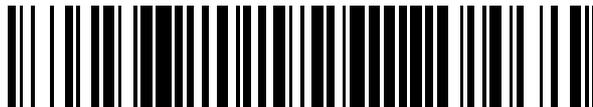


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 167**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

A61K 31/343 (2006.01)

A61K 9/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2011 E 11150003 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2343051**

54 Título: **Formulación anticancerosa**

30 Prioridad:

05.01.2010 US 292311 P

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

13.11.2014

73 Titular/es:

**NATIONAL DONG HWA UNIVERSITY (100.0%)
No. 1, Sec. 2, Da Hsueh Rd Shoufeng
Hualien, TW**

72 Inventor/es:

**CHIOU, TZYY-WEN;
HARN, HORNG-JYH y
LIN, SHINN-ZONG**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 522 167 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

Formulación anticancerosa

Campo Técnico

5 La invención se refiere a formulaciones farmacéuticas y a usos de formulaciones farmacéuticas en el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

10 La *n*-butilidenftalida (Bdph) es un compuesto químico aislado de *Angelica sinensis*. Se puede utilizar para tratar diversos tumores, tales como, por ejemplo, el glioblastoma multiforme y el cáncer de mama. Véanse, por ejemplo, Tsai et al., Clin. Cancer Res. 2005, 11 (9): 3475-3484, y Tsai et al., J. Neurochem. 2006, 99 (4): 1251-62. En el Documento EP 1645280 A1 se revela que la forma Z purificada de la butilidenftalida puede ser disuelta en DMSO y presenta actividad anticancerosa. Sin embargo, el suministro de *n*-butilidenftalida al sitio canceroso de una manera selectiva e ininterrumpida es crítico para su uso en una terapia eficaz contra el cáncer. Esto es especialmente importante para el tratamiento del cáncer cerebral, en el que es difícil que el fármaco alcance la zona morbosa a causa de la barrera hematoencefálica. Existe la necesidad de desarrollar modos eficaces para suministrar el fármaco.

Sumario

20 Esta invención se basa en el descubrimiento de una formulación farmacéutica de la cual se puede liberar gradualmente *n*-butilidenftalida, en particular la forma Z [es decir, (Z)-*n*-butilidenftalida, z-butilidenftalida y z-Bdph], a lo largo de un periodo prolongado, por ejemplo, durante más de 30 días, y en que la z-Bdph, más que la forma E [es decir, (E)-*n*-butilidenftalida, e-butilidenftalida y e-Bdph], produce efectos antitumorales.

En un aspecto, esta invención presenta una formulación farmacéutica que contiene (i) z-butilidenftalida y (ii) un polímero, que están mezclados entre sí.

25 El polímero es seleccionado de entre poli(ácido láctico-co-glicólico), un quitosano, un colágeno, un polianhídrido y una mezcla de los mismos. El polianhídrido se prepara a partir de bis(p-carboxifenoxi)propano, bis(p-carboxifenoxi)butano, bis(p-carboxifenoxi)pentano, bis(p-carboxifenoxi)heptano, bis(p-carboxifenoxi)hexano, bis(p-carboxifenoxi)octano, ácido 1,4-fenilendipropiónico, ácido dodecanodioico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico, ácido sebácico, ácido ftálico, ácido isoftálico, ácido tereftálico, o una mezcla de los mismos.

30 Un ejemplo de la formulación es una mezcla de z-butilidenftalida y polianhídrido p(CPP-SA), que se prepara a partir de bis(p-carboxifenoxi)propano [CPP; del inglés, bis(p-carboxyphenoxy)propane] y el ácido sebácico (SA; del inglés, sebacic acid). En el polianhídrido, la relación entre el bis(p-carboxifenoxi)propano y el ácido sebácico es preferiblemente de 1:2 a 1:10 (por ejemplo, 1:4). El porcentaje ponderal de la z-butilidenftalida es el 3%-50% (por ejemplo, el 3%-20%, 10% y 15%) de la formulación. La formulación puede estar en forma de polvos, sellos, hojas, barritas, microesferas, nanoesferas, pasta o adhesivo.

35 En otro aspecto, esta invención presenta el uso de la formulación farmacéutica anteriormente descrita para tratar un tumor. Los ejemplos del tumor que se va a tratar incluyen, pero no se limitan a, glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, neuroblastoma, teratoma y leucemia humana.

40 Dentro del alcance de esta invención está también el uso de la formulación anteriormente descrita en la fabricación de un medicamento útil para tratar un tumor.

En los dibujos adjuntos y la descripción que viene a continuación se exponen los detalles de una o más realizaciones de la invención. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos y a partir de las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

45 Un aspecto de esta invención se refiere a una formulación farmacéutica que contiene *n*-butilidenftalida, en particular su forma z, z-butilidenftalida, y un polímero. La formulación puede ser empleada para inhibir el crecimiento de tumores, tal como el glioblastoma multiforme.

50 La z-butilidenftalida utilizada para llevar esta invención a la práctica es comercialmente obtenible, por ejemplo, de Lancaster Synthesis Ltd. (Reino Unido). Puede ser también aislada de un extracto de *Angelica sinensis* en cloroformo. Véase, por ejemplo, Tsai et al., Clin. Cancer Res. 2005, 11 (9): 3475-3484. El compuesto z-

butilidenftalida, adquirido o aislado, puede ser adicionalmente purificado mediante cromatografía de resolución rápida en columna, cromatografía de alta eficacia en fase líquida, cristalización o cualesquier otros métodos adecuados.

5 El polímero utilizado para llevar esta invención a la práctica es comercialmente asequible o puede ser preparado mediante métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, se puede hacer refluir un compuesto diácido en anhídrido acético para obtener un polianhídrido.

El polímero puede ser un copolímero. Como un ejemplo, dicho copolímero puede ser preparado a partir de dos componentes de polianhídrido diferentes usando el proceso de policondensación en estado fundido. Véase, por ejemplo, Domb et al., *Journal of Polymer Science*, 1987, 25: 3373-3386.

10 El polímero obtenido puede ser purificado mediante cualquier método adecuado y ser caracterizado mediante NMR, MS o FT-IR.

15 Para preparar la formulación de esta invención, se pueden mezclar la z-butilidenftalida y el polímero, por ejemplo, un polianhídrido, en la relación deseada (por ejemplo, 10 partes en peso de la z-butilidenftalida y 90 partes en peso del polianhídrido). Como otro ejemplo, se pueden disolver la butilidenftalida y el polianhídrido en un disolvente (por ejemplo, cloruro de metileno) y se puede eliminar luego el disolvente para obtener un polvo seco.

La mezcla así obtenida puede ser adicionalmente procesada en diversas formas tales como sellos, hojas, barritas, microesferas, nanoesferas, pasta o adhesivo. Por ejemplo, se puede utilizar un molde para comprimir la mezcla en sellos.

20 La expresión "formulación farmacéutica" se utiliza en esta memoria para significar una composición que (i) es adecuada para la administración a un ser humano u otro mamífero o que puede ser tratada, por ejemplo, esterilizada, para hacerla adecuada para dicha administración, y (ii) que comprende al menos un fármaco (por ejemplo, z-butilidenftalida) y al menos uno de los polímeros anteriormente mencionados. La formulación puede ser una parte o la totalidad de cualquier dispositivo que permita suministrar un fármaco, incluyendo píldoras, cápsulas, geles, depósitos, dispositivos médicos implantables [por ejemplo, estents, incluyendo estents autoexpandibles, 25 estents expandibles por balón, estents con elución de fármaco y estent-injertos, injertos (por ejemplo, injertos aórticos), válvulas cardíacas artificiales, sistemas derivadores del fluido cerebroespinal, electrodos marcapasos, cables endocárdicos, implantes bioerosionables y similares], y dispositivos externamente manipulados (por ejemplo, catéteres y dispositivos farmacológicos, incluyendo catéteres que pueden liberar un fármaco, por ejemplo, como resultado del calentamiento de la punta del catéter). La formulación farmacéutica puede también incluir uno o más 30 aditivos diferentes, tales como, por ejemplo, excipientes, vehículos, agentes potenciadores de la penetración, estabilizantes o tampones farmacéuticamente aceptables u otros materiales físicamente asociados con el fármaco y/o el polímero para potenciar la capacidad de suministro de la forma de dosificación y/o la eficacia del fármaco. La formulación puede ser, por ejemplo, un líquido, una suspensión, un sólido (tal como una tableta, una píldora o una cápsula, incluyendo una microcápsula), una emulsión, una micela, un ungüento, un gel, una emulsión, un depósito (incluyendo un depósito subcutáneamente implantado) o un revestimiento sobre un dispositivo implantado, por 35 ejemplo, un estent o similar. Por ejemplo, la formulación puede ser aplicada externamente, por ejemplo, como un parche o como un dispositivo aplicado de forma parcialmente externa y de forma parcialmente implantada, o completamente implantado o inyectado subcutáneamente.

40 El término "fármaco" significa un material que es biológicamente activo local y/o sistémicamente en un ser humano u otro mamífero. En el Merck Index, el Physicians Desk Reference, y en de la columna 11, línea 16, a la columna 12, línea 58, de la Patente de EE.UU. n° 6.297.337, y en el párrafo 0045 del Documento US 2003/0224974, se describen ejemplos de fármacos. Los fármacos pueden ser, por ejemplo, sustancias empleadas para el tratamiento, la 45 prevención, el diagnóstico, la curación o la mitigación de una enfermedad o dolencia, incluyendo vitaminas y complementos minerales; sustancias que afectan a la estructura o la función de un mamífero; profármacos, que son sustancias que se vuelven biológicamente activas o más activas una vez que se han situado en un entorno fisiológico; y metabolitos de fármacos. Los agentes que contienen radioisótopos para obtención de imágenes, los agentes de contraste que contienen, por ejemplo, yodo, las enzimas, las sustancias fluorescentes y similares son ejemplos de agentes diagnósticos.

50 La formulación de esta invención puede también contener aditivos adecuados. Estos aditivos pueden ser incluidos en la formulación en cualquier fase de la preparación de la formulación. Las concentraciones deseadas de los aditivos en la formulación para conferir el efecto previsto, como es reconocido por quienes tienen experiencia en la técnica, pueden ser examinadas usando métodos convencionales.

55 La formulación de esta invención, tras entrar en contacto con fluido, libera z-butilidenftalida – un agente antitumoral. De este modo, esta invención también se refiere a un método para tratar un tumor mediante la administración de una cantidad eficaz de la formulación a un sujeto que la necesita. La butilidenftalida de la formulación se libera lenta y continuamente en el tejido adyacente a lo largo de un cierto periodo de tiempo, por ejemplo, 20, 30, 35, 40, 50 o 60

días.

Como se emplea en esta memoria, el término "tratamiento" se define como la administración de una cantidad eficaz de la formulación a un sujeto que tiene un tumor, un síntoma de tumor, una enfermedad o un trastorno secundarios en relación con el tumor, o una predisposición hacia el tumor, con la finalidad de curar, aliviar, mitigar, remediar o mejorar el tumor, el síntoma del tumor, la enfermedad o el trastorno secundarios en relación con el tumor, o la predisposición hacia el tumor.

Un "sujeto" se refiere a un ser humano y un animal no humano. Los ejemplos de un animal no humano incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, tales como primates no humanos (particularmente primates superiores), un perro, un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata), una cobaya y un gato, y no mamíferos, tales como aves, anfibios, reptiles, etc. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un animal experimental o un animal adecuado como modelo de enfermedad. Mediante técnicas de diagnóstico estándares para el trastorno se puede identificar un sujeto que se va a tratar para un tumor, cáncer u otro trastorno proliferativo celular.

Un tumor es una tumefacción o lesión formada por un crecimiento anormal de células. Puede ser un tumor benigno o un tumor maligno (es decir, un cáncer). El cáncer se refiere a una clase de enfermedades en que un grupo de células presenta crecimiento descontrolado, invasión y a veces metástasis. Los ejemplos del cáncer que se va a tratar incluyen, pero no se limitan a, glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, neuroblastoma, teratoma y leucemia humana.

La expresión "una cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una formulación o un compuesto que confiere un efecto terapéutico al sujeto que se trata. El método de tratamiento puede ser llevado a cabo *in vivo* o *ex vivo*, solo o en conjunción con otros fármacos u otra terapia. En una estrategia *in vivo*, se administra un compuesto o una formulación a un sujeto. Generalmente, el compuesto o la formulación se preparan en un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, disolución salina fisiológica) y se administran oralmente o por infusión intravenosa, o se inyectan o implantan subcutánea, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, intratraqueal o intrapulmonarmente.

Preferiblemente, la formulación puede ser subcutánea, intramuscular, intravenosa, intersticial o intracranalmente implantada en un paciente con cáncer. En una realización, la formulación, en diversas formas, puede ser implantada en el sitio canceroso o en sus inmediaciones con o sin extirpación del tejido tumoral.

La dosificación requerida depende de la elección de la vía de administración; la naturaleza de la formulación; la naturaleza de la dolencia del paciente; el tamaño, el peso, el área superficial, la edad y el sexo del sujeto; otros fármacos que se administren; y el juicio del médico responsable. Puede ser ajustada por un experto en la técnica, por ejemplo, un nutricionista, un dietista o un médico de cabecera, en conjunción con la respuesta del sujeto. Las dosificaciones adecuadas están en el intervalo de 0,01-100 mg/kg. Se han de esperar variaciones en la dosificación necesaria a la vista de la diversidad de compuestos disponibles y de las diferentes eficacias de las diversas vías de administración.

La formulación puede ser empleada junto con cirugía o radioterapia. Puede ser también empleada en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos diferentes. Los agentes quimioterapéuticos pueden ser, por ejemplo, camptotecinas tales como topotecán, antibióticos antraciclínicos tales como doxorubicina, agentes alquilantes tales como ciclofosfamida, o agentes antimicrotúbulos tales como paclitaxel, temozolomida o carmustina.

Sin entrar en más detalles, se cree que la anterior descripción ha posibilitado adecuadamente la presente invención. Por lo tanto, los ejemplos siguientes han de ser considerados meramente ilustrativos y de ningún modo restrictivos del resto de la descripción. Todas las publicaciones citadas en esta memoria se incorporan a la misma en su totalidad por referencia.

Ejemplo 1: Síntesis de polímeros

Se recristalizó dos veces el monómero de SA en alcohol. Se hicieron refluir 2,7 g de monómero de SA en 60 ml de anhídrido acético durante 30 minutos (min) a 135-140 °C bajo vacío ($1,33 \times 10^{-2}$ Pa). Se eliminó el anhídrido acético sin reaccionar. El prepolímero de SA fue secado bajo vacío a 60 °C y fue luego disuelto en tolueno seco. Se añadió la disolución a una mezcla 1:1 (v/v) de éter dietílico y éter de petróleo secos en una relación volúmica de 1:10 y se dejó el conjunto en reposo durante la noche para que precipitara el prepolímero de SA (10:1, v/v). Una vez que se hubieron eliminado el éter dietílico y el éter de petróleo, se secó el prepolímero de SA bajo vacío.

Se hicieron refluir 3 g de monómeros de CPP con 50 ml de anhídrido acético durante 30 minutos a 150 °C bajo vacío ($1,33 \times 10^{-2}$ Pa). Una vez enfriada, la mezcla de reacción fue filtrada. Se concentró el filtrado eliminando parte del anhídrido acético sin reaccionar y se cristalizó el prepolímero de CPP a 0 °C. Se eliminó el anhídrido acético sin reaccionar restante. El prepolímero de CPP fue lavado con éter y fue secado bajo vacío. Se añadieron

sucesivamente DMF y éter seco (DMF:éter seco = 1:9) al prepolímero de CPP. Después de aproximadamente 12 horas, se eliminaron la DMF y el éter y se secó de nuevo bajo vacío el cristal de prepolímero de CPP.

5 Se cargaron prepolímero de CPP y prepolímero de SA en una relación de 20:80 en un tubo de vidrio (2 x 20 cm) y se calentaron a 180 °C durante 1 min en un baño de aceite. Se redujo la presión a $1,33 \times 10^{-2}$ Pa. Se eliminó el vacío cada 15 min a lo largo de la polimerización. Se lavó el tubo con diclorometano y luego se añadió éter de petróleo para que precipitara el copolímero de p(CPP-SA), el cual fue lavado con éter anhidro y fue secado bajo vacío.

10 Se caracterizó el copolímero de p(CPP-SA) mediante IR y ^1H NMR. En la espectroscopía IR, se observó a $1812,76 \text{ cm}^{-1}$ la característica señal del enlace anhídrido. En la espectroscopía por ^1H NMR, se observaron a 6,9-8,2 ppm las características señales de los protones aromáticos del CPP y se midió a 1,3 ppm la característica señal de los protones metilénicos del SA. Además, de acuerdo con las características intensidades de picos del CPP y el SA en la espectroscopía por ^1H NMR, se identificó la relación de CPP y SA en el copolímero en un valor de 1:4~1:5.

15 Se mezcló el polímero de p(CPP-SA) con z-Bdph para obtener una mezcla que contenía 3% o 10% en peso de z-Bdph. También se preparó una mezcla que contenía 97% de p(CPP-SA) y 3% de 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU). Se disolvió cada mezcla en cloruro de metileno en una concentración de 10% (peso/volumen). Se secó la disolución bajo vacío durante 72 horas. El polvo seco así obtenido fue comprimido para formar discos de z-Bdph-p(CPP-SA) (100 mg/disco) usando un molde de acero inoxidable (diámetro interno de 13 mm) bajo una ligera presión de 1,38 MPa mediante una prensa Carver, de la manera descrita por Walter et al., Cancer Res. 1994, 54 (8): 2207-12; Leong et al., J. Biomed. Mater. Res. 1985, 19 (8): 941-55; y Storm et al., J. Neurooncol. 2002, 56 (3): 209-17. También se prepararon discos de BCNU-p(CPP-SA) del mismo tamaño mediante moldeo por compresión.

20 Ejemplo 2: Cinética de liberación

Se pusieron discos de z-Bdph-p(CPP-SA) en viales para centelleo que tenían 1,0 ml de disolución salina tamponada con fosfato 0,1 M (pH de 7,4) y 1,0 ml de n-octanol y se incubaron a 37 °C. En diversos puntos temporales se sustituyó la disolución por tampón fresco. Se midió la absorción a una longitud de onda de 310 nm usando un espectrofotómetro para determinar la concentración de z-Bdph en el tampón, del modo descrito por Weingart et al., Int. J. Cancer 1995, 62 (5): 605-9. Se observó una liberación ininterrumpida de z-Bdph.

25 Ejemplo 3: Liberación controlada y efectos citotóxicos *in vitro*

Se llevaron a cabo ensayos para examinar los efectos inhibitorios del crecimiento de p(CPP-SA)-z-Bdph al 10% sobre células RG2 de glioblastoma multiforme (GBM) de rata. Se trataron las células RG2 con Bdph al 10%-sello durante 24 horas. Se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo con MTT. Se halló que los efectos inhibitorios del crecimiento de p(CPP-SA)-z-Bdph al 10% fueron del 50% con respecto al testigo. Además, la morfología de las células de GBM cambió gradualmente y se observó el desprendimiento de las células del fondo de la placa de cultivo después del tratamiento. En comparación con las células no tratadas, la mayoría de las células de GBM desprendidas resultaron apoptóticas después del tratamiento con p(CPP-SA)-z-Bdph al 10%.

35 Adviértase que los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar o el error estándar de tres experimentos independientes. La significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student y la prueba de Mantel-Cox. El análisis de la supervivencia se llevó a cabo usando el método de Kaplan-Meier. Un valor de $P < 0,05$ se consideró significativo.

40 Ejemplo 4: Vías apoptóticas y traslocación de Nurr inducidas por p(CPP-SA)-z-Bdph

Para confirmar los resultados del análisis con micromatrices basado en oligodesoxinucleótidos, se examinó mediante RT-PCR la expresión de los receptores huérfanos NOR-1, Nurr1 y Nur77 en células RG2 tratadas con z-Bdph.

Se incubaron células RG2 con z-Bdph en concentración IC_{50} durante varios periodos de tiempo (0, 0,5, 1, 3 y 6 horas). Después de la incubación, se recogieron las células y se aisló el RNA total. Se usó la expresión de GADPH como un testigo interno.

45 Después del tratamiento con z-Bdph, se indujo la expresión de mRNA de Nurr77 en las células de un modo dependiente del tiempo. La expresión de mRNA de Nurr77 resultó significativamente inducida desde media hora después del tratamiento con z-Bdph hasta 6 horas después del tratamiento. Nur77, que resultó muy inducido después del tratamiento con z-Bdph, ha sido implicado en la inhibición del crecimiento y en la apoptosis, lo que sugiere que la inducción de Nur77 podría ser un proceso precoz de la apoptosis inducida por z-Bdph en células de GBM.

Se examinó si la traslocación de Nur77 se producía en respuesta a z-Bdph. Se trataron células DBTRG-05NG (células de GBM humano) con Bdph (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 24 horas y luego se inmunotifieron con anticuerpo anti-

Nur77 seguido del correspondiente anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con rodamina. Se tiñeron simultáneamente las células con DAPI para mostrar los núcleos. Las imágenes fluorescentes se visualizaron con un microscopio de fluorescencia. Los resultados mostraron que Nur77 era mucho más abundante en el núcleo que en el citosol. Después del tratamiento con z-Bdph durante 24 horas, Nur77 se trasladó del núcleo al citoplasma.

- 5 Para una ulterior confirmación, se examinaron las fracciones citosólica y nuclear de las células mediante un análisis por transferencia Western. Se sembraron células RG2 en placas de 10 cm y se incubaron hasta una confluencia de 90%. Se trataron las células con Bdph (100 µg/ml) durante diferentes periodos de tiempo (0, 6, 12, 24 y 48 horas). Se recogieron las células y se aislaron las fracciones nuclear y citoplasmática. El análisis por transferencia Western mostró que Nur77 se localizaba predominantemente en el núcleo en ausencia del tratamiento con z-Bdph.
- 10 Finalmente, se investigaron las vías de señalización implicadas en la expresión génica de Nur77 inducida por z-Bdph. Se trataron células RG2 con Bdph (100 µg/ml) durante diversos periodos de tiempo (0, 15, 30, 60 y 180 minutos). El análisis por transferencia Western mostró que JNK, AKT y ERK estaban significativamente fosforiladas después del tratamiento con z-Bdph durante 1 hora. Además, los resultados del ensayo con MTT mostraron que la viabilidad celular aumentaba después de que las células fueran pretratadas con un inhibidor de pJNK en
- 15 concentración 5-20 nM y fueran tratadas con z-Bdph.

Ejemplo 5: Estudios con animales

- Se obtuvieron machos de rata F344 (230-260 g) y machos de ratón nu/nu Foxn1 (10-12 semanas) del National Laboratory Animal Center (Taipei, Taiwan). Todos los procedimientos se llevaron a cabo en conformidad con los procedimientos operativos estándares del Laboratory Animal Center de la National Tau Hwa University (Hualien, Taiwan) y el China Medical University Hospital (Taichung, Taiwan). Se emplearon células RG2 y células DBTRG-05MG en experimentos con animales para determinar las actividades antitumorales de p(CPP-SA)-BCNU al 3% y de formulaciones de p(CPP-SA)-z-Bdph al 3% o 10%.
- 20

- Ratas F344 singénicas recibieron implantes subcutáneos de células RG2 en el lomo. Los animales fueron tratados mediante un implante subcutáneo con formulaciones de p(CPP-SA)-z-Bdph al 3% o p(CPP-SA)-z-Bdph al 10%, p(CPP-SA)-BCNU al 3%, o polímero solo, implante separado al menos 1,5 cm del sitio de la inyección original, después de la implantación de las células tumorales.
- 25

- Además, ratones nu/nu Foxn1 recibieron un implante subcutáneo de células DBTRG-05MG y un implante subcutáneo de formulaciones de p(CPP-SA)-z-Bdph al 3% o p(CPP-SA)-z-Bdph al 10%, p(CPP-SA)-BCNU al 3%, o polímero solo, implante separado al menos 1,5 cm del sitio de la inyección original, después de la implantación de las células tumorales.
- 30

- Se midieron los tamaños de los tumores usando un calibre y se calculó el volumen como longitud x altura x anchura x 0,5236. Los animales fueron sacrificados cuando los volúmenes de los tumores excedieron de 25 cm³ en las ratas y de 1000 mm³ en los ratones. Este dato se usó para calcular la fecha final de supervivencia para las ratas y los ratones.

- 35 Ejemplo 6: Efectos terapéuticos de p(CPP-SA)-z-Bdph en un modelo animal

- Se implantaron subcutáneamente células RG2 (5 x 10⁶) en la región trasera del flanco de ratas F344. Cinco días después del trasplante de las células RG2, las ratas fueron tratadas subcutáneamente con p(CPP-SA)-z-Bdph al 3%, p(CPP-SA)-z-Bdph al 10%, p(CPP-SA) solo o p(CPP-SA)-BCNU al 3%. Se observó una significativa inhibición del crecimiento tumoral en el grupo tratado con p(CPP-SA)-z-Bdph al 10% en comparación con el grupo tratado con p(CPP-SA)-z-Bdph al 3%, el grupo tratado con p(CPP-SA)-BCNU al 3% y el grupo tratado con p(CPP-SA) ($p < 0,005$).
- 40

- El día 30, los tamaños medios de los tumores fueron 2070,79 ± 784,90 mm³ en el grupo testigo (no tratado), 1586,30 ± 243,69 mm³ en el grupo tratado con p(CPP-SA), 346,71 ± 521,68 mm³ en el grupo tratado con p(CPP-SA)-z-Bdph al 3%, 87,89 ± 167,44 mm³ en el grupo tratado con p(CPP-SA)-z-Bdph al 10%, y 357,48 ± 27,30 mm³ en el grupo tratado con p(CPP-SA)-BCNU al 3%.
- 45

- La tinción inmunohistoquímica de ki-67, que indica proliferación celular, mostró una disminución significativa de proliferación celular en el grupo tratado con p(CPP-SA)-z-Bdph al 10%. Además, la tinción inmunohistoquímica de caspasa, que indica apoptosis celular, mostró un aumento significativo de apoptosis celular en el grupo tratado con p(CPP-SA)-z-Bdph al 10%.

- 50 Finalmente, no se observaron toxicidades relacionadas con el fármaco, según se evaluaron por los pesos corporales y los análisis histológicos de varios órganos, en los animales del grupo tratado con p(CPP-SA)-z-Bdph al 10%. Por contraste, se observó una significativa pérdida de peso corporal en el grupo tratado con p(CPP-SA)-BCNU al 3%.

Ejemplo 7: Efectos terapéuticos de p(CPP-SA)-z-Bdph sobre el crecimiento tumoral de xenoinjertos.

Se inocularon células DBTRG-05MG humanas (2×10^6) a ratones desnudos Foxn1 y se implantó p(CPP-SA)-z-Bdph (al 0%, 3%, 10%) el día 5. Se observaron supresiones significativas del crecimiento tumoral en los grupos tratados con z-Bdph al 3% y 10%-sello. El día 39, los valores medios de los tamaños tumorales fueron $1098,46 \pm 170,11$ en el grupo testigo, $605,8 \pm 98,8 \text{ mm}^3$ en el grupo tratado con p(CPP-SA)-z-Bdph al 3%, y $504,4 \pm 38,9 \text{ mm}^3$ en el grupo tratado con p(CPP-SA)-z-Bdph al 10% ($p < 0,05$).

Ejemplo 8: z-Bdph inhibe la migración y la invasión del glioblastoma multiforme humano

Se examinó la invasión de células DBTRG-05MG utilizando un sistema de cámara de invasión de Matrigel BioCoat (BD Bioscience, Bedford, Massachusetts, EE.UU.). La matriz Matrigel de BD está compuesta de laminina, colágeno IV, nidogen/entactina y proteoglicano sobre membranas de poli(tereftalato de etileno) (PET; del inglés polyethylene terephthalate) que tienen poros de $8 \mu\text{m}$. En el ensayo de migración *in vitro*, se aplicó una membrana de PET de baja densidad de poros, obtenidos mediante el método del grabado químico de trazas iónicas ("track etching"), sobre un inserto Falcon para cultivo (BD Bioscience). La membrana se colocó entre los pocillos superiores e inferiores de una cámara de Matrigel o sobre insertos Falcon para cultivo. Las células fueron primero resuspendidas en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10% y fueron sembradas en los pocillos superiores de la cámara (50.000 células por pocillo). Después de una incubación a 37°C durante 24 horas, las células que habían invadido, o migrado a través de, la membrana fueron teñidas con tinte Liu (Handsel Technologies, Inc., Taipei, Taiwan) y fueron contadas bajo un microscopio. Cada experimento se repitió tres veces.

El sistema anteriormente descrito se utilizó para examinar los efectos de z-Bdph sobre la migración e invasión de células DBTRG-05MG (GBM humano). Se halló que z-Bdph inhibía la migración e invasión de células DBTRG-05MG de un modo dependiente de la dosis.

Ejemplo 9: z-Bdph inhibe la migración e invasión tumorales a través de la represión de Axl

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR; del inglés, reverse transcriptase-polymerase chain reaction) para examinar el efecto de z-Bdph sobre el perfil de expresión génica en células de GBM con objeto de elucidar los posibles mecanismos de la inhibición del tumor cerebral maligno por z-Bdph. Se halló que las expresiones de mRNA del receptor tirosina cinasa (RTK; del inglés, receptor tyrosine kinase) Axl resultaban infrarreguladas en presencia de z-Bdph.

Además, la sobreexpresión de Axl (es decir, al transfectar las células de GBM con un plásmido pcDNA3.0-Axl) podía invertir el efecto inhibitorio de z-Bdph sobre la proliferación, migración e invasión, mediadas por Axl, de las células de GBM.

También se llevaron a cabo ensayos por transferencia Western para examinar el nivel de proteína Axl de las células de GBM en presencia de z-Bdph. Los resultados muestran que el nivel de proteína Axl estaba reducido.

Está ahora bien establecido que las proteína tirosina cinasas desempeñan un papel importante en la regulación de la proliferación y la diferenciación celulares y en la génesis de muchas neoplasias, incluyendo el glioma humano. Se ha comunicado que Axl está implicado en la migración e invasión tumorales. Los anteriores resultados sugerían que z-Bdph inhibía la expresión proteica del receptor tirosina cinasa Axl e inhibía por ello la migración e invasión de las células de GBM.

Otras realizaciones

Todas las características descritas en esta memoria descriptiva se pueden combinar en cualquier combinación. Cada característica descrita en esta memoria descriptiva puede ser sustituida por una característica alternativa que sirva para una finalidad igual, equivalente o similar. Por lo tanto, a menos que se indique expresamente otra cosa, cada característica descrita es sólo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende z-butildenftalida y un polímero mezclado con la z-butildenftalida, en donde el polímero es seleccionado del grupo que consiste en poli(ácido láctico-co-glicólico), un quitosano, un colágeno, un polianhídrido y una mezcla de los mismos.
- 5 2. Una formulación farmacéutica de la Reivindicación 1, que consiste en z-butildenftalida y un polímero como el indicado en la Reivindicación 1 mezclado con la z-butildenftalida.
3. La formulación farmacéutica de la Reivindicación 1 o 2, en donde el polianhídrido se prepara a partir de bis(p-carboxifenoxi)propano, bis(p-carboxifenoxi)butano, bis(p-carboxifenoxi)pentano, bis(p-carboxifenoxi)heptano, bis(p-carboxifenoxi)hexano, bis(p-carboxifenoxi)octano, ácido isoftálico, ácido 1,4-fenilendipropiónico, ácido dodecanodioico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azelaico, ácido sebácico, ácido ftálico, ácido tereftálico, o una mezcla de los mismos.
- 10 4. La formulación farmacéutica de la Reivindicación 1 o 2, en donde el polianhídrido se prepara a partir de bis(p-carboxifenoxi)propano, bis(p-carboxifenoxi)hexano, ácido isoftálico, ácido 1,4-fenilendipropiónico, ácido dodecanodioico, ácido sebácico, o una mezcla de los mismos.
- 15 5. La formulación farmacéutica de la Reivindicación 1 o 2, en donde el polianhídrido se prepara a partir de una mezcla de bis(p-carboxifenoxi)propano y ácido sebácico.
6. La formulación farmacéutica de la Reivindicación 5, en donde la relación entre el bis(p-carboxifenoxi)propano y el ácido sebácico es de 1:2 a 1:10.
7. La formulación farmacéutica de la Reivindicación 6, en donde la relación entre el bis(p-carboxifenoxi)propano y el ácido sebácico es de aproximadamente 1:4 a 1:5.
- 20 8. La formulación farmacéutica de la Reivindicación 7, en donde el porcentaje ponderal de la z-butildenftalida es el 3%-20% de la formulación.
9. La formulación farmacéutica de la Reivindicación 8, en donde el porcentaje ponderal de la z-butildenftalida es el 10% de la formulación.
- 25 10. La formulación farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en donde la formulación está en forma de polvos, sellos, hojas, barritas, microesferas, nanoesferas, pasta o adhesivo.
11. La formulación farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en donde el porcentaje ponderal de la z-butildenftalida es el 3%-20% de la formulación.
- 30 12. La formulación farmacéutica de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 11 para uso en el tratamiento de un tumor.
13. La formulación farmacéutica para uso según la Reivindicación 12, en donde el tumor es glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, neuroblastoma, teratoma o leucemia humana.
- 35 14. La formulación farmacéutica para uso según la Reivindicación 12 o 13, en donde la formulación farmacéutica es subcutáneamente implantada, intersticialmente implantada o intracranealmente implantada en el sujeto.
15. La formulación farmacéutica para uso según la Reivindicación 12, 13 o 14, en donde la z-butildenftalida inhibe la proliferación, migración o invasión, mediadas por Axl, de células tumorales.