20 6. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho agente antiproliferativo comprende cisplatino, citarabina, camptotecina, vinblastina, etopósido, 5-fluorouracilo, amonafida, colquicina, o genisteína.
7. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho medicamento comprende un medicamento de cefalotaxina y un medicamento antiproliferativo y en la que el medicamento de cefalotaxina se administra antes de la administración de dicho medicamento antiproliferativo.
- 25 8. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho medicamento comprende un medicamento de cefalotaxina y un medicamento antiproliferativo y en la que el medicamento de cefalotaxina se administra durante la administración de dicho medicamento antiproliferativo.
- 30 9. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicho medicamento comprende un medicamento de cefalotaxina y un medicamento antiproliferativo y en la que el medicamento de cefalotaxina se administra después de la administración de dicho medicamento antiproliferativo.
- 35 10. Utilización según la reivindicación 1, en la que la modulación sobre dicho tumor sólido con dicho medicamento es superior a la de dicho agente antiproliferativo solo.
11. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha reducción o inhibición del crecimiento de un tumor sólido comprende un incremento en el tiempo para que un tumor crezca cuatro veces el volumen del tumor después del tratamiento inicial.
- 40 12. Composición farmacéutica que comprende una cefalotaxina y un agente antiproliferativo, en la que el agente antiproliferativo se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, camptotecina, vinblastina, etopósido, amonafida, colquicina o genisteína.
- 45 13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, en la que dicha cefalotaxina comprende homoharringtonina o un análogo de homoharringtonina.
- 50 14. Medicamento que comprende una cefalotaxina y un agente antiproliferativo, en la que el agente antiproliferativo se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, camptotecina, vinblastina, etopósido, amonafida, colquicina o genisteína.
- 55 15. Medicamento según la reivindicación 14, en la que dicha cefalotaxina comprende homoharringtonina o un análogo de homoharringtonina.
- 60
- 65

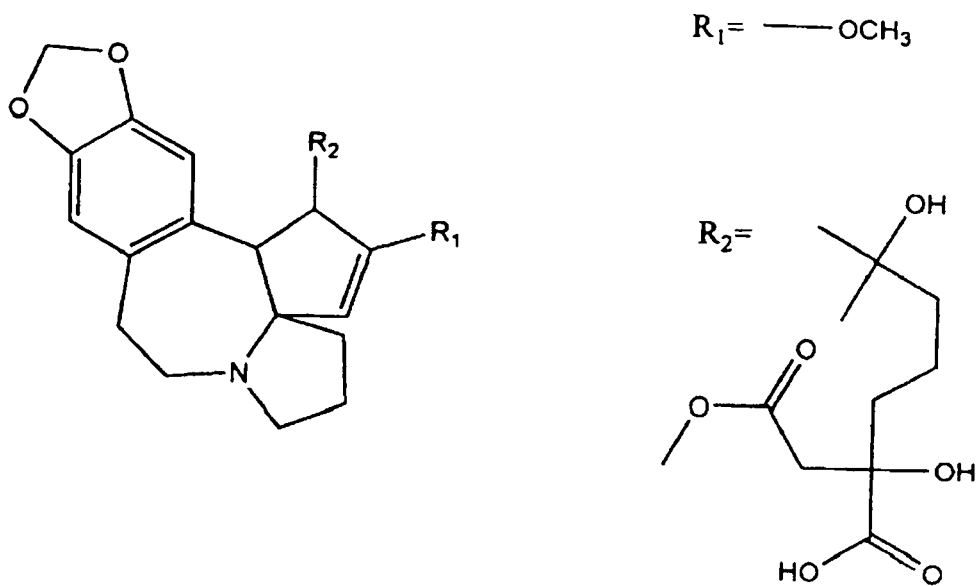


FIGURA 1

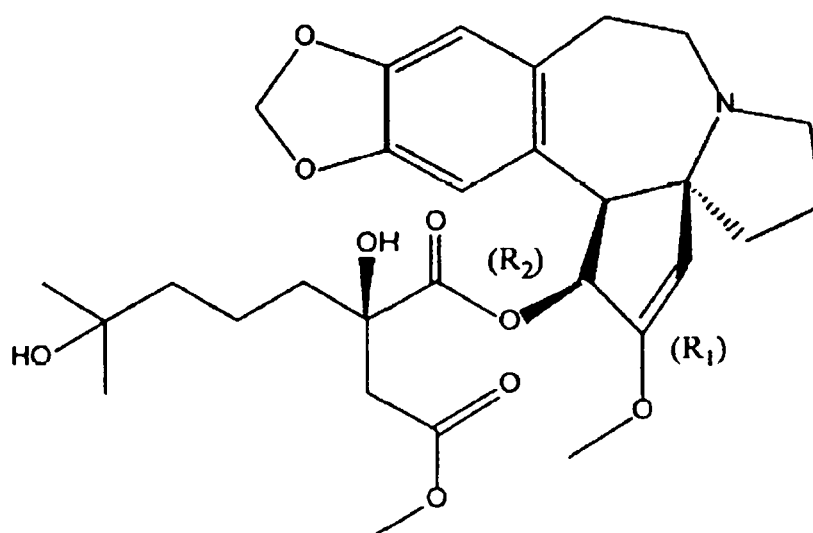


FIGURA 2

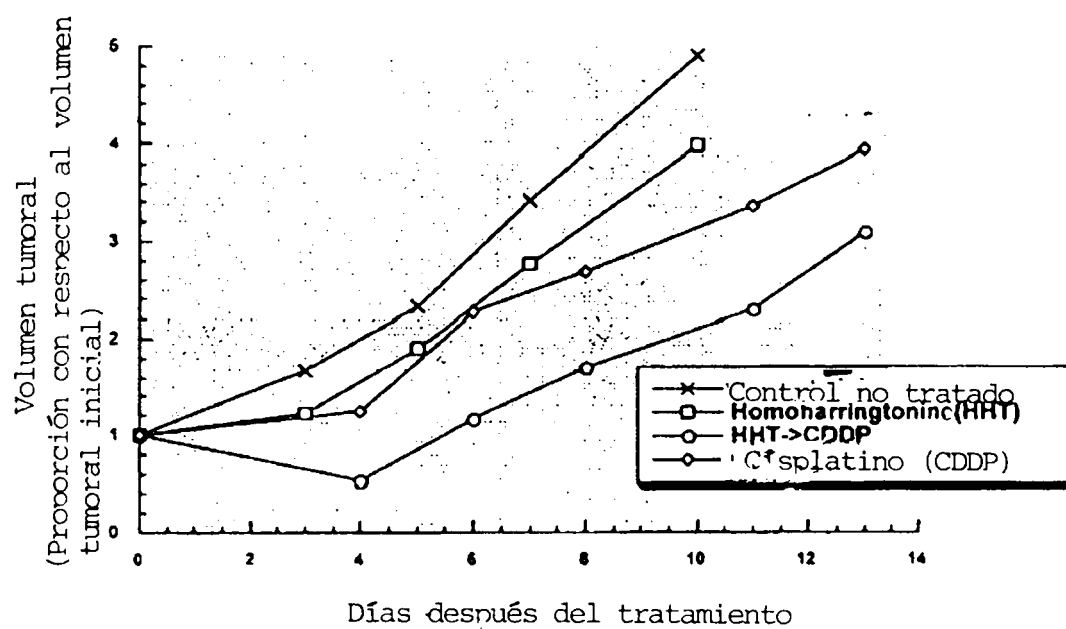


FIGURA 3