



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 313 201**

(51) Int. Cl.:
A61K 33/36 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05077338 .1**
(96) Fecha de presentación : **15.10.1998**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1621077**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

(54) Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden trióxido de arsénico para el tratamiento de un tumor del sistema nervioso central.**

(30) Prioridad: **15.10.1997 US 62375**

(73) Titular/es: **Polarx Biopharmaceuticals, Inc.**
48th Floor, 787 Seventh Avenue
New York, New York 10019, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

(72) Inventor/es: **Ellison, Ralph M. y**
Mermelstein, Fred H.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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 farmacéuticas que comprenden trióxido de arsénico para el tratamiento de un tumor del sistema nervioso central.

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para el tratamiento de un tumor del sistema nervioso central seleccionado del grupo constituido por neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma y oligodendroglioma. En la práctica del tratamiento de cáncer se usan composiciones que contienen trióxido de arsénico para detener e invertir crecimiento neoplásico.

Más específicamente, la presente invención se refiere a procedimientos quimioterápicos novedosos, usos novedosos de trióxido de arsénico para tratar un tumor del sistema nervioso central seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma y oligodendroglioma.

2. Antecedentes de la invención

En 1997 más de un millón de personas desarrollarán algún tipo de cáncer en los Estados Unidos. Aproximadamente 500.000 se curarán o estarán en un estado de remisión. Estas cifras representan una mejora de la tasa de curación que se observa a lo largo de la última década que se debe en gran parte a la detección temprana, al mejor tratamiento y a los avances en quimioterapia. En particular, los avances en quimioterapia incluyen tratamiento seleccionado como diana o con fármacos específicos en el que se desarrolla un fármaco específicamente para el tratamiento de un cierto tipo de cáncer. Este enfoque "orientado a la enfermedad" se diseña para identificar compuestos que ejercen efectos selectivos *in vitro* sobre tipos de tumores particulares y para seguir estos candidatos *in vivo* utilizando líneas celulares, (Fiebig *et al.*, Cancer Treatment Reviews 17:109-117 (1990)). Sin embargo, la incidencia de cáncer continua subiendo a medida que nuestra población envejece y a medida que nuevos cánceres se desarrollan y se producen más frecuentemente, tales como en pacientes infectados con el virus del SIDA. Por tanto, está claro que existe una tremenda demanda de otros regímenes para tratar pacientes con cáncer.

2.1. Patobiología del cáncer

El cáncer se caracteriza principalmente por un aumento en el número de células anómalas derivadas de un tejido normal dado, una invasión de tejidos adyacentes por estas células anómalas, y una extensión linfática o transmitida por sangre de células malignas hacia los nódulos linfáticos y hacia sitios distantes (metástasis). Los datos clínicos y estudios biológicos moleculares indican que el cáncer es un proceso de múltiples etapas que comienza con cambios preneoplásicos minoritarios que pueden evolucionar en determinadas condiciones hasta la neoplasia.

El crecimiento de células anómalas premalignas se da como ejemplo mediante hiperplasia, metaplasia, o lo más particularmente, displasia (para una revisión de tales condiciones de crecimiento anómalo véase Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2ª ed., W.B. Saunders Co., Filadelfia, págs. 68-79). La hiperplasia es una forma de proliferación de células controlada que implica un aumento en el número de células en un tejido u órgano, sin alteración significativa en la estructura o función. Sin embargo como un ejemplo, la hiperplasia de endometrio con frecuencia precede a cáncer de endometrio. La metaplasia es una forma de crecimiento de células controlado en el que un tipo de célula adulta o totalmente diferenciada se sustituye por otro tipo de célula adulta. La metaplasia puede producirse en células de tejido conjuntivo o epitelial. La metaplasia atípica implica un epitelio metaplásico algo desordenado. La displasia frecuentemente es un precursor del cáncer y se encuentra principalmente en los epitelios; es la forma más desordenada del crecimiento celular no neoplásico, que implica una pérdida de la uniformidad celular individual y de la orientación arquitectural de las células. Las células displásicas tienen con frecuencia núcleos grandes de manera anómala, intensamente teñidos y muestran pleomorfismo. La displasia se produce característicamente donde existe inflamación o irritación crónica, y se encuentra con frecuencia en el cuello uterino, vías respiratorias, cavidad oral y vesícula biliar.

La lesión neoplásica puede evolucionar de manera clonal y desarrollar un aumento de la capacidad de invasión, crecimiento, metástasis y heterogeneidad, especialmente en condiciones en las que las células neoplásicas escapan de la vigilancia inmunitaria del huésped (Roitt, I., Brostoff, J y Kale, D., 1993, Immunology, 3ª ed., Mosby, St. Louis, pág. 17.1-17.12).

2.3. Tumores del SNC primarios y metastásicos

La incidencia de tumores cerebrales primarios y metastásicos está aumentando en los Estados Unidos. De hecho, el arsenal de quimioterápicos para estos tipos de cánceres es mínimo, aunque la necesidad de dichos agentes terapéuticos es elevada.

El glioblastoma multiforme y otros tumores primarios y metastásicos del sistema nervioso central son tumores malignos devastadores. El tratamiento de estos tumores incluye cirugía, radioterapia y tratamiento con agentes tales como la nitrosourea BCNU. Otros agentes quimioterápicos utilizados incluyen procarbazona, vincristina, hidroxicauro y cisplatino. Desgraciadamente, incluso cuando se utilizan las tres modalidades (cirugía, radioterapia y quimioterapia),

la supervivencia media de los pacientes con tumores malignos del sistema nervioso central es aún de aproximadamente 57 semanas. Claramente, son necesarias nuevas estrategias de tratamiento tanto para pacientes con tumores primarios y metastásicos del sistema nervioso central recién diagnosticados como para pacientes con dichos tumores que no responden al tratamiento con las modalidades anteriores. El descubrimiento de dichos nuevos agentes ha sido complicado por el hecho de que no existe ningún modelo animal que parezca predecir qué agente será clínicamente eficaz frente a tumores primarios y metastásicos del sistema nervioso central.

2.6. Arsénico y sus usos médicos

Se ha considerado que el arsénico es tanto un veneno como un fármaco durante mucho tiempo en ambas prácticas médicas, occidental y china. En los últimos años del siglo diecinueve, se usó arsénico frecuentemente en intentos de tratar enfermedades de la sangre en occidente. En 1878 se notificó que el tratamiento de un paciente con leucemia con solución de Fowler (una disolución de arsenito de potasio) reducía notablemente el recuento de glóbulos blancos (Cutler y Bradford, *Am. J. Med. Sci.*, enero de 1878, 81-84). Otros intereses del uso de la solución de Fowler como agente paliativo para tratar leucemia mielógena crónica (LMC) se describieron por Forkner y Scott en 1931 (*J. Am. Med. Assoc.*, 1931, iii, 97), y posteriormente confirmados por Stephens y Lawrence en 1936 (*Ann. Intern. Med.* 9, 1488-1502). Normalmente, la solución de Fowler se administraba por vía oral a pacientes con leucemia como una disolución hasta que se disminuía el nivel de glóbulos blancos hasta un nivel aceptable o hasta el desarrollo de toxicidades (tales como hiperpigmentación y queratosis de la piel), mientras que los pacientes disfrutaban de periodos variables de remisión. En los años 60, todavía se usaba de manera ocasional la solución de Fowler en intentos para tratar LMC, sin embargo, la mayoría de los pacientes con LMC se trataban con otros agentes quimioterápicos, tales como busulfán, y/o tratamiento con radiación (Monfardini *et al.*, *Cancer*, 1973, 31: 492-501).

De manera paradójica, uno de los efectos más reconocidos de la exposición a arsénico, ya sea la fuente ambiental o médica, es el cáncer de piel (Hutchinson, 1888, *Trans. Path. Soc. Lond.*, 39:352; Neubauer, 1947, *Br. J. Cancer*, 1:192). Existen incluso datos epidemiológicos que sugieren que el uso de la solución de Fowler durante periodos largos podría conducir a un aumento de la incidencia de cáncer en sitios internos (Cuzick *et al.*, *Br. J. Cancer*, 1982, 45:904-911; Kaspar *et al.*, *J. Am. Med. Assoc.*, 1984, 252:3407-3408). La carcinogenicidad del arsénico ya se ha demostrado por el hecho de que puede inducir aberración cromosómica, amplificación génica, cambios entre cromátidas hermanas y transformación celular (véase por ejemplo, Lee *et al.*, 1988, *Science*, 241:79-81; y Germolec *et al.*, *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 1996, 141:308-318). Debido al efecto carcinogénico conocido del arsénico, su único uso terapéutico en seres humanos en la medicina occidental se encuentra hoy día en el tratamiento de enfermedades tropicales, tales como la tripanosomiasis africana, (melarsoprol, o Arsobal® por Rhône Poulenc Rorer, Collegenille, PA; véase Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª edición, capítulo 66, 1659-1662, 1997).

En la medicina china tradicional, la pasta de ácido arsenoso o trióxido de arsénico se ha usado para tratar enfermedades de médula dental, soriasis, sífilis y reumatosis (Chen *et al.*, 1995, en *Manual of Clinical Drugs*, Shanghai, China, Instituto de Shanghai de ciencia y tecnología (*Shanghai Institute of Science and Technology*), pág.830). En los años 70, se había aplicado el trióxido de arsénico para tratar experimentalmente la leucemia promielocítica aguda (LPA) en China (comentado por Mervis, 1996, *Science*, 273:578). La eficacia clínica del trióxido de arsénico se ha vuelto a investigar recientemente en 14 de 15 pacientes con LPA resistente a tratamiento, notificándose el uso de una dosis intravenosa a 10 mg/día durante 4-9 semanas para dar como resultado la remisión morfológica completa sin la supresión de médula ósea asociada (Shen *et al.*, 1997, *Blood*, 89:3354-3360). También se notificó que el trióxido de arsénico inducía apoptosis (muerte celular programada) *in vitro* en células NB4, una línea celular de LPA, y que la apoptosis estaba asociada aparentemente a la regulación por disminución del oncogen bcl-2, y la redistribución intracelular de la proteína PML/RAR α química que son únicas para las células de LPA (Chen *et al.*, 1996, *Blood*, 88:1052-1061; Andre *et al.*, 1996, *Exp. Cell Res.* 229:253-260). De manera similar, se ha notificado que melarsoprol induce apoptosis en líneas celulares representativas de leucemia de células B crónica (Konig *et al.*, 1997, *Blood* 90:562-570). Actualmente no está claro si la apoptosis se induce en pacientes con LPA, pero algunos piensan que es uno de los posibles mecanismos de los efectos terapéuticos de determinados compuestos de arsénico.

Aunque se conoce bien que el arsénico es tanto un veneno como un agente carcinogénico, existen muchos informes en lo que se refiere al uso de arsénico en tratamiento médico.

Además, de la discusión anterior debe estar claro que existe una plétora de tipos diferentes de cánceres, cada uno de los cuales requiere un único protocolo de tratamiento. Por tanto, el desarrollo de un agente anticancerígeno de amplio espectro es extremadamente deseable. Como mínimo, se necesita añadir agentes anticancerígenos eficaces adicionales al arsenal contra el cáncer.

3. Sumario de la invención

A pesar de los informes conflictivos en la técnica en lo que se refiere a beneficios y riesgos de la administración de arsénico a pacientes, los solicitantes han descubierto que el trióxido de arsénico tiene amplia aplicabilidad en el tratamiento de diversos cánceres. La presente invención incluye el uso de trióxido de arsénico en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor del sistema nervioso central seleccionado del grupo constituido por neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma y oligodendroglioma.

Según la presente invención, el trióxido de arsénico puede usarse solo o en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos (incluyendo agentes quimioterápicos, agentes radioprotectores y agentes radioterápicos) o técnicas para mejorar la calidad de vida del paciente o bien para tratar la enfermedad neoplásica primaria. Por ejemplo, el trióxido de arsénico puede usarse antes, durante o tras la administración de uno o más agentes antitumorales conocidos incluyendo pero sin limitarse a compuestos de mostaza, mostaza de nitrógeno, clorambucilo, melfalán, ciclofosfá-
 5 mida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, floxuridina, metotrexato, vincristina, vinblastina, taxol, etopósido, temipósido, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, mitomicina, cisplatino, carboplatino, estramustina fosfato, hidroxiurea, BCNU, procarbazona, VM-26 (vumon), interferones y ácido todo trans retinoico (ATTR), (véase por ejemplo, the Physician Desk References 1997). Además, los compuestos de arsénico
 10 pueden usarse antes, durante o tras el tratamiento de radiación. Para el tratamiento de individuos infectados por el VIH, el trióxido de arsénico puede usarse solo o en combinación con AZT, ddI, ddA, ddC, d4T, 3TC y otros agentes antivirales conocidos.

Sin quedar limitado por teoría alguna, los inventores creen que el trióxido de arsénico de la invención puede
 15 tener uno o más mecanismos de acción en relación con los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el trióxido de arsénico puede actuar como un análogo de fósforo que interfiere con los acontecimientos de fosforilación que se producen en la transducción de señales implicada en la apoptosis. El arsénico también puede actuar como un inhibidor de la angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos, limitando de ese modo el flujo sanguíneo hacia metástasis, tumores y masas celulares preneoplásicas en proliferación. Se sabe bien
 20 que si un tumor no es invadido por capilares sanguíneos debería depender de la difusión de nutrientes a partir de su entorno y no puede aumentar más allá de un determinado tamaño. El arsénico también puede funcionar como agente de diferenciación que hace que las células cancerígenas y/o preneoplásicas en división que presentan un fenotipo no diferenciado o subdiferenciado se desarrollen dentro de células diferenciadas de manera terminal y mueran tras un número finito de divisiones celulares. Finalmente, el arsénico también puede actuar para sensibilizar las células
 25 cancerígenas a la radiación y/o quimioterapia. Por tanto, el trióxido de arsénico de la invención se describe como que es útil contra una variedad de cánceres.

Las composiciones particulares de la invención y sus propiedades se describen en las secciones y subsecciones que
 30 siguen.

4. Breve descripción de las figuras

Figuras 1A-1I. Curvas de respuesta a la dosis que muestran el crecimiento en porcentaje de diversas líneas de células de cáncer tras la exposición continua a 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$ a 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$ de trióxido de arsénico durante 2 días. Figura
 35 1A. Líneas celulares leucémicas CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226, SR. Figura 1B. Líneas de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas A549/ATCC, EKVX, HOP-62, HOP-92, NCI-H226, NCI-H23, NCI-8322M, NCI-H460, NCI-H522. Figura 1C. Líneas de células de cáncer de colon COLO 205, HCT-116, HCT-15, HT29, KM12, SW620. Figura 1D. Líneas de células de cáncer del SNC SF-268, SF-295, SF-539, SNB-19, SNB-75, U251. Figura 1E. Líneas de células de melanoma LOX IMV1, MALME-3M, M14, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-MEL-5, UACC-257, UACC-62. Figura 1F. Líneas de células de cáncer de ovario IGROV1, OVCAR-3, OVCAR-5, OVCAR-8, SK-OV-3. Figura 1G. Líneas de células de cáncer renal A498, CAKI-1, RXE 393, SN12C, TX-10, UO-31. Figura 1H. Líneas de células de cáncer de próstata PC-3, DU-145. Figura 1I. Líneas de células de cáncer de mama MCF7, NCI/ADR-RES, MDA-MB-435, MDA-N, BT-549, T-47D.

Figura 2. Gráficos de las medias que muestran patrones de selectividad de cada uno de los parámetros de respuesta principales para todas las líneas celulares sometidas a prueba tras la exposición continua, a 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$ a 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$ de trióxido de arsénico durante 2 días.

Figuras 3A-3I. Curvas de respuesta a la dosis que muestran el crecimiento en porcentaje de diversas líneas de células de cáncer tras la exposición continua a 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$ a 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$ de trióxido de arsénico durante 6 días. Figura
 50 3A. Líneas celulares leucémicas CCRF-CEM, K-562, MOLT-4, RPMI-8226. Figura 3B. Líneas de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas EKVX, HOP-62, HOP-92, NCI-H226, NCI-H23, NCI-H322M, NCI-H460, NCI-H522. Figura 3C. Líneas de células de cáncer de colon COLO 205, HCT-116, HCT-15, HT29, KM12, SW-620. Figura 3D. Líneas de células de cáncer del SNC SF-268, SF-295, SF-539, SNB-75, U251. Figura 3E. Líneas de células de melanoma LOX IMVI, MALMI-3M, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-MEL-5, UACC-257, UACC-62. Figura 3F. Líneas de células de cáncer de ovario IGROVI, OVCAR-3, OVCAR-5, OVCAR-8, SK-OV-3. Figura 3G. Líneas de células de cáncer renal 786-O, A498, CAKI-1, RXF 393, S12C, TK-10. Figura 3H. Líneas de células de cáncer de próstata DU-145. Figura 3I. Líneas de células de cáncer de mama MCF7, NCI/ADR-RIS, MDA-MB-231/ATCC, HS 578T, MDA-MB-435, MDA-N, BR-549, T-47D.

Figura 4. Gráficos de las medias que muestran patrones de selectividad a cada uno de los parámetros de respuesta principales para todas las líneas celulares sometidas a prueba tras la exposición continua a 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$ a 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$ de trióxido de arsénico durante 6 días.

5. Descripción detallada de la invención

En el presente documento se describen procedimientos y composiciones para el tratamiento de un tumor del sistema nervioso central seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma y oligodendroglioma. La invención se

basa, en parte, en un régimen de dosificación para la administración de trióxido de arsénico. La invención también se basa en parte en la potencia del trióxido de arsénico de la invención contra un tumor del sistema nervioso central seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma y oligodendroglioma.

- 5 La invención también incluye un método de tratamiento de un tumor del sistema nervioso central seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma y oligodendroglioma en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero una dosis no letal y terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de arsénico.

- 10 Generalmente, el experto en la técnica reconocerá que la forma del trióxido de arsénico que va a usarse debe ser terapéuticamente eficaz con toxicidad razonable. La toxicidad depende de la dosis, la forma de dosificación, el modo de administración y frecuencia de dosificación.

- 15 Tal como se usa en el presente documento, “trióxido de arsénico” se refiere a una forma farmacéuticamente aceptable de trióxido de arsénico incluyendo sales, disoluciones, complejos, quelatos y compuestos orgánicos e inorgánicos que incorporan trióxido de arsénico. El trióxido de arsénico de la presente invención puede sintetizarse o adquirirse comercialmente. Por ejemplo, el trióxido de arsénico puede prepararse a partir de técnicas químicas bien conocidas. (Véase por ejemplo, Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology 4ª ed. volumen 3 pág. 633-655 John Wiley & Sons).

- 20 En una realización, el trióxido de arsénico de la invención se disuelve en una disolución acuosa de hidróxido de sodio, con el pH ajustado hasta un intervalo fisiológicamente aceptable, por ejemplo aproximadamente pH 6-8.

- 25 Cualquier modo de administración adecuado puede usarse según la presente invención incluyendo pero sin limitarse a administración parenteral tal como administración intravenosa, subcutánea, intramuscular e intratecal; también puede usarse la administración oral, intranasal, rectal o vaginal; directamente dentro del tumor; parches transdérmicos; dispositivos de implante (particularmente para la liberación lenta); finalmente, puede usarse la administración tópica. El modo de administración variará según la enfermedad que va a tratarse.

- 30 Las composiciones farmacéuticas que van a usarse pueden estar en forma de disoluciones fisiológicamente aceptables estériles (acuosas u orgánicas), suspensiones coloidales, cremas, pomadas, pastas, cápsulas, comprimidos oblongos, comprimidos y cápsulas con forma de sello. Las composiciones farmacéuticas que comprenden trióxido de arsénico de la invención pueden estar contenidas en ampollas y/o recipientes de vidrio estériles sellados. Además, el principio activo puede estar microencapsulado, encapsulado en un liposoma, noisoma o Lipofoam solo o en relación con anticuerpos de selección como diana. Debe reconocerse que las formas de administración de liberación sostenida o lenta retardada también se incluyen.

Los compuestos de arsénico de la presente invención pueden usarse contra tumores primarios y metastásicos del sistema nervioso central seleccionados de

- 40 Neuroblastoma

Retinoblastoma

Glioblastoma

- 45 Oligodendroglioma

- 50 La expresión “un procedimiento para tratar tumores primarios y metastásicos del sistema nervioso central” tal como se usa en el presente documento significa que la enfermedad y los síntomas asociados a la enfermedad se alivian, se reducen, se curan o por lo demás se sitúan en un estado de remisión.

- 55 La expresión “resistente a un tratamiento” cuando se usa en el presente documento significa que los tumores malignos son generalmente resistentes al tratamiento o a la cura. La expresión “resistente a un tratamiento” cuando se usa en los términos anteriores significa que los tumores malignos que son generalmente resistentes al tratamiento o a la cura se alivian, se reducen, se curan o se sitúan en un estado de remisión.

- 60 Tal como se usa en el presente documento las expresiones “un agente terapéutico”, “régimen terapéutico”, “agente radioprotector”, “agente quimioterápico” significan fármacos y tratamientos con fármacos convencionales, incluyendo vacunas, para tratar cáncer, infecciones virales y otros tumores malignos que los expertos en la técnica conocen. Los agentes “radioterapéuticos” se conocen bien en la técnica.

- 65 Tal como se usa en el presente documento, “un procedimiento de tratamiento de cáncer” o “un procedimiento de tratamiento de enfermedades neoplásicas” significa que la enfermedad y los síntomas asociados a la enfermedad se alivian, se reducen, se curan o se sitúan en un estado de remisión. Además, el crecimiento tumoral se inhibe y/o se reduce el tamaño del tumor.

Tal como se usa en el presente documento, célula “preneoplásica” se refiere a una célula que está en transición desde una forma normal hasta una neoplásica; y la evidencia morfológica, apoyada crecientemente por los estudios

biológicos moleculares, indica que la preneoplasia evoluciona a través de múltiples etapas. El crecimiento celular no neoplásico comúnmente está constituido por hiperplasia, metaplasia, o los más particularmente, displasia (para una revisión de tales condiciones de crecimiento anómalas (véase Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2ª ed., W.B. Saunders Co., Filadelfia, pág. 68-79). La hiperplasia es una forma de proliferación de células controlada que implica un aumento en el número de células en un tejido u órgano, sin alteración significativa en la estructura o función. Sin embargo como un ejemplo, la hiperplasia de endometrio con frecuencia precede a cáncer de endometrio. La metaplasia es una forma de crecimiento de células controlado en el que un tipo de célula adulta o totalmente diferenciada se sustituye por otro tipo de célula adulta. La metaplasia puede producirse en células de tejido conjuntivo o epitelial. La metaplasia atípica implica un epitelio metaplásico algo desordenado. La displasia frecuentemente es un precursor del cáncer y se encuentra principalmente en los epitelios; es la forma más desordenada del crecimiento celular no neoplásico, que implica una pérdida de la uniformidad celular individual y de la orientación arquitectural de las células. Las células displásicas tienen con frecuencia núcleos grandes de manera anómala, intensamente teñidos y muestran pleomorfismo. La displasia se produce característicamente donde existe inflamación o irritación crónica, y se encuentra con frecuencia en el cuello uterino, vías respiratorias, cavidad oral y vesícula biliar. Aunque las lesiones preneoplásicas pueden evolucionar hacia la neoplasia, también pueden permanecer estables durante periodos largos y pueden incluso remitir, particularmente si se elimina el agente provocador o si la lesión sucumbe a un ataque inmunológico por su huésped.

Los regímenes terapéuticos y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse con otros potenciadores de la respuesta inmunitaria o modificadores de la respuesta biológica incluyendo, pero sin limitarse a, las citocinas IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF, u otros inmunoestimulantes/inmunomoduladores. Según este aspecto de la invención, el trióxido de arsénico se administra en terapia de combinación con uno o más de estos agentes.

5.1. *Formulación*

El trióxido de arsénico de la invención puede formularse dentro de preparaciones farmacéuticas para la administración a mamíferos para el tratamiento de un cáncer del sistema nervioso central seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma y oligodendroglioma. Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formuladas en un vehículo farmacéuticamente compatible pueden prepararse, envasarse, etiquetarse para el tratamiento de y usarse para el tratamiento del tumor indicado, tal como un tumor del sistema nervioso central seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma y oligodendroglioma.

Si el complejo es soluble en agua, entonces puede formularse en un tampón apropiado, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato u otras disoluciones fisiológicamente compatibles. Como alternativa, si el complejo resultante tiene poca solubilidad en disolventes acuosos, entonces puede formularse con un tensioactivo no iónico tal como Tween, polietilenglicol o glicerina. Por tanto, el trióxido de arsénico y sus solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para la administración mediante inhalación o insuflación (a través de la boca o bien de la nariz) o administración oral, bucal, parenteral, tópica, dérmica, vaginal, por dispositivo de suministro de fármaco, por ejemplo, material poroso o viscoso tal como Lipofoam, rectal o, en el caso de tumores, directamente inyectados dentro de un tumor sólido.

Para la administración oral, la preparación farmacéutica puede estar en forma de líquido, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto farmacológico para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes de emulsión (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres aceitosos o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden revestirse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Las preparaciones para la administración oral pueden formularse de manera adecuada dando la liberación controlada de trióxido de arsénico.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

Para la administración mediante inhalación, el trióxido de arsénico para su uso según la presente invención se suministra de manera convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

ES 2 313 201 T3

El trióxido de arsénico puede formularse para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Tales formulaciones son estériles. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en aceite o vehículos acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, de estabilización y/o de dispersión. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de su uso.

El trióxido de arsénico también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, el trióxido de arsénico también puede formularse como una preparación de liberación lenta. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, el trióxido de arsénico puede formularse con materiales hidrófobos o poliméricos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble. Liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos o portadores de suministro para fármacos hidrófilos.

Las composiciones pueden presentarse, si se desea, en un dispositivo dispensador o envase que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede comprender por ejemplo una lámina de plástico o metal, tal como un envase de blister. El dispositivo dispensador o envase puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

La invención también se refiere a kits para llevar a cabo los regímenes terapéuticos de la invención. Tales kits comprenden en uno o más recipientes cantidades terapéuticamente eficaces del trióxido de arsénico en forma farmacéuticamente aceptable. El trióxido de arsénico en un vial de un kit puede estar en forma de una disolución farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, en combinación con solución salina estéril, disolución de dextrosa, o disolución tamponada, u otro fluido estéril farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, el complejo puede liofilizarse o desecarse; en este caso, el kit comprende además opcionalmente en un recipiente una disolución farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina, disolución de dextrosa, etc.), preferiblemente estéril, para reconstituir el complejo para formar una disolución para fines de inyección.

En otra realización, un kit comprende además una aguja o jeringa, preferiblemente envasada en forma estéril, para inyectar el complejo, y/o una almohadilla con alcohol envasada. Opcionalmente se incluyen las instrucciones para la administración de trióxido de arsénico por un médico o por el paciente.

La magnitud de una dosis terapéutica de un trióxido de arsénico en la gestión aguda o crónica de un tumor del sistema nervioso central seleccionado de neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma y oligodendroglioma variará con la gravedad del estado que va a tratarse y la vía de administración. La dosis, y quizás la frecuencia de dosis también variará con la edad, peso corporal, estado y respuesta del paciente individual. En general, los intervalos de dosis diaria total para los estados descritos en el presente documento son generalmente desde aproximadamente 10 μg hasta aproximadamente 200 mg administrados en dosis divididas por vía parenteral o por vía oral o por vía tópica. Una dosis diaria total preferida es desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 70 mg del principio activo.

Pueden mantenerse niveles en sangre deseables mediante una infusión continua de un trióxido de arsénico tal como se determina por niveles en plasma. Debe observarse que el médico encargado sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar el tratamiento hasta dosificaciones inferiores debido a la toxicidad, o insuficiencias renales, hepáticas o de la médula ósea. Por el contrario, el médico encargado también sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento hasta niveles superiores si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo efectos secundarios tóxicos).

De nuevo, puede emplearse cualquier vía de administración adecuada para proporcionar al paciente una dosificación eficaz de un trióxido de arsénico. Por ejemplo, puede emplearse la administración oral, rectal, vaginal, transdérmica, parenteral (subcutánea, intramuscular, intratecal). Las formas de dosificación incluyen comprimidos, pastillas, cápsula en forma de sello, dispersiones, suspensiones, disoluciones, cápsulas, parches y similares. (Véase, Remington's Pharmaceutical Sciences).

Las composiciones farmacéuticas comprenden un trióxido de arsénico como principio activo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y también pueden contener un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos, por ejemplo antivirales. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases y ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases y ácidos inorgánicos y orgánicos.

Las composiciones farmacéuticas incluyen composiciones adecuadas para la administración oral, rectal, por vías mucosas, transdérmica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intratecal e intravenosa), aunque la ruta más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad del estado que se está tratando.

ES 2 313 201 T3

En el caso en el que se emplea una composición de infusión o inyección intravenosa, un intervalo de dosificación adecuado para su uso es, por ejemplo desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 150 mg de dosis diaria total.

Además, el vehículo de trióxido de arsénico puede suministrarse mediante matrices cargadas o no cargadas usadas como dispositivos de suministro de fármacos tales como membranas de acetato de celulosa, también a través de sistemas de suministro seleccionados como diana tales como liposomas fusogénicos unidos a anticuerpos o antígenos específicos.

En el uso práctico, el trióxido de arsénico puede combinarse como principio activo en mezcla estrecha con un vehículo farmacéutico según técnicas convencionales de composición farmacéutica. El vehículo puede tomar una variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, administración oral o parenteral (incluyendo comprimidos, cápsulas, polvos, infusiones o inyecciones intravenosas). Para preparar las composiciones para la forma de dosificación oral puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes de coloración y similares; en el caso de preparaciones líquidas orales, por ejemplo, suspensiones, disoluciones, elixires, liposomas y aerosoles; almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales por ejemplo polvos, cápsulas y comprimidos. Para preparar las composiciones para la forma de dosificación parenteral, tales como infusión o inyección intravenosa, pueden emplearse medios farmacéuticos similares, agua, glicoles, aceites, tampones, azúcar, conservantes y similares conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de tales composiciones parenterales incluyen pero no se limitan a dextrosa al 5% p/v, solución salina u otras disoluciones. La dosis total de trióxido de arsénico puede administrarse en un vial de fluido intravenoso, por ejemplo, que oscila entre aproximadamente 2 ml y aproximadamente 2000 ml. El volumen del fluido de dilución variará según la dosis total administrada.

5.2. Cánceres diana

Los cánceres que pueden tratarse mediante los métodos descritos incluyen neuroblastoma y retinoblastoma.

6. Ejemplos de referencia

Las siguientes subsecciones describen las pruebas de una composición farmacéutica que comprende trióxido de arsénico *in vitro* usando un panel de líneas de células de cáncer empleadas por el Instituto Nacional contra el Cáncer (NCI, *National Cancer Institute*). Los resultados demuestran que el trióxido de arsénico es eficaz para inhibir el crecimiento de una amplia gama de células leucémicas y células de cáncer *in vitro*.

5.1. Procedimientos y materiales

Se sometió a prueba trióxido de arsénico (1 mg/ml, 10 mg/ampolla, fabricado por Taylor Pharmaceuticals, Decatur, Illinois) a cinco concentraciones cada una diluciones de 10 veces, es decir, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , y 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$.

Se realizaron las pruebas *in vitro* incubando las células de prueba en presencia de la concentración indicada de trióxido de arsénico en condiciones de cultivo habituales durante un periodo de tiempo designado, que se sigue por un ensayo de proteína de sulforhodamina B (SRB) para evaluar el crecimiento o viabilidad celular. Se organizan las líneas celulares en subpaneles según el origen de las líneas celulares, por ejemplo, leucemia, cáncer de mama, etc. Una descripción de las líneas celulares y procedimiento de prueba se describe en Monk *et al.* (1997, *Anticancer Drug Des.* 12:533-41) y Weinstein *et al.*, (1997, *Science* 275:343-9).

A continuación se describen las presentaciones y procedimientos de análisis de datos.

La medición de un efecto se expresa en porcentaje de crecimiento (PC). El efecto medido del compuesto sobre una línea celular se calcula según una o la otra de las siguientes dos expresiones:

si $(DO_{\text{test}} \text{ media} - DO_{\text{cero}} \text{ media}) \geq 0$. entonces

$$PG = 100 \times (DO_{\text{test}} \text{ media} - DO_{\text{cero}} \text{ media}) / (DO_{\text{ctrl}} \text{ media} - DO_{\text{cero}} \text{ media})$$

si $(DO_{\text{test}} \text{ media} - DO_{\text{cero}} \text{ media}) < 0$. entonces

$$PG = 100 \times (DO_{\text{test}} \text{ media} - DO_{\text{cero}} \text{ media}) / DO_{\text{cero}} \text{ media}$$

en las que:

$DO_{\text{cero}} \text{ media}$ = el promedio de las mediciones de densidad óptica de color derivado de SRB justo antes de la exposición de las células al compuesto de prueba;

ES 2 313 201 T3

$DO_{\text{test}} \text{ media} =$ el promedio de las mediciones de densidad óptica de color derivado de SRB tras la exposición de las células al compuesto de prueba durante un periodo de tiempo designado; y

$DO_{\text{ctrl}} \text{ media} =$ el promedio de las mediciones de densidad óptica de color derivado de SRB tras la no exposición de las células al compuesto de prueba durante un periodo de tiempo designado

Las tablas 1 y 2 presentan los datos experimentales recogidos frente a cada línea celular. Las dos primeras dos columnas describen el subpanel (por ejemplo, leucemia) y línea celular (por ejemplo, CCRF-CEM) implicados. Las dos columnas siguientes enumeran la DO_{cero} media y la DO_{ctrl} media; las cinco columnas siguientes enumeran la DO_{test} media para cada una de las cinco concentraciones diferentes. Cada concentración se expresa como el $\log_{10}$ (molar o $\mu\text{g/ml}$). Las cinco columnas siguientes enumeran los PC calculados para cada concentración. Los parámetros de respuesta IC50, ICT y CL50 son valores interpolados que representan las concentraciones a las que el PC es +50, 0 y -50, respectivamente. A veces estos parámetros de respuesta no pueden obtenerse mediante interpolación. Si, por ejemplo, todos los PC en una fila dada superan +50, entonces ninguno de los tres parámetros puede obtenerse mediante interpolación. En un caso de este tipo, el valor dado para cada parámetro de respuesta es la concentración más alta sometida a prueba y se precede por un signo ">". Esta práctica se extiende de manera similar a las otras posibles situaciones en las que no puede obtenerse un parámetro de respuesta mediante interpolación.

Se crea una curva de dosis-respuesta (véanse las figuras 1A-1I y 3A-3I) para el conjunto de datos trazando los PC frente al $\log_{10}$ de la concentración correspondiente para cada línea celular. Las curvas de línea celular se agrupan en subpaneles. Se proporcionan líneas horizontales al valor de PC de +50, 0 y -50. Las concentraciones correspondientes a puntos en los que las curvas cruzan estas líneas son las IC50, ICT y CL50, respectivamente.

Un gráfico de las medias (figuras 2 y 4) facilita la exploración visual de datos para posibles patrones de selectividad para líneas celulares particulares o para subpaneles particulares con respecto a un parámetro de respuesta seleccionado. Pueden producirse diferencias en patrones de selectividad evidentes para el mismo compuesto frente a las mismas líneas celulares cuando se comparan diferentes parámetros. La página de gráficos de las medias del paquete de datos muestra gráficos de las medias a cada uno de los parámetros de respuesta principales: IC50, ICT y CL50. Las barras que se extienden a la derecha representan la sensibilidad de la línea celular con respecto al agente de prueba en exceso de la sensibilidad promedio de todas las líneas celulares sometidas a prueba. Puesto que la escala de barras es logarítmica, dos unidades de barra a la derecha implica que el compuesto alcanza el parámetro de respuesta (por ejemplo IC50) para la línea celular a una concentración de una centésima la concentración media requerida por todas las líneas celulares y por tanto la línea celular es sensible de manera inusual a ese compuesto. Las barras que se extienden a la izquierda implican de manera correspondiente menos sensibilidad que la media. Si para una línea celular y un fármaco particulares no era posible determinar el parámetro de respuesta deseado mediante interpolación, la longitud de la barra mostrada es la mayor concentración sometida a prueba (y el $\log_{10}$ enumerado del parámetro de respuesta estará precedido por un ">") o bien la menor concentración sometida a prueba (y el $\log_{10}$ enumerado estará precedido por un "<").

También se calculan los valores a cualquier límite (> o <) en la media usada para el gráfico de las medias. Por tanto, la media usada en el gráfico de las medias puede no ser la media real de la IC50 por ejemplo. Por este motivo, este valor se denomina el PMGM (para el punto medio del gráfico de las medias).

2. Resultados

Los resultados de dos conjuntos de pruebas se presentan a continuación. En el primer conjunto, las células de 56 líneas celulares de cáncer diferentes se expusieron a cinco concentraciones de trióxido de arsénico de manera continua durante dos días antes de realizar el ensayo de SRB. En el segundo conjunto, las células de 50 líneas celulares diferentes (un subconjunto de las primeras 56 líneas celulares, más la línea de células de cáncer renal 786-0) se expusieron de manera continua durante seis días antes del ensayo de SRB.

Concentración en Log 10

TABLA 1

	Tiempo cero	Densidades ópticas medias							Porcentaje de crecimiento							IC50	ICT	CL50
		Crtl	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	-3,9	-2,9	-1,9	-0,9	0	1	2	3			
Leucemia																		
CCRF-CEM	0,300	1,155	1,203	1,195	1,134	0,704	0,285	106	105	98	47	-5	1,11E-06	1,00E-05	>1,26E-05			
HL-60(TB)	0,233	0,530	0,533	0,507	0,535	0,499	0,213	101	92	102	90	-9	3,19E-06	1,03E-05	>1,26E-05			
K-562	0,209	1,416	1,387	1,431	1,418	1,124	0,199	98	101	100	76	-5	2,63E-06	1,10E-05	>1,26E-05			
MOLT-4	0,134	0,438	0,465	0,454	0,454	0,368	0,146	109	105	105	77	4	2,96E-06	>1,26E-05	>1,26E-05			
RPMI-8226	0,257	0,893	0,868	0,848	0,813	0,670	0,204	96	93	87	6	-21	1,88E-06	7,23E-06	>1,26E-05			
SR	0,158	0,457	0,454	0,425	0,457	0,338	0,111	99	89	100	60	-30	1,63E-06	5,85E-06	>1,26E-05			
Cáncer de pulmón de células no pequeñas																		
A549/ATCC	0,015	0,477	0,479	0,486	0,476	0,516	0,336	100	102	100	108	69	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05			
EKVX	0,342	0,736	0,809	0,849	0,841	0,853	0,385	119	129	127	130	11	5,91E-06	>1,26E-05	>1,26E-05			
HOP-62	0,335	1,109	1,088	1,099	1,113	1,086	0,605	97	99	100	97	35	7,18E-06	>1,26E-05	>1,26E-05			
HOP-92	0,505	1,694	1,554	1,603	1,477	1,381	0,873	88	92	82	74	31	4,50E-06	>1,26E-05	>1,26E-05			
NCI-H226	0,560	0,932	0,967	0,918	0,967	0,967	0,904	109	96	109	109	92	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05			
NCI-H23	0,648	1,622	1,769	1,822	1,880	1,635	1,215	115	121	127	101	58	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05			
NCI-8322M	0,382	0,997	1,103	1,036	0,976	0,992	0,755	117	106	97	99	61	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05			
NCI-H460	0,296	1,235	1,132	1,186	1,234	1,157	0,757	89	95	100	92	49	1,20E-05	>1,26E-05	>1,26E-05			
NCI-H522	0,478	1,138	1,332	1,135	1,189	0,892	0,378	129	100	108	63	-21	1,79E-06	>7,08E-06	>1,26E-05			
Cáncer de colon																		
COLO 205	0,328	1,394	1,425	1,414	1,576	1,434	0,935	103	102	117	104	57	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05			
HCT-116	0,301	1,574	1,508	1,480	1,488	1,391	0,685	95	93	93	86	30	5,53E-06	>1,26E-05	>1,26E-05			
HCT-15	0,219	1,623	1,800	1,627	1,673	1,522	0,504	113	100	104	93	20	4,90E-06	>1,26E-05	>1,26E-05			
HT29	0,095	0,578	0,637	0,599	0,580	0,479	0,169	112	104	100	80	15	3,63E-06	>1,26E-05	>1,26E-05			
KM12	0,189	0,741	0,744	0,728	0,777	0,737	0,567	101	98	106	99	68	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05			
SW-620	0,153	0,886	0,898	0,868	0,857	0,779	0,267	102	98	96	85	16	4,05E-06	>1,26E-05	>1,26E-05			

	65	60	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5			
Cáncer del SNC	SF-268	0,203	0,767	0,821	0,736	0,815	0,767	0,334	110	94	108	100	23	5,63E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	SF-295	0,249	1,007	0,951	0,978	0,938	0,938	0,639	93	96	91	91	51	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05
	SF-539	0,132	0,462	0,491	0,516	0,506	0,435	0,110	109	117	113	92	-17	3,06E-06	8,85E-06	>1,26E-05
	SNB-19	0,176	0,905	0,857	0,880	0,887	0,883	0,437	93	97	98	97	36	7,38E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	SNB-75	0,501	1,051	0,925	1,049	1,134	0,703	0,438	77	100	115	37	-13	8,54E-07	6,98E-06	>1,26E-05
	U251	0,192	0,799	0,789	0,792	0,803	0,680	0,061	98	99	101	80	-68	2,02E-06	4,37E-06	9,47E-06
	Melanoma															
Cáncer de ovario	LOX IMVI	0,173	1,304	1,175	1,170	0,974	0,997	0,319	89	88	71	73	13	3,03E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	MALME-3M	0,476	0,859	1,006	0,949	0,868	0,819	0,275	138	123	102	90	-42	2,51E-06	6,02E-06	>1,26E-05
	M14	0,123	0,613	0,602	0,635	0,592	0,549	0,136	98	105	96	87	3	3,45E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	SK-MEL-2	0,388	0,704	0,746	0,714	0,735	0,676	0,323	113	103	110	91	-17	3,03E-06	8,81E-06	>1,26E-05
	SK-MEL-28	0,513	1,090	1,088	1,107	1,093	1,057	0,546	100	103	101	94	6	3,98E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	SK-MEL-5	0,454	2,107	2,049	2,066	2,025	1,748	0,460	96	97	95	78	0	2,90E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	UACC-257	0,596	1,142	1,149	1,128	1,165	1,078	0,814	101	97	104	88	40	7,78E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
Cáncer renal	UACC-62	0,306	1,082	1,111	1,105	1,108	1,051	0,355	104	103	103	96	6	4,10E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	IGROVI	0,291	1,679	1,828	1,932	1,743	1,710	0,536	111	118	105	102	18	5,22E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	OVCAR-3	0,240	1,066	1,073	1,055	1,045	0,980	0,343	101	99	97	90	12	4,10E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	OVCAR-5	0,457	1,206	1,243	1,230	1,157	1,181	0,715	105	103	93	97	34	7,07E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	OVCAR-8	0,173	1,340	1,250	1,245	1,159	1,107	0,495	92	92	84	80	28	4,71E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	SK-OV-3	0,351	0,865	0,836	0,852	0,853	0,867	0,557	94	97	98	100	40	8,59E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	A498	0,400	0,678	0,691	0,657	0,649	0,635	0,357	105	93	89	84	-11	2,90E-06	9,71E-06	>1,26E-05
Cáncer renal	CAKI-1	0,372	0,942	1,058	0,960	1,103	0,819	0,325	120	103	128	78	-13	2,59E-06	9,13E-06	>1,26E-05
	RXE 393	0,743	1,243	0,860	1,114	1,290	1,077	0,776	23	74	109	67	7		>1,26E-05	>1,26E-05
	SN12C	0,157	0,546	0,533	0,529	0,500	0,474	0,113	97	96	88	81	-28	1,44E-06	6,96E-06	>1,26E-05
	TX-10	0,355	1,027	1,014	1,002	1,042	0,999	0,727	98	96	102	96	55	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05

65	UO-31	0,124	0,765	0,799	0,816	0,830	0,785	0,391	105	108	110	103	42	9,20E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
60	Cáncer de próstata															
	PC-3	0,187	0,419	0,426	0,399	0,390	0,342	0,179	103	91	88	67	-4	2,17E-06	1,10E-05	>1,26E-05
	DU-145	0,384	1,151	1,081	1,389	1,194	1,119	0,873	91	131	106	96	64	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05
	Cáncer de mama															
	MCF7	0,200	0,928	0,924	0,912	0,985	0,893	0,277	99	98	108	95	11	4,31E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	NCI/ADR-RES	0,328	1,386	1,576	1,376	1,425	1,298	0,801	118	99	104	92	45	9,69E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	MDA-MB-231/ATCC	0,304	0,644	0,635	0,651	0,674	0,667	0,314	97	102	109	107	3	4,43E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	HS 578T	0,369	1,255	1,338	1,296	1,219	1,300	0,742	109	105	96	105	42	9,44E-06	1,26E-05	>1,26E-05
	MDA-MB-435	0,465	1,425	1,370	1,354	1,476	1,369	0,666	94	93	105	94	21	5,05E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	MDA-N	0,348	1,471	1,499	1,481	1,374	1,316	0,385	102	101	91	86	3	3,44E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	BT-549	0,735	1,762	1,910	1,865	1,847	1,599	0,998	114	110	108	84	26	4,82E-06	>1,26E-05	>1,26E-05
	T-47D	0,464	1,007	0,941	1,054	1,184	0,905	0,419	88	109	133	81	-10	2,78E-06	9,86E-06	>1,26E-05

ES 2 313 201 T3

En el primer conjunto de pruebas, según la tabla 1 y las curvas de respuesta a la dosis según lo mostrado en la figura 1A a 1I, el trióxido de arsénico era eficaz para reducir el crecimiento celular contra casi todas las líneas celulares sometidas a prueba. En particular, las líneas celulares leucémicas, las líneas de células de melanoma y las líneas de células de cáncer de ovario respondieron consecuentemente mostrando una reducción superior al 50% de crecimiento. Según el gráfico de las medias tal como se muestra en la figura 2, la mayor parte de las líneas de células de melanoma y leucémicas, las líneas de células de cáncer del sistema nervioso central SNB-75 y U251, la línea de células de cáncer de próstata PC-3, las líneas de células de cáncer renal A498, CAKI- 1, SN12C, y la línea de células de cáncer de pulmón NCI-H522 fueron especialmente sensibles (con respecto a todas las líneas celulares sometidas a prueba) al tratamiento con trióxido de arsénico.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Concentración en Log 10

Panel/línea celular	Tiempo cero	Ctrl.	Densidades ópticas medias					Porcentaje de crecimiento					IC50	ICT	CL50		
			-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9					
Leucemia																	
CCRF-CEM	0,047	3,511	3,601	3,592	3,051	0,320	0,048	103	102	87	8	0	3,68E-07	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05	
K-562	0,041	3,011	3,042	2,992	3,360	2,931	0,096	101	99	112	97	2	3,941-06	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05	
MOLT-4	0,018	0,503	0,554	0,228	0,432	0,245	0,113	111	43	85	47	20		>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05	
RPMI-8226	0,066	1,432	1,607	1,263	1,423	0,368	0,065	113	88	99	22	-2	5,481-07	1,091-05	>1,26E-05	>1,26E-05	
Cáncer de pulmón de células no pequeñas																	
EKVX	0,030	0,682	0,573	0,601	0,628	0,414	0,014	83	88	92	59	-53	1,51E-06	4,22E-06	1,18E-05	1,18E-05	
HOP-62	0,061	1,026	1,076	0,997	1,019	0,451	0,014	105	97	99	40	-77	8,66E-07	2,781-06	7,41E-06	7,41E-06	
HOP-92	0,115	1,292	1,455	1,834	1,319	1,229	0,079	114	146	102	95	-31	2,85E-06	7,111-06	>1,26E-05	>1,26E-05	
NCI-H226	0,094	0,498	0,504	0,458	0,489	0,348	0,164	101	90	98	63	17	2,40E-08	>1,261-05	>1,26E-05	>1,26E-05	
NCI-H23	0,075	1,624	1,818	1,814	1,872	1,303	0,086	113	112	116	79	1	2,97E-06	>1,261-05	>1,26E-05	>1,26E-05	
NCI-H322M	0,035	0,702	0,680	0,620	0,674	0,552	0,054	97	88	96	77	3	2,94E-06	>1,261-05	>1,26E-05	>1,26E-05	
NCI-H460	0,034	2,839	2,797	2,806	2,792	2,535	0,062	99	99	98	89	1	3,50E-06	>1,261-05	>1,26E-05	>1,26E-05	
NCI-H522	0,175	1,224	1,269	0,535	1,191	0,128	0,028	104	34	97	-27	-84		7,641-07	3,19E-06	3,19E-06	
Cáncer de colon																	
COLO 205	0,022	2,351	2,308	2,026	2,283	1,404	0,024	98	86	97	59	0	1,81E-06	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05	
HCT-116	0,046	3,420	3,395	3,289	3,381	3,284	1,931	99	96	99	96	56	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05	
HCT-15	0,033	3,838	3,965	3,921	4,227	3,432	0,404	103	102	110	89	10	3,93E-06	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05	
HT29	0,017	3,060	3,189	2,988	2,706	1,476	0,027	104	98	88	48	0	1,12E-06	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05	
KM12	0,012	0,808	0,487	0,533	0,507	0,036	0,017	80	87	83	4	1	3,29E-07	>1,26E-05	>1,26E-05	>1,26E-05	

ES 2 313 201 T3

	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
SW-620		3,43E-06	1,39E-06	-72	55	88	99	87	88	55	-72	1,39E-06	8,50E-06
Cáncer del SNC													
SF-268		2,57E-06	1,06E-08	-100	45	41	126	44	41	45	-100	1,06E-08	5,69E-06
SF-295		3,25E-06	1,17E-06	-69	49	94	97	97	94	49	-69	1,17E-06	8,64 E-06
SF-539		3,29E-06	8,91E-07	-59	42	97	108	87	97	42	-59	8,91E-07	1,04E-05
SNB-75		3,80E-06	1,79E-06	-79	73	96	108	97	96	73	-79	1,79E-06	8,08E-06
U251		8,51E-07	2,63E-07	-100	-17	81	91	86	81	-17	-100	2,63E-07	3,16E-06
Melanoma													
LOX IMVI		1,32E-07	2,90E-08	-100	-88	2	93	77	2	-88	-100	2,90E-08	4,73E-07
MALMI-3M		2,78E-06	1,26E-06	-96	50	132	110	90	132	50	-96	1,26E-06	6,12E-06
SK-MEL-2		5,63E-07	2,06E-07	-100	-40	74	-	87	74	-40	-100	2,06E-07	1,85E-06
SK-MEL-28		1,86E-06	4,60E-07	-100	20	88	-	94	88	20	-100	4,60E-07	4,84E-06
SK-MEL-5		4,07E-06	2,22E-06	-93	96	101	102	97	101	96	-93	2,22E-06	7,46E-06
UACC-257		5,83E-06	1,42E-06	-27	54	94	99	97	94	54	-27	1,42E-06	>1,26E-05
UACC-62		2,27E-06	6,60E-07	-98	34	92	101	95	92	34	-98	6,60E-07	5,43E-06
Cáncer de ovario													
IGROVI		6,62E-06	2,67E-06	-36	91	103	115	98	103	91	-36	2,67E-06	>1,26E-05
OVCAR-3		2,36E-06	7,76E-07	-99	37	97	90	98	97	37	-99	7,76E-07	5,49E-06
OVCAR-5		7,53E-06	2,83E-06	-26	91	105	102	104	105	91	-26	2,83E-06	>1,26E-05
OVCAR-8		3,21E-06	1,62E-06	-100	68	107	109	88	107	68	-100	1,62E-06	6,36E-06
SK-OV-3		5,27E-06	2,25E-06	-51	84	99	98	96	99	84	-51	2,25E-06	1,23E-05
Cáncer renal													
786-0		2,77E-06	1,30E-06	-100	52	113	100	116	113	52	-100	1,30E-06	5,91 E-06
A498		4,85E-06	1,94E-06	-52	73	114	112	103	114	73	-52	1,94E-06	1,22E-05
CAKI-1		2,43E-06	8,22E-07	-88	35	117	93	128	117	35	-88	8,22E-07	6,22E-06
RXF 393		2,96E-06	1,34E-06	-91	54	116	86	84	116	54	-91	1,34E-06	6,54E-06

	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
S12C													
TK-10													
Cáncer de próstata													
DU-145													
Cáncer de mama													
MCF7													
NCI/ADR-RIS													
MDA-MB-231/A													
TCC													
HS 578T													
MDA-MB-435													
MDA-N													
BT-549													
T-47D													

ES 2 313 201 T3

En el segundo conjunto de pruebas, según la tabla 2, las curvas de respuesta a la dosis, y el gráfico de las medias tal como se muestran en la figura 3A a 3I, y la figura 4, el trióxido de arsénico era eficaz para reducir el crecimiento celular contra todas las líneas celulares sometidas a prueba. Los resultados eran compatibles con los obtenidos a partir del primer conjunto de pruebas. En particular, varias líneas de células de melanoma parecen ser especialmente sensibles a los diversos parámetros de respuesta principales.

En conclusión, estos resultados demuestran que el trióxido de arsénico es eficaz para inhibir el crecimiento de células leucémicas y células de cáncer *in vitro*, y que el trióxido de arsénico puede usarse en sujetos humanos para tratar una amplia gama de leucemia y cánceres, incluyendo, pero sin limitarse a cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer del sistema nervioso central, melanoma, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata y cáncer de mama.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de trióxido de arsénico en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor del sistema nervioso central seleccionado del grupo constituido por neuroblastoma, retinoblastoma, glioblastoma y oligodendroglioma.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que el trióxido de arsénico se formula como una disolución iónica.

10 3. Uso según la reivindicación 1, en el que el trióxido de arsénico está en una forma adaptada para la administración de desde aproximadamente 10 μ g hasta aproximadamente 200 mg por día.

4. Uso según la reivindicación 1, en el que el trióxido de arsénico está en una forma adaptada para la administración de desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 70 mg por día.

15 5. Uso según la reivindicación 1, en el que el trióxido de arsénico está en una forma adaptada para la administración parenteral.

20 6. Uso según la reivindicación 1, en el que el trióxido de arsénico está en una forma adaptada para la administración intravenosa.

7. Uso según la reivindicación 6, en el que el trióxido de arsénico está en una forma adaptada para la administración de desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 150 mg por día.

25 8. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento comprende adicionalmente una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional.

9. Uso según la reivindicación 8, en el que el agente terapéutico adicional es un agente quimioterápico.

30 10. Uso según la reivindicación 8, en el que el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo constituido por etopósido, cisplatino, carboplatino, estramustina fosfato, vinblastina, metotrexato, hidroxurea, ciclofosfamida, doxorubicina, 5-fluorouracilo, taxol, dietilestilbestrol, VM-26(vumon), BCNU, ácido todo trans retinoico, procarbazina, citocinas, vacunas terapéuticas e inmunomoduladores.

35

40

45

50

55

60

65

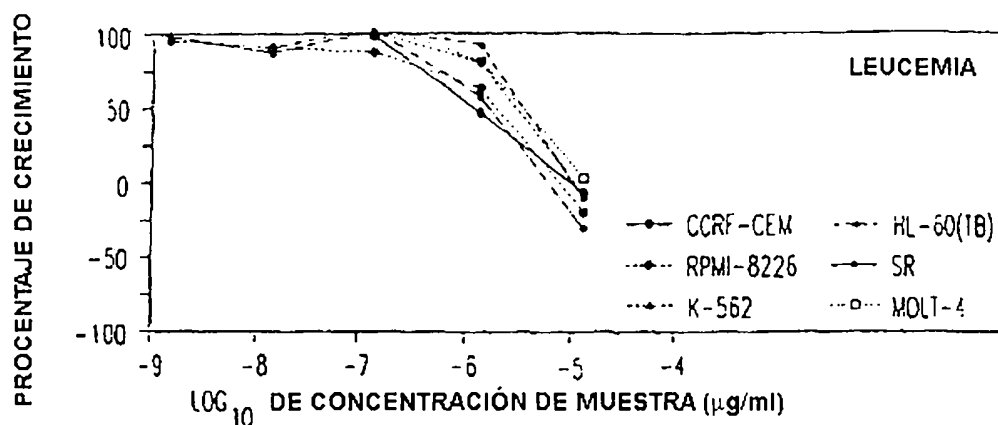


FIG.1A

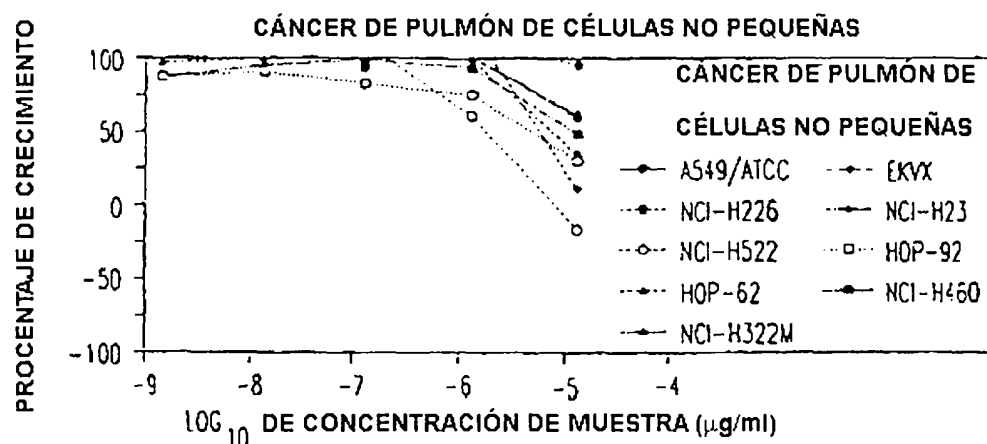


FIG.1B

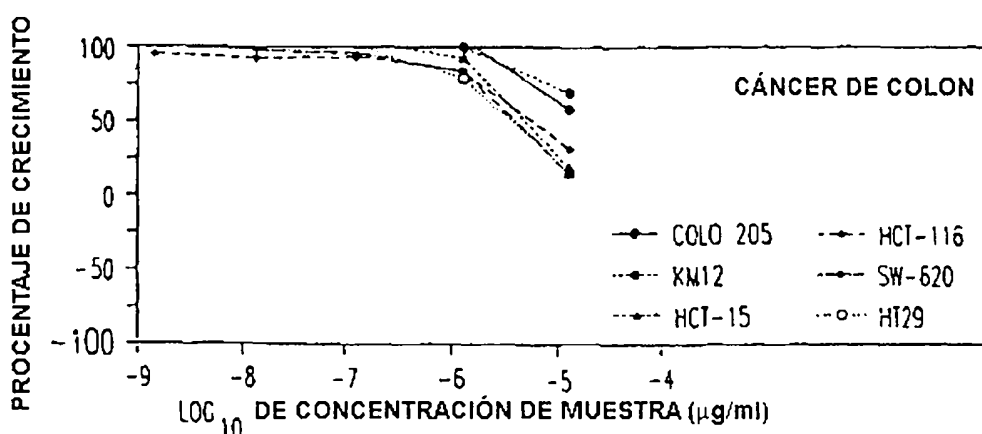


FIG.1C

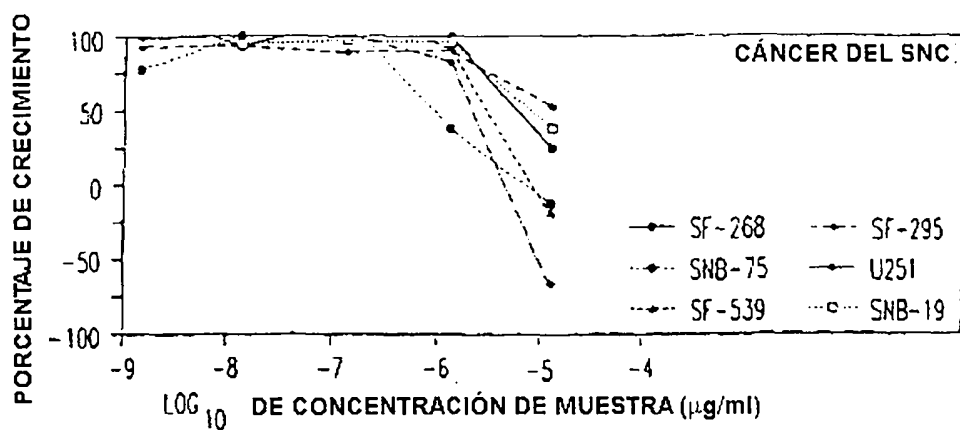


FIG.1D

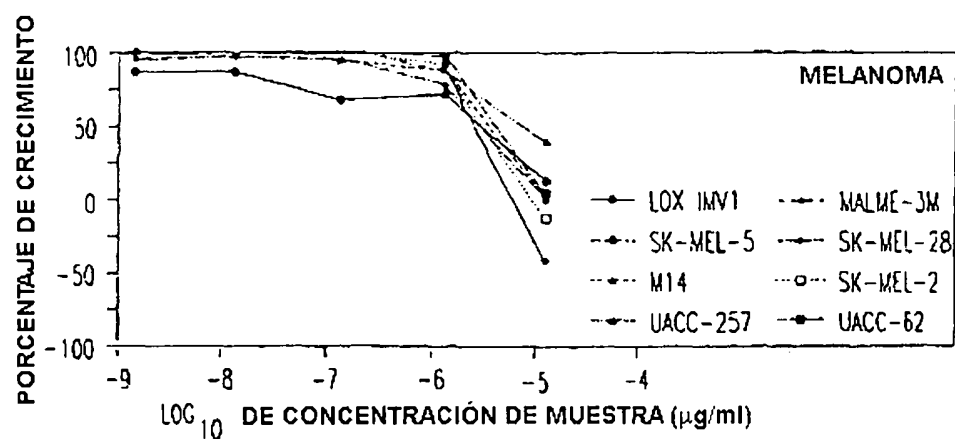


FIG.1E

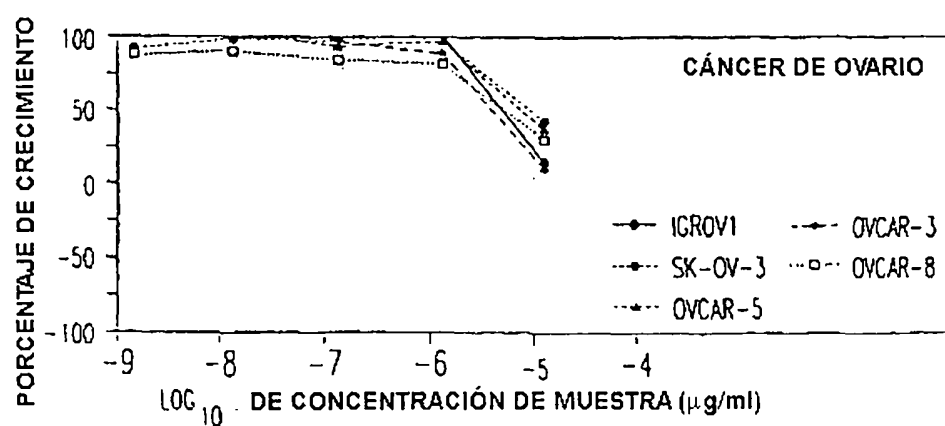


FIG.1F

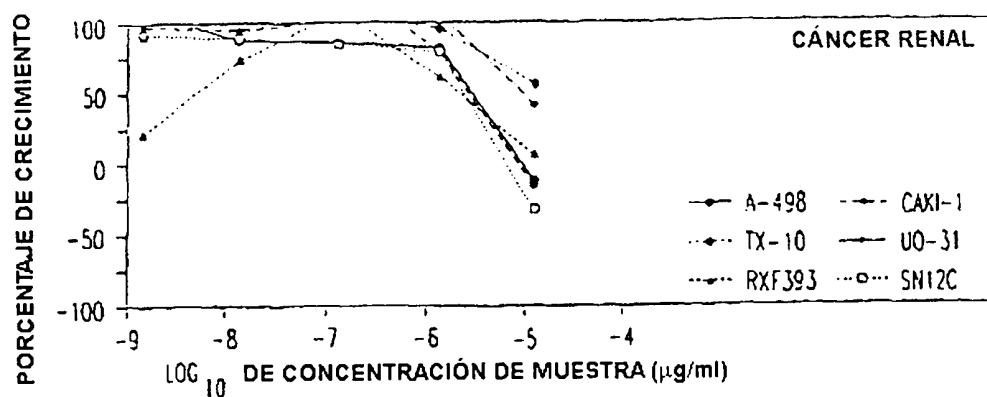


FIG.1G

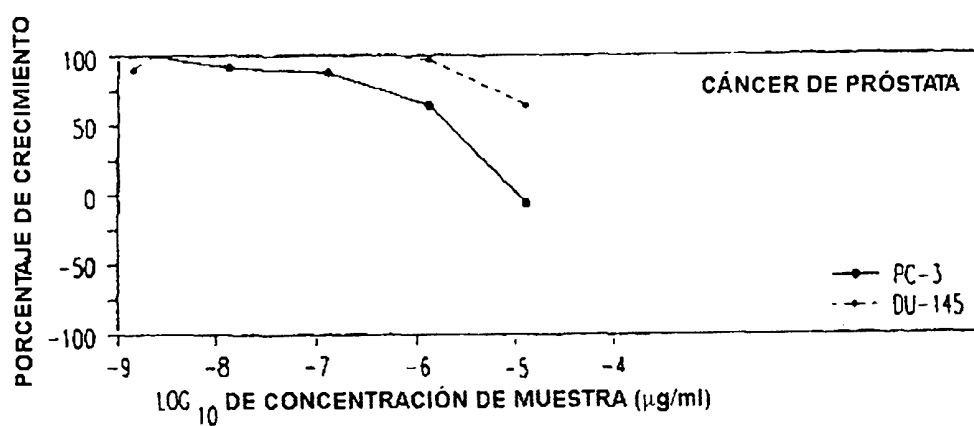


FIG.1H

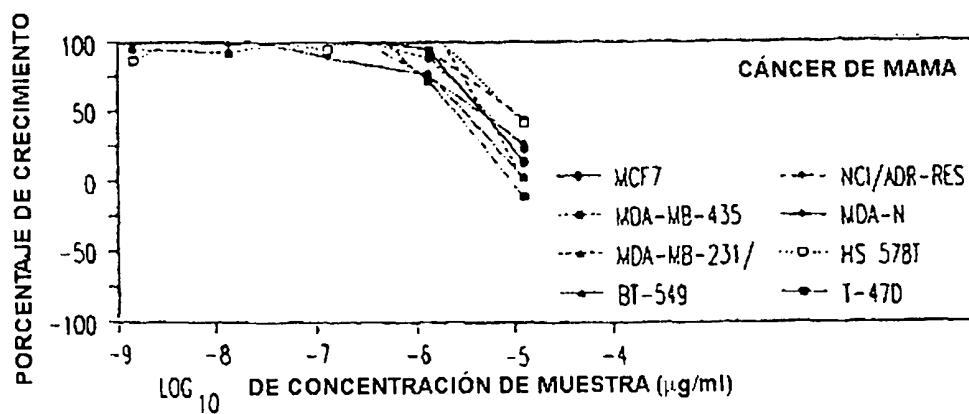


FIG.1I

PANEL/LÍNEA CELULAR	LOG ₁₀ IC ₅₀	IC ₅₀	LOG ₁₀ ICT	ICT	LOG ₁₀ CL ₅₀	CL ₅₀
LEUCEMIA						
CCRF - CHM	-5.95		-5.00		> -4.90	
HL-60(13)	-5.50		-4.99		> -4.90	
K-562	-5.58		-4.96		> -4.90	
MOLT-4	-5.53		> -4.90		> -4.90	
RPMI-8226	-5.73		-5.14		> -4.90	
SR	-5.79		-5.23		> -4.90	
CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS						
A549/A1CC	> -4.90		> -4.90		> -4.90	
ERYX	-5.23		> -4.90		> -4.90	
HOP-62	-5.14		> -4.90		> -4.90	
HOP-92	-5.35		> -4.90		> -4.90	
NCI-H226	> -4.90		> -4.90		> -4.90	
NCI-H23	> -4.90		> -4.90		> -4.90	
NCI-H322M	> -4.90		> -4.90		> -4.90	
NCI-H460	-4.92		> -4.90		> -4.90	
NCI-H522	-5.75		-5.15		> -4.90	
CÁNCER DE COLON						
COLO 205	> -4.90		> -4.90		> -4.90	
HCT-116	-5.26		> -4.90		> -4.90	
HCT-15	-5.31		> -4.90		> -4.90	
H729	-5.44		> -4.90		> -4.90	
KM12	> -4.90		> -4.90		> -4.90	
SW-620	-5.39		> -4.90		> -4.90	

CONTINÚA EN LA FIG.2B

FIG. 2A

CONTINÚA DE LA FIG.2A

GRÁFICOS DE LAS MEDIAS

PANEL/LÍNEA CELULAR	LOG ₁₀	IC50	LOG ₁₀ ICT	ICT	LOG ₁₀ CL50	CL50
CÁNCER DEL SNC						
SF-268	-5,25		> -4,90		> -4,90	
SF-295	> -4,90		> -4,90		> -4,90	
SF-539	-5,51		-5,05		> -4,90	
SNB-19	-5,13		> -4,90		> -4,90	
SNB-75	-6,07		-5,16		> -4,90	
U251	-5,69		-5,36		-5,02	
MELANOMA						
LOX IMVI	-5,52		> -4,90		> -4,90	
MA1ME-3M	-5,60		-5,22		> -4,90	
M14	-5,46		> -4,90		> -4,90	
SK-MEL-2	-5,52		-5,06		> -4,90	
SK-MEL-28	-5,40		> -4,90		> -4,90	
SK-MEL-5	-5,54		> -4,90		> -4,90	
UACC-257	-5,11		> -4,90		> -4,90	
UACC-62	-5,39		> -4,90		> -4,90	
CÁNCER DE OVARIO						
IGROV1	-5,28		> -4,90		> -4,90	
OVCAR-3	-5,39		> -4,90		> -4,90	
OVCAR-5	-5,15		> -4,90		> -4,90	
OVCAR-8	-5,33		> -4,90		> -4,90	
SK-OV-3	-5,07		> -4,90		> -4,90	

CONTINÚA EN LA FIG.2C

FIG.2B

CONTINUÍA DE LA FIG.2B

GRÁFICOS DE LAS MEDIAS

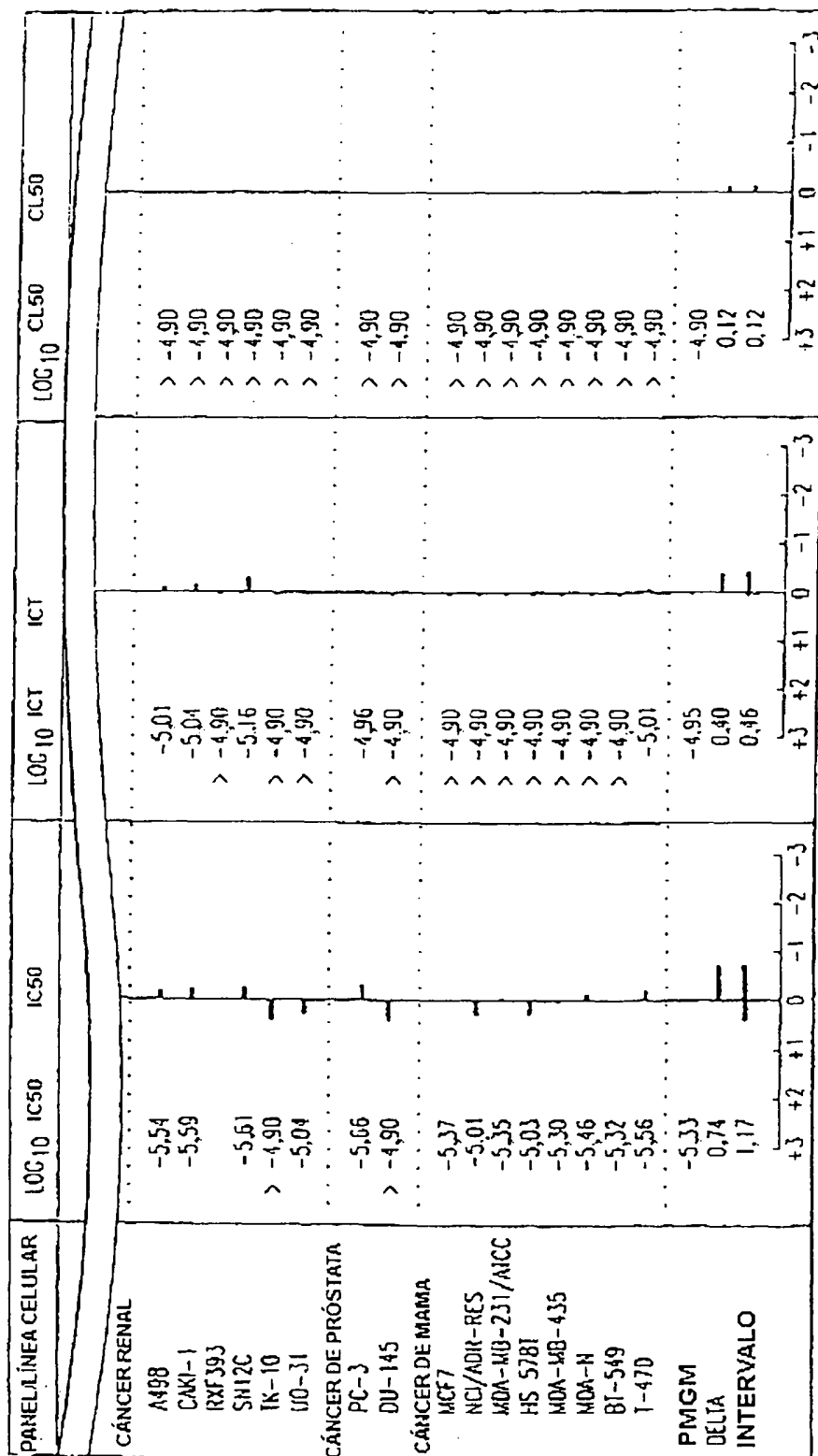


FIG.2C

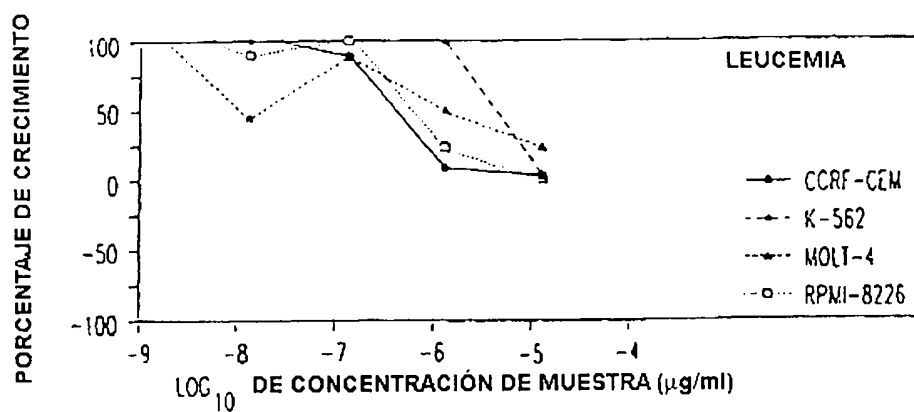


FIG.3A

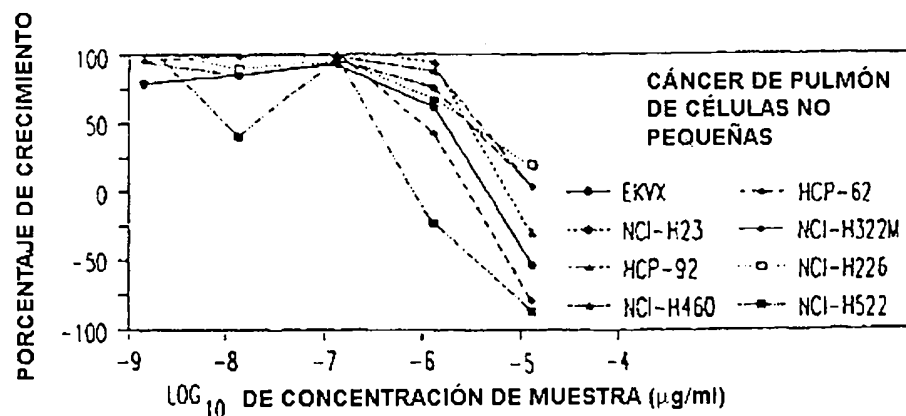


FIG.3B

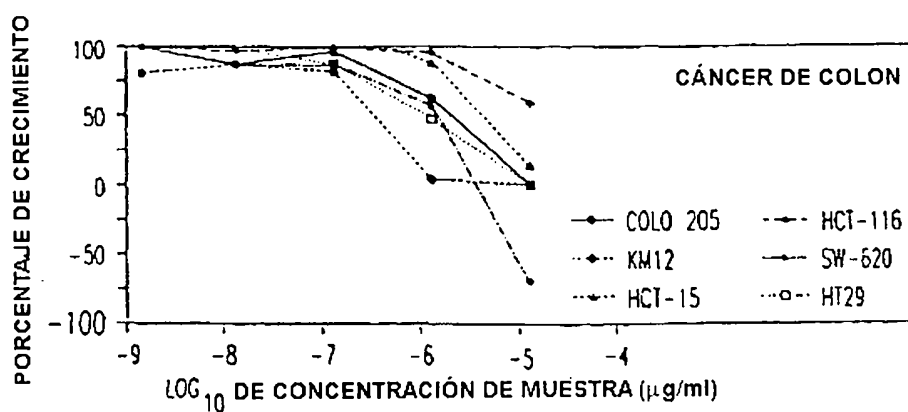


FIG.3C

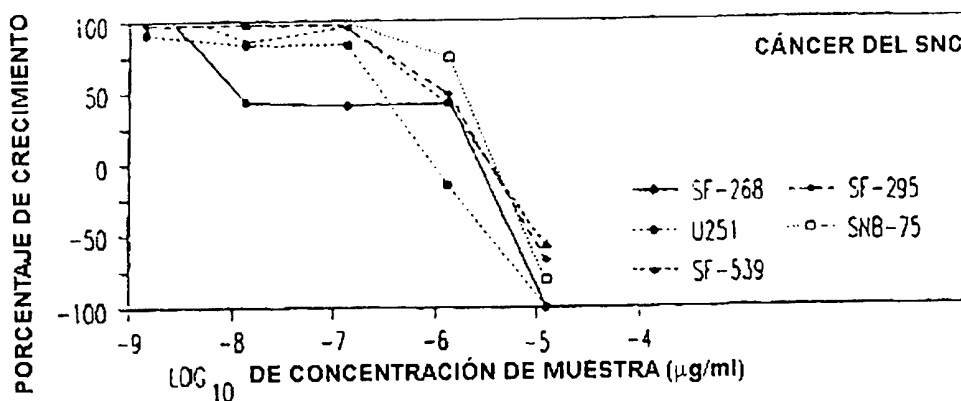


FIG.3D

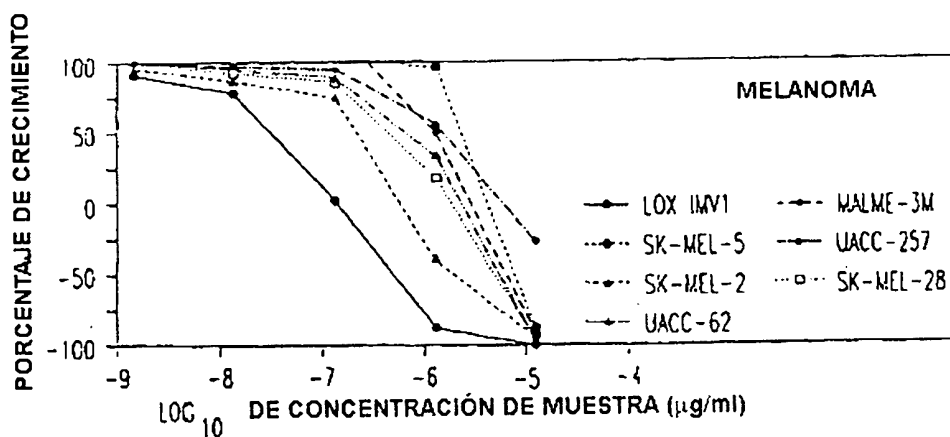


FIG.3E

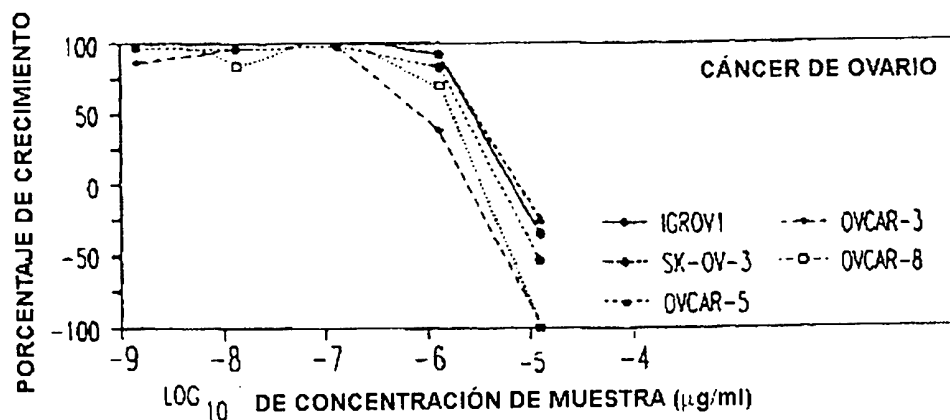


FIG.3F

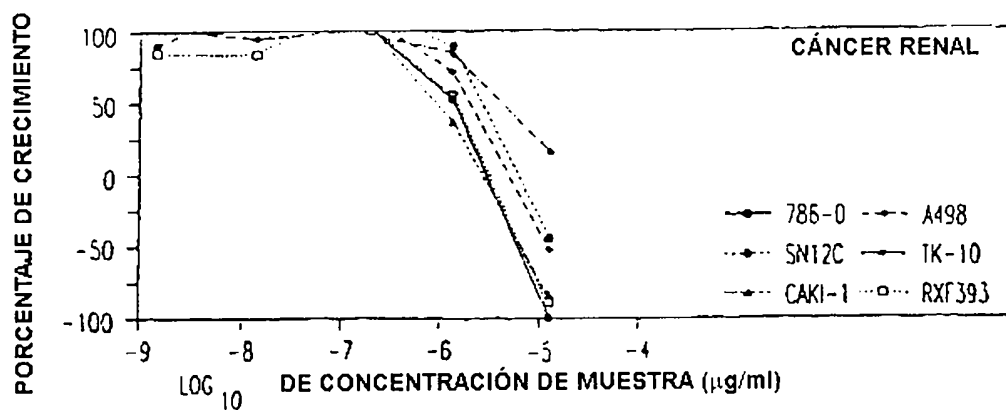


FIG.3G

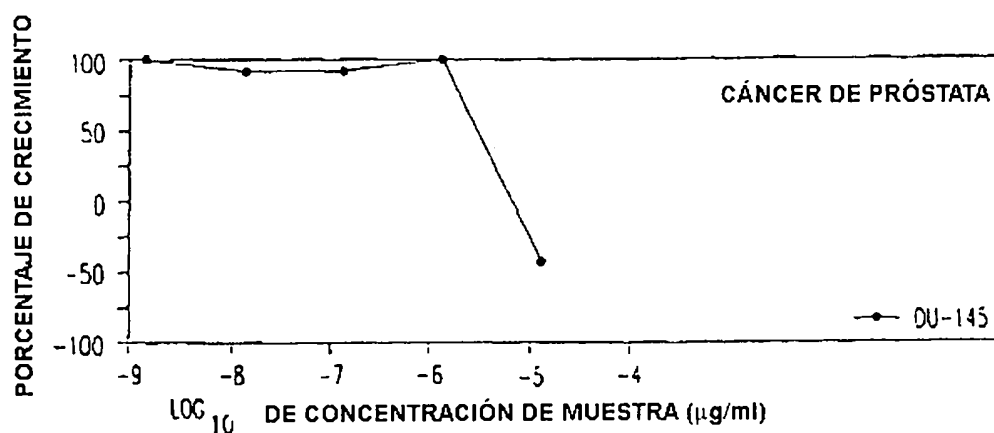


FIG.3H

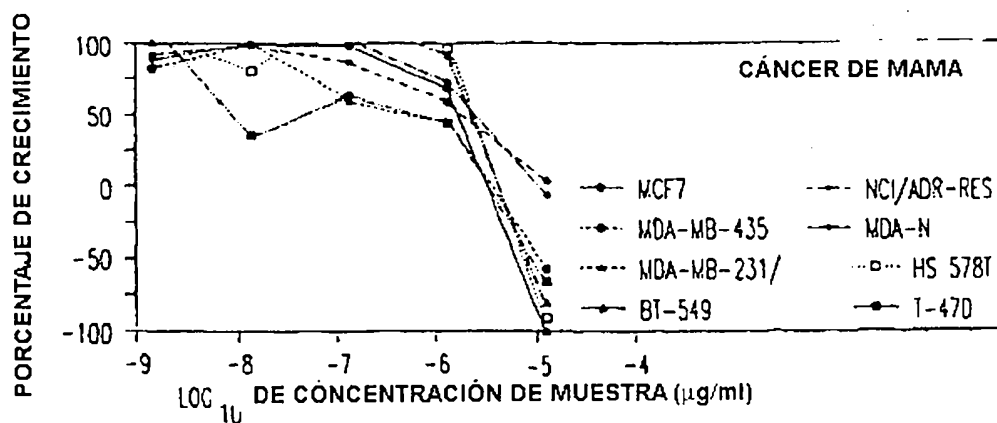
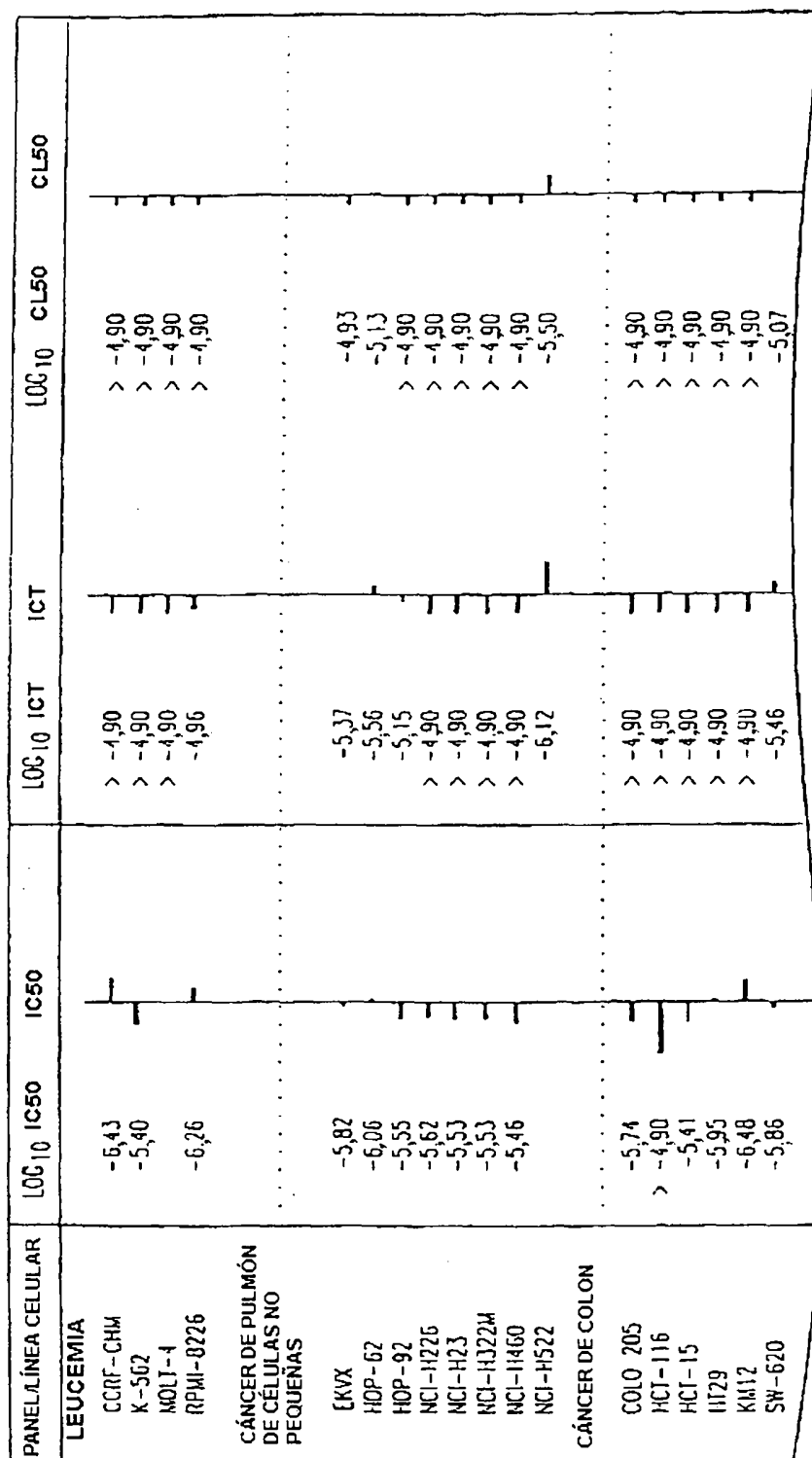


FIG.3I

GRÁFICOS DE LAS MEDIAS

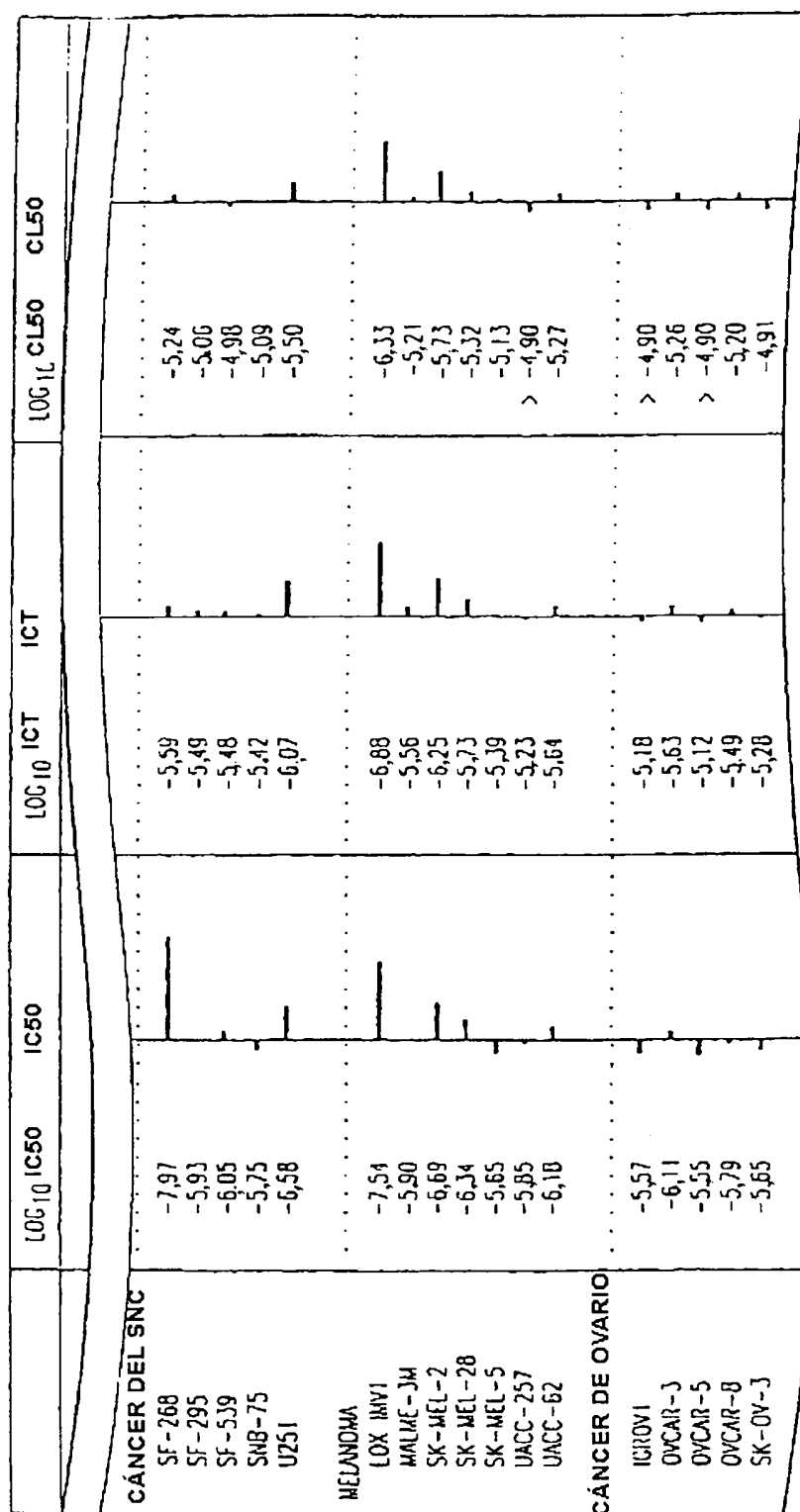


CONTINUÁ EN LA FIG.4B

FIG.4A

CONTINÚA DE LA FIG.4A

GRÁFICOS DE LAS MEDIAS



CONTINÚA EN LA FIG.4C

FIG.4B

CONTINÚA DE LA FIG.4B

GRÁFICOS DE LAS MEDIAS

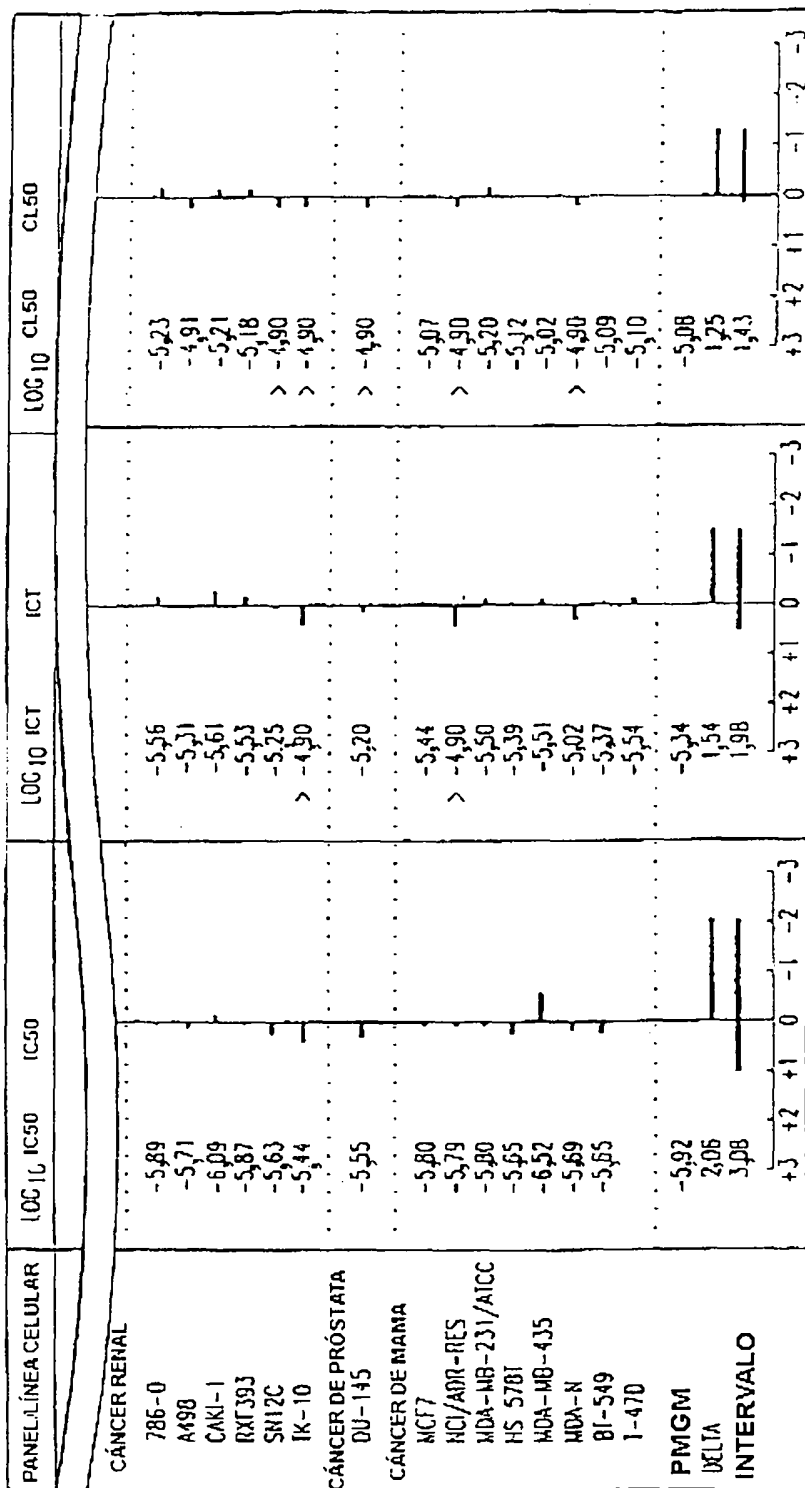


FIG.4C