

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 640**

51 Int. Cl.:

A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/7072 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07J 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2009 E 09718009 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2251014**

54 Título: **Combinaciones de un agente anticanceroso y un derivado del colestanol**

30 Prioridad:

05.03.2008 JP 2008055284

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

13.01.2014

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)
2-9, Kanda-Tsukasamachi Chiyoda-ku
Tokyo 101-8535, JP y
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA
UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YAZAWA, SHIN;
NISHIMURA, TOYO y
ASAO, TAKAYUKI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 437 640 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinaciones de un agente anticanceroso y un derivado del colestanol

5 La presente invención se relaciona con un agente quimioterapéutico para el cáncer (al que en adelante se hará aquí referencia como un "agente quimioterapéutico para el cáncer"), y, más en particular, con un agente quimioterapéutico para el cáncer que emplea un derivado de colestanol y un agente anticanceroso en combinación.

Técnica anterior

10 Se conoce la actividad anticancerosa de azúcar-colestanoles químicamente sintetizados por Faried A. *et al.*, Cancer Science, 2007, 98(9), 1358-1367.

15 Se han desarrollado hasta la fecha una variedad de agentes anticancerosos utilizados en la quimioterapia para el cáncer, que es un modo de terapia contra el cáncer, y se clasifican en base a la estructura, el mecanismo de acción, etc. Sin embargo, la eficacia de dichos agentes anticancerosos empleados como un único agente no es satisfactoria. En lugar de ello, se ha llevado predominantemente a cabo en los últimos años una terapia con múltiples fármacos que emplea una pluralidad de agentes anticancerosos desde el punto de vista de la supresión de los efectos colaterales adversos, y se ha reconocido la eficacia de la terapia con múltiples fármacos.

20 En tales circunstancias, se desea tanto el desarrollo de una nueva quimioterapia de combinación contra el cáncer, que tenga menos efectos colaterales adversos y una mayor eficacia que las quimioterapias convencionales, como el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos para uso en la quimioterapia.

25 Mientras tanto, se vio previamente que un derivado de colestanol, en el que se une una cadena de azúcar, tal como GlcNAc-Gal-, GlcNAc-Gal-Glc-, Fuc-Gal-, Gal-Glc-, Gal- o GlcNAc- al colestanol (el compuesto en el que el doble enlace del anillo B del colesterol está saturado), tenía una excelente actividad antitumoral (Documentos de patente 1 a 4).

30 Sin embargo, no se han referido casos en los que se hayan empleado en combinación los derivados de colestanol antes mencionados y otro agente anticanceroso.

[Documento de patente 1] JP-A-2000-191685

[Documento de patente 2] JP-A-1999-60592

35 [Documento de patente 3] WO 2005/007172 (folleto)

[Documento de patente 4] WO 2007/026869 (folleto)

Descripción de la invención**40 Problemas que la invención ha de resolver**

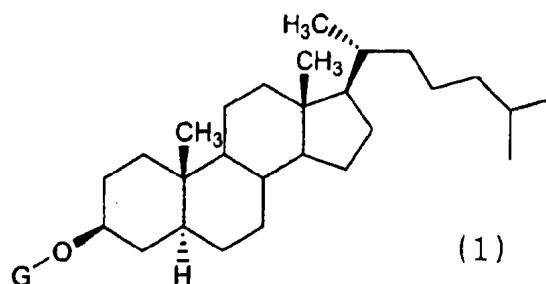
Así, la presente invención se dirige a la provisión de un agente quimioterapéutico para el cáncer que tiene menos efectos colaterales y una excelente eficacia.

45 Medios para resolver los problemas

50 A la vista de lo que antecede, los presentes inventores han realizado estudios exhaustivos y han visto que se puede alcanzar un efecto anticanceroso notablemente potenciado empleando, en combinación, un derivado de colestanol representado por la fórmula (1) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo y un agente quimioterapéutico conocido (agente anticanceroso), y, por lo tanto, el uso combinado de estos agentes farmacéuticos en la quimioterapia del cáncer es de gran utilidad.

Por consiguiente, la presente invención se dirige a los siguientes puntos (1) a (10).

55 (1) Un agente quimioterapéutico para el cáncer que incluye, en combinación, un derivado de colestanol representado por la fórmula (1):



(donde G representa GlcNAc-Gal- o GlcNAc-) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo y un agente anticanceroso.

5 (2) Un agente quimioterapéutico para el cáncer según el punto (1) anterior, donde el agente anticanceroso es una o más especies seleccionadas entre el grupo consistente en un agente anticanceroso de complejo de platino.

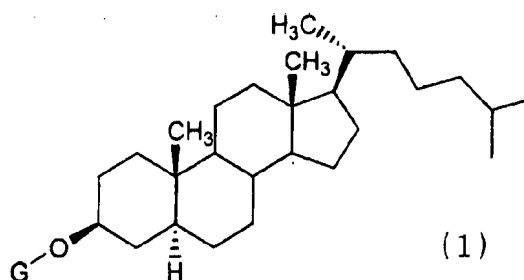
(3) Un agente quimioterapéutico para el cáncer según el punto (2) anterior, donde el agente anticanceroso es una o más especies seleccionadas entre el grupo consistente en cisplatina y oxaliplatina.

10 (4) Un agente quimioterapéutico para el cáncer según cualquiera de los puntos (1) a (3) anteriores, que es un agente compuesto.

(5) Un agente quimioterapéutico para el cáncer según cualquiera de los puntos (1) a (3) anteriores, que está en forma de un kit que incluye un fármaco que contiene un derivado de colestanol y un fármaco que contiene un agente anticanceroso.

15 (6) Un agente quimioterapéutico para el cáncer según el punto (5) anterior, donde el fármaco que contiene un derivado de colestanol es una formulación liposómica.

(7) Uso, en combinación, de un derivado de colestanol representado por la fórmula (1):



20 (donde G representa GlcNAc-Gal- o GlcNAc-) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo y un agente anticanceroso para producir un agente quimioterapéutico para el cáncer.

25 Efectos de la invención

Mediante el empleo del agente quimioterapéutico para el cáncer y de la quimioterapia para el cáncer según la presente invención, se pueden realizar la prevención y el tratamiento del cáncer con seguridad y con una mayor eficacia.

30 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra los efectos inhibitorios de la proliferación celular de CDDP, GC-CD y CDDP + GC-CD sobre células colon26.

35 La Fig. 2 es un gráfico que muestra los efectos inhibitorios de la proliferación celular de CDDP, GC-CD y CDDP + GC-CD sobre células MKN45, células NCIH226 o células colo201.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra los efectos inhibitorios de la proliferación celular de CDDP, GGC-CD y CDDP + GGC-CD sobre células colon26, células MKN45, células NCIH226 o células colo201.

40 La Fig. 4 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral de la administración única de CDDP, GC-CD y CDDP + GC-CD contra la diseminación peritoneal causada por células colon26 inoculadas intraperitonealmente en ratones.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral de la administración múltiple de CDDP, GC-CD y CDDP + GC-CD contra la diseminación peritoneal causada por células colon26 inoculadas intraperitonealmente en ratones.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral de la administración única retardada de CDDP, GC-CD y CDDP + GC-CD contra la diseminación peritoneal causada por células colon26 inoculadas intraperitonealmente en ratones, tras confirmar la diseminación peritoneal en el mesotelio de los ratones.

5 La Fig. 7 es un gráfico que muestra la tasa de supervivencia de ratones a los que se inocularon intraperitonealmente células colon26, tras administración única de CDDP, GC-CD o CDDP + GC-CD (administración única de CDDP y administración doble de GC-CD, respectivamente).

La Fig. 8 es un gráfico que muestra el efecto supresor o reductor del crecimiento tumoral cuando se inocularon células colon26 subcutáneamente en ratones tras administración única de CDDP, GGC-CD o CDDP + GGC-CD.

10 La Fig. 9 es un gráfico que muestra el efecto inhibitorio de la metástasis de células colon26 al pulmón tras administración única de CDDP, GC-CD, GGC-CD, CDDP + GC-CD y CDDP + GGC-CD.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

15 Los derivados específicos de colestanol representados por la fórmula (1) y empleados en la presente invención son todos compuestos conocidos.

Entre los derivados de colestanol representados por la fórmula (1) y en los que G es GlcNAc-Gal-, G es preferiblemente GlcNAc β 1,3-Gal β - o GlcNAc β 1,4-Gal β -. Entre los derivados de colestanol (1) en los que G es GlcNAc-, G es preferiblemente GlcNAc β -.

20

De éstos, son esenciales las especies en las que G es GlcNAc-Gal- y GlcNAc-, siendo más preferidas aquéllas en las que G es GlcNAc β 1,4-Gal β - y GlcNAc β -.

25 Se pueden producir los derivados de colestanol antes mencionados mediante un método, por ejemplo, descrito en los Documentos de patente antes mencionados 1 a 4 o un método similar.

El derivado de colestanol representado por (1) forma fácilmente un complejo de inclusión con una ciclodextrina o un derivado de la misma. Así, el derivado de colestanol empleado en la presente invención puede ser un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo. En la formación de dichos compuestos de inclusión, se tienen que considerar el tamaño de la molécula huésped que se ha de incluir, la interacción de Van der Waals entre la molécula huésped y la ciclodextrina y el enlace de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la ciclodextrina y la molécula huésped. Por lo tanto, los compuestos huésped insolubles no siempre forman los correspondientes compuestos de inclusión. Sin embargo, el derivado de colestanol de la presente invención puede formar buenos complejos de inclusión con ciclodextrina.

30

35

Como ejemplos de la ciclodextrina que forma el compuesto de inclusión de ciclodextrina de la presente invención, se incluyen ciclodextrinas tales como α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, y derivados de ciclodextrina tales como metil- β -ciclodextrina, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, monoacetil- β -ciclodextrina y 2-hidroxipropil- γ -ciclodextrina. De éstos, se prefiere la 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina para obtener una mayor solubilidad.

40

Se puede preparar el compuesto de inclusión de ciclodextrina, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento: se prepara una solución acuosa de una ciclodextrina o un derivado de la misma que tiene una concentración apropiada (v.g., del 20 al 40%) y se añade el derivado de colestanol de la presente invención a la solución acuosa, seguido de agitación de la mezcla resultante.

45

No se impone ninguna limitación particular sobre la concentración de la solución del derivado de colestanol (1), en la medida en que el derivado de colestanol pueda formar un compuesto de inclusión con ciclodextrina. En general, la concentración es de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 50% en masa, preferiblemente de aproximadamente un 10 a aproximadamente un 30% en masa.

50

El compuesto de inclusión de ciclodextrina así producido es altamente hidrosoluble y, por lo tanto, exhibe de manera efectiva el efecto del huésped *in vivo*. Otra ventaja del compuesto de inclusión de ciclodextrina es asegurar resultados de ensayo consistentes *in vitro*.

55

Alternativamente, se puede preparar el derivado de colestanol (1) en una formulación liposómica, mediante la cual se puede suministrar con mayor efectividad el derivado de colestanol al sitio de expresión de la acción. Otra ventaja del compuesto de inclusión de ciclodextrina es asegurar resultados de ensayo consistentes *in vitro*.

60 Preferiblemente, la formulación liposómica incluye el derivado de colestanol de la presente invención, un componente de membrana y una amina alifática o aromática.

El contenido en derivado de colestanol en la formulación liposómica es preferiblemente de 0,3 a 2,0 moles, más

preferiblemente de 0,8 a 1,5 moles, con respecto a 1 mol del componente de membrana.

El componente de membrana puede ser un fosfolípido. Como ejemplos específicos de fosfolípidos preferiblemente empleados, se incluyen fosfolípidos naturales y sintéticos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico, sus mezclas y fosfolípidos naturales modificados, tales como lecitina acuosa. Como ejemplo de especies más preferidas, se incluye la fosfatidilcolina (1 α -dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)).

La amina alifática o aromática es principalmente empleada para cargar positivamente la superficie de la membrana lipídica. Como ejemplos de tales aminas, se incluyen aminas alifáticas, tales como la estearilamina y la oleilamina, y aminas aromáticas, tales como la fluorenilamina. Entre ellas, se emplea preferiblemente de un modo particular la estearilamina.

Preferiblemente, la amina está contenida en una cantidad de 0,04 a 0,15 moles, más preferiblemente de 0,1 a 0,15 moles, con respecto a 1 mol de componente de membrana (fosfolípido).

Además de los componentes antes mencionados, si es necesario, el liposoma puede contener también un estabilizador de la estructura de la membrana, tal como colesterol ácido graso o fosfato de diacetilo.

La solución acuosa empleada para dispersar el componente de membrana es preferiblemente agua, suero fisiológico, tampón, una solución acuosa de azúcar o una mezcla de éstos. Se puede usar un tampón orgánico o inorgánico, en la medida en que el tampón tenga una acción tamponante en la proximidad de la concentración de iones hidrógeno de los fluidos corporales. Como ejemplo de tales tampones, se incluye un tampón fosfato.

No se impone ninguna limitación particular sobre el método de preparación de la formulación liposómica, y se pueden seleccionar métodos generalmente empleados. Como ejemplos del método empleable, se incluyen los métodos descritos en JP-A-1982-82310, JP-A-1985-12127, JP-A-1985-58915, JP-A-1989-117824, JP-A-1989-167218, JP-A-1992-29925 y JP-A-1997-87168; un método descrito en *Methods of Biochemical Analysis* (1988) 33, p. 337; o un método descrito en "Liposome" (publicado por Nankodo).

No se impone ninguna limitación particular sobre el agente anticanceroso que se utiliza en combinación con el derivado de colestanol representado por la fórmula (1) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo, y se pueden usar agentes quimioterapéuticos contra el cáncer conocidos. Se emplean preferiblemente agentes terapéuticos estándar que han sido establecidos con respecto al objetivo de la terapia del cáncer.

Como ejemplos específicos, se incluyen agentes alquilantes, tales como ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-PAM), busulfán y carboquiona; antagonistas metabólicos, tales como 6-mercaptopurina (6-MP), metotrexato (MTX), 5-fluorouracilo (5-FU), tegafur, enocitabina (BHAC) y antagonistas metabólicos del ácido fólico (compuestos de pemetrexed (Alimta, MTA)); antibióticos carcinostáticos, tales como actinomicina D, daunorrubicina, bleomicina, peplomycin, mitomicina C, aclarrubicina y neocarzinostatina (NCS); alcaloides vegetales, tales como vincristina, vindesina, vinblastina y agentes anticancerosos de taxano (Taxotere (Docetaxel) y Taxol (Paclitaxel, TXL)); y compuestos de platino, tales como cisplatina (CDDP), carboplatina y oxaliplatina (L-OHP). Estos agentes anticancerosos pueden ser usados solos o en combinación de dos o más especies.

Tal como se muestra en los Ejemplos que se describen aquí más adelante, cuando se usa el derivado de colestanol representado por la fórmula (1) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo en combinación con un agente anticanceroso, la proliferación de las células cancerosas de diversos tipos sufre una fuerte supresión, en comparación con el caso de la administración única de cada agente. Por lo tanto, esta quimioterapia combinada puede aumentar drásticamente la eficacia terapéutica y la mitigación de los efectos colaterales adversos, y un producto farmacéutico que contenga estos ingredientes es un agente quimioterapéutico útil para el cáncer.

No se impone ninguna limitación particular sobre el cáncer que puede ser eficazmente tratado mediante la administración del agente quimioterapéutico para el cáncer de la presente invención. Como ejemplos del cáncer diana, se incluyen tumores malignos, tales como el cáncer gástrico, el cáncer del intestino grueso, el cáncer pancreático, el cáncer de útero, el cáncer de ovario, el cáncer de pulmón, el cáncer de la vesícula biliar, el cáncer esofágico, el cáncer de hígado, el cáncer de mama, el mesotelioma y el cáncer prostático.

La forma del agente quimioterapéutico para el cáncer de la presente invención puede ser un agente compuesto en el que se mezclan los ingredientes antes mencionados en una proporción apropiada, cada uno de ellos en una cantidad efectiva, para formar una sola forma de dosificación (tipo de formulación única), o puede ser un kit que consiste en la forma de dosificación respectiva de los ingredientes antes mencionados, cada uno de los cuales se forma independientemente con cada cantidad efectiva, y que permite la administración de las formas de dosificación simultáneamente o por separado a intervalos (tipo de formulación doble).

De forma similar a las formulaciones farmacéuticas generales, no se impone ninguna limitación particular sobre la forma de dosificación de la formulación antes descrita, y la forma puede ser cualquier forma sólida, tal como una tableta, cualquier forma líquida, tal como una inyección, un polvo seco que se disuelve antes de su uso, etc.

5 No se impone ninguna limitación particular sobre la vía de administración de la formulación, y se puede determinar la vía apropiada dependiendo de la forma de dosificación de los agentes. Por ejemplo, se puede administrar una solución para inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica o intraperitonealmente, y se puede administrar una forma sólida oral o enteralmente.

10 Se puede preparar la formulación por un método conocido en la técnica. Se pueden emplear también todos los soportes farmacéuticamente aceptables (excipientes o diluyentes, tales como un rellenanante, un agente para dar volumen y un ligante) generalmente empleados en la técnica. Por ejemplo, se puede preparar una forma sólida peroral mezclando los ingredientes de fármacos de la presente invención con un excipiente y con un ligante, desintegrante, lubricante, colorante, agente saborizante, desodorante, etc. eventual, y dando forma a la mezcla de
 15 tabletas, tabletas revestidas, gránulos, polvo, cápsulas, etc. por un método conocido en la técnica. Estos aditivos pueden ser los generalmente empleados en la técnica. Como ejemplos del excipiente, se incluyen lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa microcristalina y ácido silícico. Como ejemplos del ligante, se incluyen agua, etanol, propanol, jarabe simple, glucosa líquida, almidón líquido, gelatina líquida, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilalmidón, metilcelulosa, etilcelulosa, goma laca, fosfato de calcio y polivinilpirrolidona. Como ejemplos del desintegrante, se incluyen almidón seco, alginato de sodio,
 20 polvo de agar, hidrógeno carbonato de sodio, carbonato de calcio, laurilsulfato de sodio, estearato de monoglicerilo y lactosa. Como ejemplos del lubricante, se incluyen talco purificado, sales estearato, bórax y polietilenglicol. Como ejemplos del agente saborizante, se incluyen sacarosa, piel de naranja, ácido cítrico y ácido tartárico.

25 Se puede preparar una formulación líquida oral mezclando los ingredientes de fármacos de la presente invención con un agente saborizante, un tampón, un estabilizador, un desodorante, etc. y dando forma a la mezcla de un agente líquido interno, un jarabe, un elixir, etc. por un método conocido en la técnica. El agente saborizante empleado en la preparación puede ser cualquiera de los miembros antes mencionados. Como ejemplo del tampón, se incluye el citrato de sodio. Como ejemplos del estabilizador, se incluyen el tragacanto, la goma arábica y la
 30 gelatina.

Se pueden preparar soluciones para inyección mezclando los ingredientes de fármacos de la presente invención con aditivos, tales como un regulador del pH, un tampón, un estabilizador, un agente de tonicidad y un agente anestésico local, y dando forma a la mezcla mediante un método conocido en la técnica, para así obtener líquidos para
 35 inyección subcutánea, intramuscular e intravenosa. Como ejemplos del regulador del pH y del tampón, se incluyen el citrato de sodio, el EDTA, el ácido tioglicólico y el ácido tioláctico. Como ejemplos del anestésico local, se incluyen el clorhidrato de procaína y el clorhidrato de lidocaína. Como ejemplos del agente de tonicidad, se incluyen el cloruro de sodio y la glucosa.

40 Se pueden preparar supositorios mezclando los ingredientes de fármacos de la presente invención con un soporte para formulación conocido en la técnica, tal como polietilenglicol, lanolina, manteca de cacao y triglicéridos de ácidos grasos, y con un surfactante eventual, tal como Tween (marca registrada), y dando forma de supositorios a la mezcla mediante un método conocido en la técnica.

45 Se pueden preparar ungüentos mezclando los ingredientes de fármacos de la presente invención con aditivos eventuales generalmente empleados en la técnica, tales como una base, un estabilizador, un humectante y conservantes, y dando forma de ungüento a la mezcla mediante un método conocido en la técnica. Como ejemplos de la base, se incluyen parafina líquida, vaselina blanca, cera de abejas blanca, alcohol octildodecílico y parafina. Como ejemplos del conservante, se incluyen p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de etilo y p-
 50 hidroxibenzoato de propilo.

Se pueden preparar cataplasmas aplicando el ungüento, el gel, la crema, la pasta, etc. antes mencionados a un soporte generalmente empleado por un método de rutina. Como ejemplos de soportes apropiados, se incluyen telas tejidas y no tejidas hechas de algodón, de fibranas o de fibra química y películas y láminas de espuma hechas de
 55 cloruro de vinilo suave, polietileno o poliuretano.

En general, la formulación es preferiblemente preparada de manera que tenga un contenido en derivado de colestanol y un contenido en agente anticanceroso del 0,0001 al 80% en peso (como principio activo).

60 Cuando el agente quimioterapéutico para el cáncer de la presente invención se presenta como un kit, se puede diseñar el kit para envasar independientemente la forma de dosificación respectiva incluyendo por separado el derivado de colestanol representado por la fórmula (1) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo y un agente anticanceroso, cada uno de los cuales ha sido preparado del modo anterior, y para usarlo tomando cada

formulación farmacéutica por separado del envase respectivo correspondiente antes de su uso. Alternativamente, se puede mantener cada formulación farmacéutica en un envase adecuado para cada vez que se realice una administración combinada.

5 La dosis del agente quimioterapéutico para el cáncer de la presente invención varía según el peso corporal, la edad, el sexo, los síntomas del paciente que lo necesita, la vía y la frecuencia de administración al paciente que lo necesita, etc. En general, por ejemplo, la dosis diaria para un adulto es de aproximadamente 0,1 a 30 mg/kg como derivado de colestanol (1), preferiblemente de 3 a 10 mg/kg. La dosis del agente anticanceroso puede estar dentro de un rango establecido con respecto al agente o puede ser inferior a ese rango.

10 No se impone ninguna limitación particular sobre la frecuencia de administración, y el agente puede ser administrado una o varias veces al día. Se prefiere la administración una vez al día. Cuando se usa el kit, se pueden administrar cada una de las formulaciones que incluyen los ingredientes de fármacos por separado simultánea o intermitentemente.

15 Se describirá a continuación la presente invención con más detalle por medio de ejemplos.

Ejemplos

20 Ejemplo 1

Efecto de la adición de fármaco sobre la inhibición de la proliferación de las células cancerosas

25 Se inocularon células colon26 (derivadas de cáncer de colon de ratón) en una placa de 96 pocillos (1×10^4 células/50 μ l, medio RPMI con un 10% de FCS/pocillo) y se incubaron a 37°C durante 16 horas. Se añadieron a cada pocillo cisplatina (abreviada como "CDDP") y/o un compuesto de inclusión de ciclodextrina (abreviado como "GC-CD") de un derivado de colestanol en el que G en la fórmula (1) es GlcNAc β - (abreviado como "GC") (dilución múltiples veces con medio FCS(-): concentración final: $\leq 500 \mu$ M, 50 μ l), seguido de incubación a 37°C durante dos días. Se preparó GC-CD según el método descrito en el Ejemplo 1(2) del Documento de patente 4. Específicamente,

30 se preparó una solución acuosa al 40% de hidroxipropil- β -ciclodextrina y se añadió GC a la solución, seguido de mezcla con agitación (80°C durante 30 minutos), para preparar así GC-CD. Como control, se emplearon los pocillos a los que sólo se había añadido medio FCS(-). Se realizó el recuento viable mediante un kit de recuento celular (producto de Dojin).

35 Se calculó el índice de inhibición de la proliferación celular (IPC) (%) mediante la siguiente ecuación. La Fig. 1 muestra los resultados.

$$40 \quad \text{Índice IPC (\%)} = \left(1 - \frac{\text{DO}_{450-650} \text{ de las células tratadas}}{\text{DO}_{450-650} \text{ de las células no tratadas}} \right) \times 100$$

Ejemplo 2

Efecto de la inhibición de la proliferación de diversas células cancerosas

45 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 1, excepto por el hecho de que se cambiaron las células colon26 por MKN45 (derivadas de cáncer gástrico humano), NCIH226 (derivadas de cáncer de pulmón humano) y Colo201 (derivadas de cáncer de colon humano). Se determinó el índice IPC (%) de un modo similar. La Fig. 2 muestra los resultados.

50 En el Ejemplo 2, se usó también un compuesto de inclusión de ciclodextrina (abreviado como "GGC-CD") de un derivado de colestanol en el que G en la fórmula (1) es GlcNAc β 1, 4-Gal β - (abreviado como "GGC"). Se produjo GGC-CD de un modo similar al método de producción de GC-CD antes mencionado, excepto por cambiar el compuesto de colestanol por GGC. Se determinó el índice IPC con respecto a las células cancerosas. La Fig. 3 muestra los resultados.

55 Ejemplo 3

Efecto de la adición de fármaco sobre la inhibición de la proliferación de las células cancerosas *in vivo*

60 En los siguientes Ejemplos, se emplearon ratones Balb/c (6 semanas de edad, hembras) como animales de ensayo.

(1) Se inocularon intraperitonealmente células colon26 (1×10^4 células/ratón) a los ratones (día 0). Al día siguiente de la inoculación (día 1), se ajustaron CDDP y/o GC-CD con suero fisiológico (solución salina normal Otsuka) a la

concentración de interés y se administró intraperitonealmente CDDP, GC-CD o CDDP + GC-CD (500 μ l) a los ratones, seguido de reproducción. El día 19, se diseccionaron los ratones y se midió el peso del mesenterio y del omento mayor. Al grupo control, sólo se le administró suero fisiológico (500 μ l) (n=10; 10 ratones/grupo).

5 La Fig. 4 muestra los resultados.

(2) Se inocularon intraperitonealmente células colon26 (1×10^4 células/ratón) a los ratones (día 0). El día 1, el día 2, el día 3, el día 6, el día 7 y el día 8, se ajustaron CDDP y/o GC-CD con suero fisiológico (solución salina normal Otsuka) a la concentración de interés y se administró intraperitonealmente CDDP, GC-CD o CDDP + GC-CD (500 μ l) a los ratones, seguido de reproducción. El día 21, se diseccionaron los ratones y se midió el peso del mesenterio y del omento mayor. Al grupo control, sólo se le administró suero fisiológico (500 μ l) (n=10; 10 ratones/grupo).

La Fig. 5 muestra los resultados.

(3) Se inocularon intraperitonealmente células colon26 (1×10^4 células/ratón) a los ratones (día 0). El día 7, se ajustaron CDDP y/o GC-CD con suero fisiológico (solución salina normal Otsuka) a la concentración de interés y se administró intraperitonealmente CDDP, GC-CD o CDDP + GC-CD (500 μ l) a los ratones, seguido de reproducción. El día 18, se diseccionaron los ratones y se midió el peso del mesenterio y del omento mayor. Al grupo control, sólo se le administró suero fisiológico (500 μ l) (n=10; 10 ratones/grupo).

20 La Fig. 6 muestra los resultados.

Ejemplo 4

25 Efecto antitumoral por adición de fármaco

Se emplearon ratones Balb/c (6 semanas de edad, hembras) como animales de ensayo. Se inocularon intraperitonealmente células colon26 (1×10^4 células/ratón) a los ratones (día 0). El día 2 y/o el día 3, se ajustaron CDDP y/o GC-CD con suero fisiológico (solución salina normal Otsuka) a la concentración de interés y se administró intraperitonealmente CDDP (una vez, el día 2), GC-CD (dos veces, el día 2 y 3) o CDDP (una vez, el día 2) + GC-CD (dos veces, el día 2 y 3) (500 μ l) a los ratones, seguido de reproducción. Se contó el tiempo de supervivencia (días) hasta el día 43. Al grupo control, sólo se le administró suero fisiológico (500 μ l) (n=10; 10 ratones/grupo).

La Fig. 7 muestra los resultados.

Ejemplo 5

Efecto antitumoral por adición de fármaco

40 Se emplearon ratones Balb/c (6 semanas de edad, hembras) como animales de ensayo. Se inocularon subcutáneamente células colon26 (5×10^4 células/ratón) a los ratones (día 0). Tras confirmar que el tamaño del tumor alcanzaba aproximadamente 4 mm (días 7 a 10 tras la inoculación), se ajustaron CDDP y/o GGC-CD con suero fisiológico (solución salina normal Otsuka) a la concentración de interés y se administró CDDP, GGC-CD o CDDP + GGC-CD (200 μ l) a los ratones a través de la vena de la cola, seguido de reproducción. Se monitorizó el cambio dependiente del tiempo en el tamaño tumoral hasta el día 21 y se determinó el volumen tumoral correspondiente. Al grupo control, sólo se le administró suero fisiológico (200 μ l) (n=7; 7 ratones/grupo).

La Fig. 8 muestra los resultados.

Ejemplo 6

Efecto inhibidor de la metástasis del cáncer por adición de fármaco

55 Se emplearon ratones Balb/c (6 semanas de edad, hembras) como animales de ensayo. Se inocularon intraperitonealmente células colon26 (5×10^4 células/ratón) a los ratones (día 0). Inmediatamente después de la inoculación, se ajustaron CDDP y/o GC-CD o GGC-CD con suero fisiológico (solución salina normal Otsuka) a la concentración de interés y se administró CDDP, GC-CD (o GGC-CD) o CDDP + GC-CD (o GGC-CD) (200 μ l) a los ratones a través de la vena caudal, seguido de reproducción. El día 14, los ratones fueron diseccionados y se contaron los nódulos tumorales en los pulmones. Al grupo control, no se le administró ninguna sustancia (n=10; 10 ratones/grupo).

La Fig. 9 muestra los resultados.

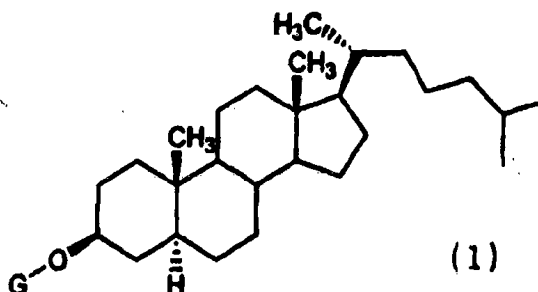
Como se ha descrito aquí con anterioridad, mediante el empleo en combinación del derivado de colestanol de la presente invención o de un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo y de un agente anticanceroso, se inhibe potentemente la proliferación de diversas células cancerosas y se puede obtener un efecto sinérgico y/o un efecto de potenciación de la acción antitumoral de un agente anticanceroso conocido.

5

REIVINDICACIONES

1. Un agente quimioterapéutico para el cáncer que incluye, en combinación,

5 (a) un derivado de colestanol representado por la fórmula (1):



(donde G es GlcNAc-Gal- o GlcNAc-) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo y

10 (b) un agente anticanceroso.

2. Un agente quimioterapéutico para el cáncer según la reivindicación 1, donde el agente anticanceroso es una o más especies seleccionadas entre el grupo consistente en un agente anticanceroso a base de complejo de platino.

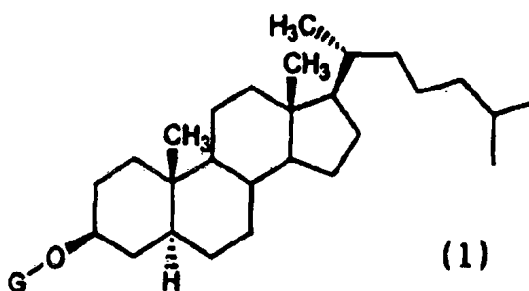
15 3. Un agente quimioterapéutico para el cáncer según la reivindicación 2, donde el agente anticanceroso es una o más especies seleccionadas entre el grupo consistente en cisplatina y oxaliplatina.

20 4. Un agente quimioterapéutico para el cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un agente compuesto.

25 5. Un agente quimioterapéutico para el cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que está en forma de kit que incluye un fármaco que contiene un derivado de colestanol y un fármaco que contiene un agente anticanceroso.

6. Un agente quimioterapéutico para el cáncer según la reivindicación 5, donde el fármaco que contiene un derivado de colestanol es una formulación liposómica.

30 7. Uso, en combinación, de un derivado de colestanol representado por la fórmula (1):



(donde G es GlcNAc-Gal- o GlcNAc-) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo y un agente anticanceroso para producir un agente quimioterapéutico para el cáncer.

35

Fig. 1

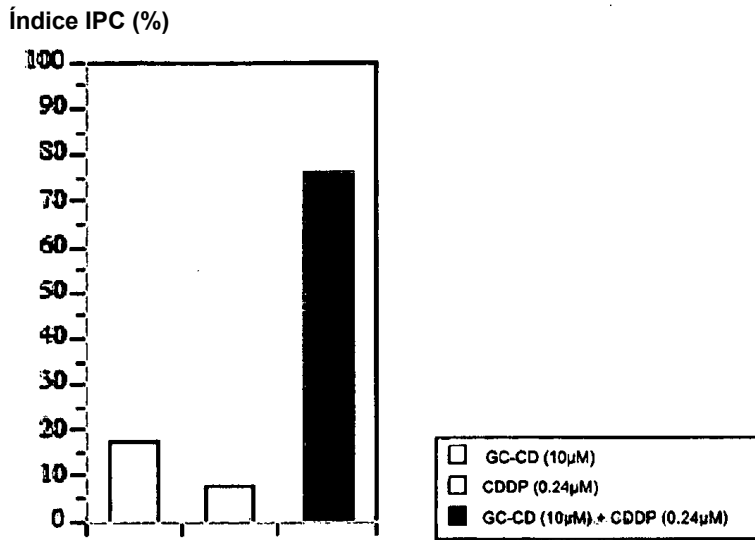


Fig. 2

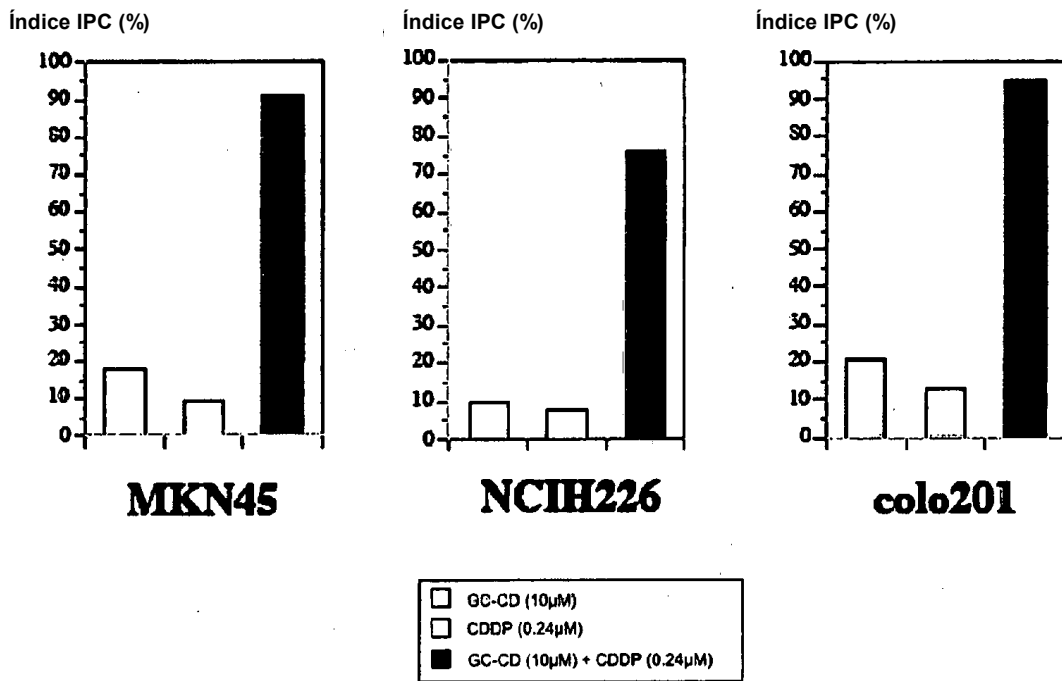


Fig. 3

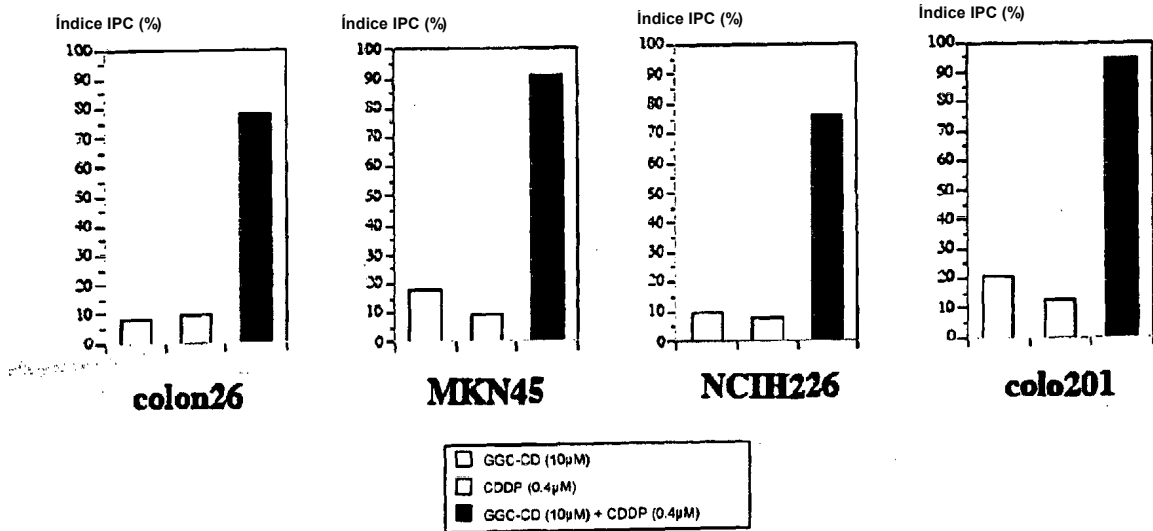


Fig. 4

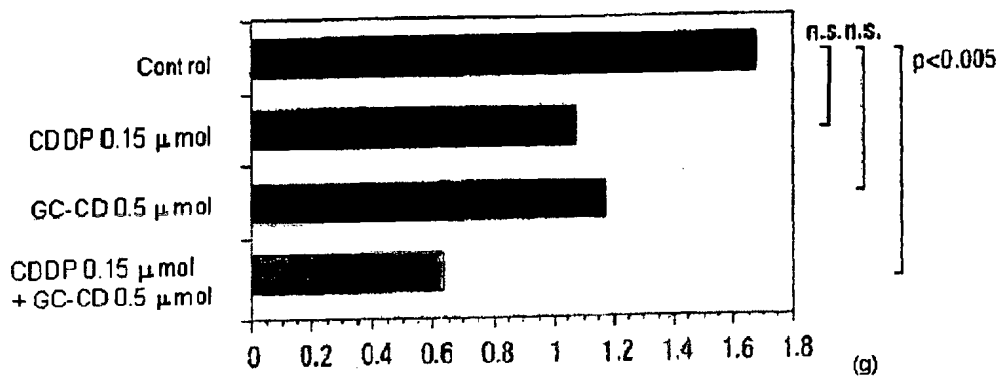


Fig. 5

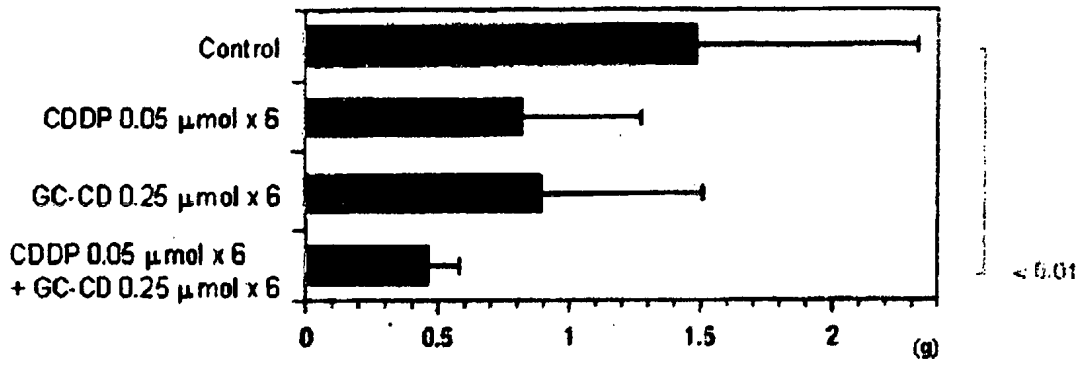


Fig. 6

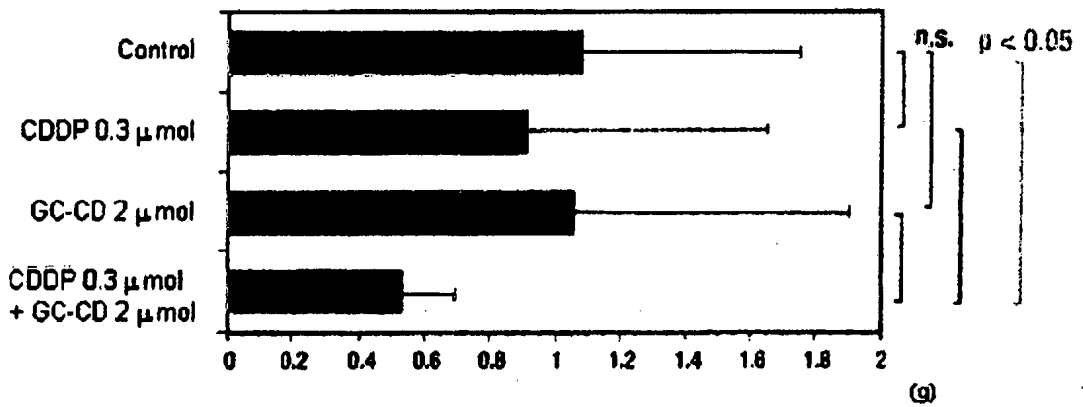


Fig. 7

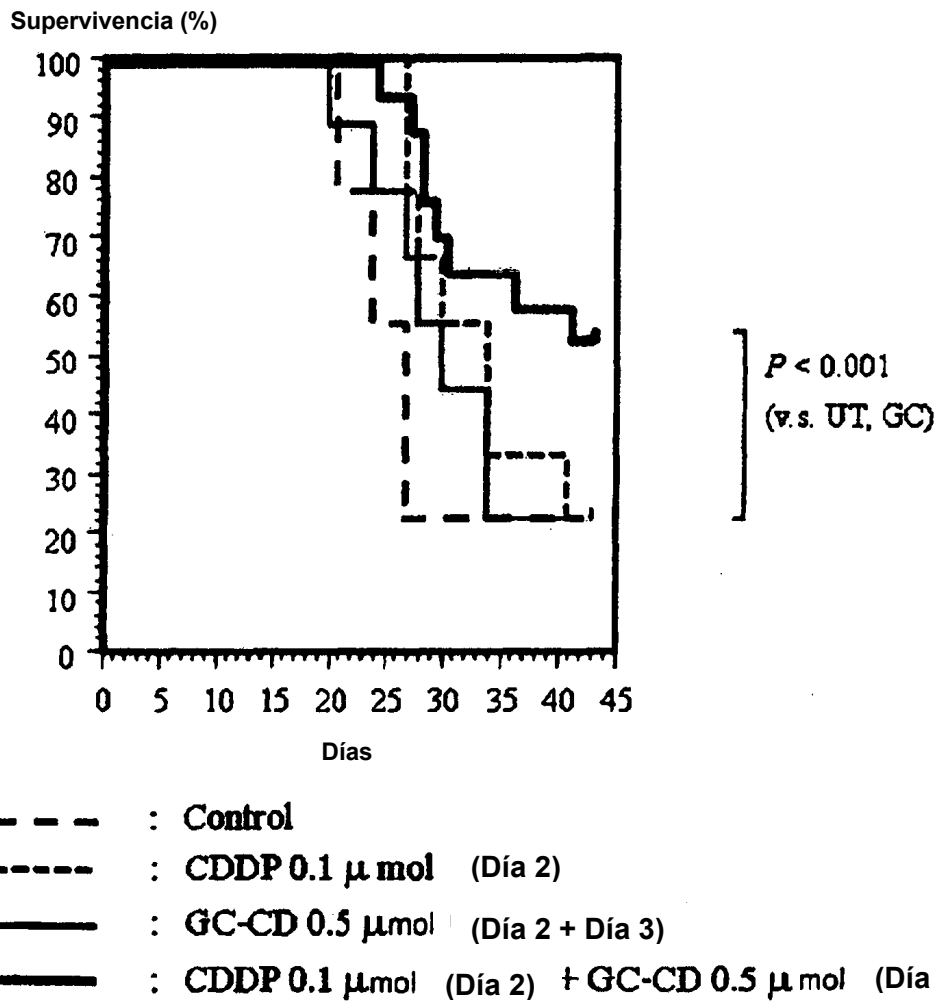


Fig. 8

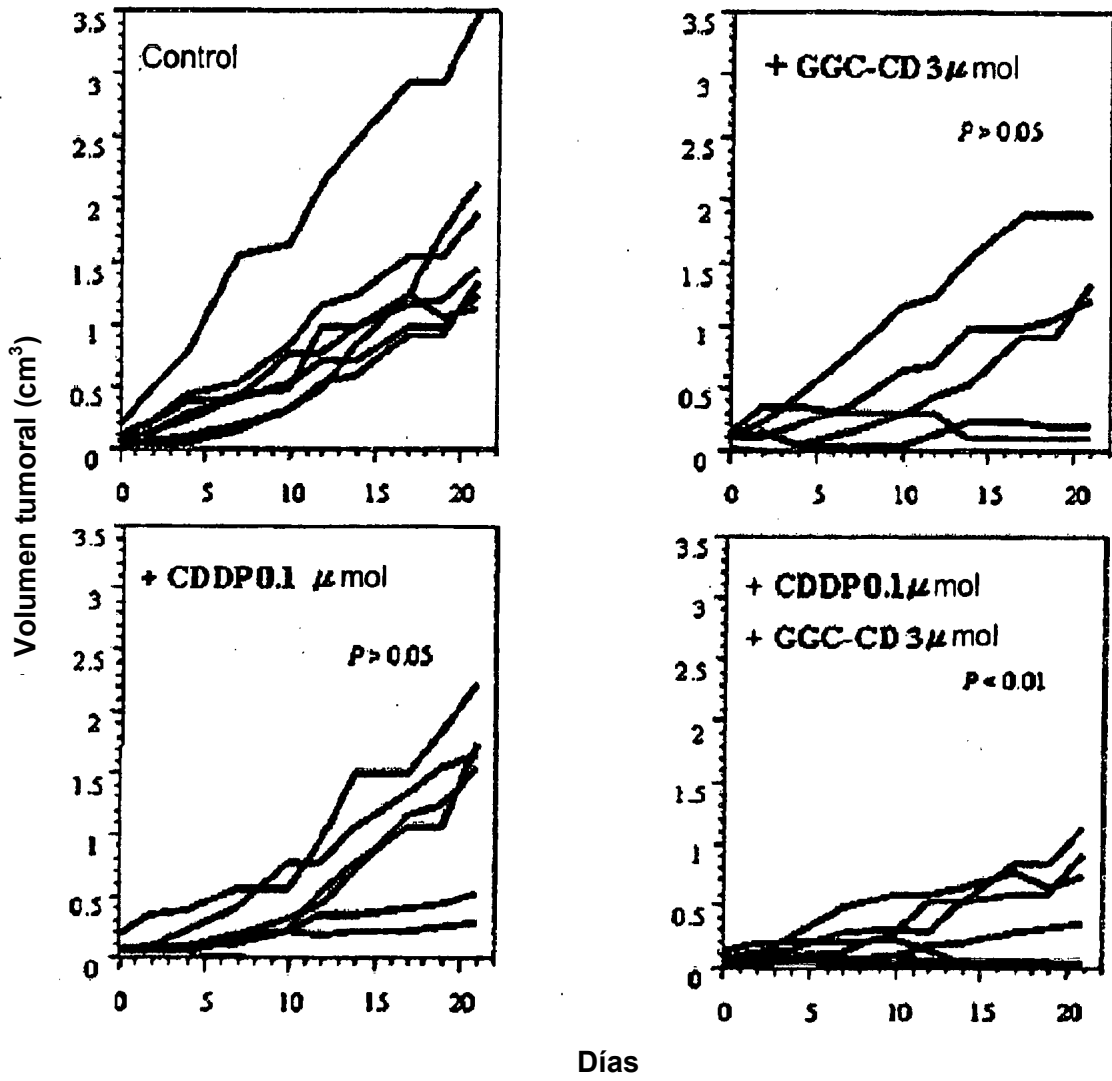


Fig. 9

