

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 901**

21 Número de solicitud: 201330803

51 Int. Cl.:

**A61K 31/357** (2006.01)

**A61K 31/7076** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**31.05.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**02.12.2014**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (50.0%)  
Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Pabellón C  
C/ Einstein, 13  
28049 Madrid ES y  
FUNDACIÓN LAIR (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VARGAS NUÑEZ, Juan Antonio;  
CASTEJÓN DÍAZ, Raquel;  
PÉREZ ACIEGO DE MENDOZA, Paloma;  
REBOLLEDA LÓPEZ, Nerea y  
LOSADA FERNÁNDEZ, Ignacio**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **Uso de la deguelina como terapia suplementaria de la leucemia linfoide crónica**

57 Resumen:

Uso de la deguelina como terapia suplementaria de la leucemia linfoide crónica.

La presente invención se refiere al uso de la deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, como terapia suplementaria a una terapia primaria adecuada para el tratamiento de la leucemia linfoide crónica. Particularmente, la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la elaboración de un medicamento para su uso como terapia coadyuvante administrada simultánea, alternativa o sucesivamente a una terapia primaria adecuada para el tratamiento de la leucemia linfoide crónica, donde dicha terapia primaria comprende fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto.

ES 2 523 901 A1

**DESCRIPCIÓN****Uso de la deguelina como terapia suplementaria de la leucemia linfoide crónica.****Campo de la invención**

5

La presente invención se refiere al uso de la deguelina para el tratamiento de la leucemia linfoide crónica. Más concretamente, al uso de una composición que comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la elaboración de un medicamento para su uso como terapia coadyuvante administrada simultánea, alternativa o sucesivamente a una terapia primaria adecuada para el tratamiento de la leucemia linfoide crónica, donde dicha terapia primaria comprende fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto.

10

**Antecedentes de la invención**

15

La leucemia linfoide crónica (LLC) es la leucemia más frecuente en adultos en los países occidentales. En la actualidad continúa siendo una enfermedad incurable de curso clínico muy variable, con una supervivencia media tras el diagnóstico que oscila entre unos pocos meses y varias décadas. Un tercio de los pacientes presenta una enfermedad que puede permanecer estable, en lo que se refiere a linfocitosis y síntomas clínicos; aproximadamente otro tercio presenta una enfermedad agresiva que requiere tratamiento inmediato tras el diagnóstico y una supervivencia inferior a 3 años; y el tercio restante requerirá un tratamiento más tardío. Ciertas características genéticas como el estatus mutacional de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGVH), la expresión de la proteína 70 asociada a la cadena  $\zeta$  (Zap70), la expresión del marcador de superficie CD38 y mutaciones en el gen de la Ataxia telangiectasia (ATM) o en el gen supresor de tumores p53, son marcadores de la progresión tumoral.

20

25

Con la mejora en los marcadores asociados al pronóstico y la respuesta a terapia el tratamiento de la LLC ha cambiado drásticamente en los últimos años. El tratamiento debe ser flexible y adaptado a los distintos grupos de pacientes, empleándose desde agentes alquilantes como el clorambucil hasta el trasplante alogénico con regímenes de inducción de baja intensidad pasando por distintas combinaciones de agentes quimioterápicos e inmunomoduladores. La combinación de la quimioterapia con los anticuerpos monoclonales ha mejorado significativamente las tasas de respuesta y en la actualidad es el tratamiento de primera elección para aquellos pacientes jóvenes que requieren tratamiento. A pesar del cambio drástico que han experimentado los regímenes de tratamiento con la reciente incorporación de los análogos de purina y los anticuerpos monoclonales anti-CD20 y anti-CD52, es muy frecuente la recaída de los pacientes y el desarrollo de quimiorresistencia al fármaco empleado en primera instancia. Por otro lado, el papel del trasplante en el manejo de pacientes LLC como práctica regular todavía no está totalmente definido y por el momento sólo se utiliza en el caso de pacientes de alto riesgo o aquellos que no han respondido a la terapia estándar.

30

35

40

Por tanto, la identificación de nuevos agentes con mecanismos citotóxicos alternativos capaces de complementar las terapias citotóxicas convencionales y que puedan contrarrestar la quimiorresistencia sigue siendo necesaria para futuros avances en el tratamiento de esta enfermedad.

45

**Breve descripción de la invención**

5 Constituye el objeto de la presente invención la identificación de nuevos agentes con  
mecanismos citotóxicos alternativos capaces de complementar las terapias convencionales  
existentes frente a la leucemia linfóide crónica. Particularmente, constituye el objeto de la  
presente invención el uso de la deguelina como terapia suplementaria o coadyuvante  
10 administrada simultánea, alternativa o sucesivamente a una terapia primaria adecuada para el  
tratamiento de la leucemia linfóide crónica. Dicha terapia suplementaria o coadyuvante resulta  
especialmente adecuada para el tratamiento de la leucemia linfóide crónica ya que los autores de  
la presente invención han demostrado como su administración alarga la supervivencia y reduce  
la infiltración tumoral en un modelo murino de esta enfermedad respecto los controles y a los  
tratados solo con una terapia primaria.

15 Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que  
comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la  
elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de la leucemia linfóide crónica.

20 Un segundo aspecto de la invención, se refiere al uso de una composición que comprende  
deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la elaboración  
de un medicamento para su uso como terapia coadyuvante administrada simultánea, alternativa o  
sucesivamente a una terapia primaria adecuada para el tratamiento de la leucemia linfóide  
crónica.

25 Una realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al uso de una  
composición que comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este  
compuesto, para la elaboración de un medicamento para su uso como terapia coadyuvante  
administrada simultánea, alternativa o sucesivamente a una terapia primaria adecuada para el  
tratamiento de la leucemia linfóide crónica, donde dicha terapia primaria comprende fludarabina  
30 o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto. En una realización preferida  
dicha composición que comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de  
este compuesto, se administra simultáneamente a una terapia primaria adecuada para el  
tratamiento de la leucemia linfóide crónica, donde dicha terapia primaria comprende fludarabina  
35 o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención la terapia coadyuvante  
comprende la administración máxima diaria de una concentración de deguelina menor o igual a  
12 mg/m<sup>2</sup> y la terapia principal o primaria comprende la administración máxima diaria de una  
40 concentración de fludarabina menor o igual a 105 mg/m<sup>2</sup>.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, la terapia coadyuvante  
comprende la administración máxima diaria de una concentración de deguelina menor de 12  
mg/m<sup>2</sup> y la terapia principal o primaria comprende la administración máxima diaria de una  
45 concentración de fludarabina menor de 25 mg/m<sup>2</sup>.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, la terapia coadyuvante comprende la administración máxima diaria de una concentración de deguelina menor de 12 mg/m<sup>2</sup> y la terapia principal o primaria comprende la administración máxima diaria de una concentración de fludarabina menor de 13 mg/m<sup>2</sup>.

- 5 En aún otra realización preferida de la invención, la terapia coadyuvante comprende la administración máxima diaria de una concentración de deguelina menor de 6 mg/m<sup>2</sup> y la terapia principal o primaria comprende la administración máxima diaria de una concentración de fludarabina menor de 13 mg/m<sup>2</sup>.

Por ultimo, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un kit que comprende:

10

a) una cantidad de fludarabina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una primera unidad de dosis

15

b) una cantidad de deguelina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una segunda unidad de dosis, y

c) un medio contenedor de la primera y la segunda unidades de dosificación.

20

La cantidad de fludarabina por unidad de dosis es menor o igual a 105mg/m<sup>2</sup>, preferentemente menor a 25mg/m<sup>2</sup>; más preferentemente menor a 13mg/m<sup>2</sup>, mientras que la cantidad de deguelina por unidad de dosis es menor o igual a 12 mg/m<sup>2</sup> y preferentemente menor a 6mg/m<sup>2</sup>.

25

El contenedor puede ser dividido o no dividido y las formas unitarias de dosificación pueden ser ambas orales o una oral y la otra parenteral.

### **Breve descripción de las figuras**

30

**Fig.1** Estructura de la deguelina

35

**Fig. 2** Esta figura muestra el efecto citotóxico específico de la deguelina en células de pacientes de LLC y de controles sanos con cantidades crecientes de deguelina (0-10 μM) a las 24 y 48h de cultivo. (A) Se muestran células mononucleares cultivadas en presencia de cantidades crecientes de deguelina. (B) Se muestra como la deguelina actúa preferentemente sobre los linfocitos B tumorales de pacientes de LLC. En este sentido, se ilustran los resultados de un paciente LLC y un control sano. En gris linfocitos totales y en negro la subpoblación seleccionada por los marcadores de superficie indicados en cada caso.

40

**Fig.3** Esta figura muestra como la deguelina induce despolarización de la membrana mitocondrial. (A) Células de un paciente de LLC y un individuo sano se incubaron con cantidades crecientes de deguelina: 0; 0.1; 1 y 10μM (de los paneles centrales hacia el fondo) o con 50 μM de CCCP, utilizado como control de despolarización (en el fondo de los paneles control),y en presencia de 7.6 μM del indicador fluorescente JC1. Tras 24h en cultivo se analizaron por citometría de flujo. (B) La deguelina induce apoptosis mediante la activación de

caspasas. Células de un paciente representativo de LLC se incubaron en presencia o ausencia de deguelina (DEG, 10  $\mu$ M) y en presencia o ausencia del inhibidor de caspasas (ZVAD, 50  $\mu$ M). Después de 16 h en cultivo se cuantificó el porcentaje de células viables mediante la doble tinción AnexinaV/ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo.

5

**Fig. 4** Efecto del cocultivo con LTK y su validez como modelo de actividad sostenida de PI3K. El bloqueo de PI3K contrarresta la inhibición de la actividad de caspasas y restaura la apoptosis espontánea en células LLC. (A) Linfocitos purificados de 7 pacientes de LLC se cultivaron en medio de cultivo solo o en cocultivo con una monocapa de células LTK con o sin preincubación con el inhibidor de PI3K wortmanina. Tras 48 h de cultivo las células de LLC se recuperaron y el porcentaje de células viables en cada condición de cultivo se cuantificó mediante la doble tinción con anexina/ioduro de propidio. (B) El porcentaje de células positivas para caspasa-3 activa se determinó por citometría de flujo usando anticuerpos específicos. Se muestra la media más desviación estándar y un análisis representativo de citometría. (C) Un Western blot representativo mostrando la fragmentación del sustrato de caspasa-3, PARP. El anticuerpo utilizado reconoce tanto las formas intactas de 116 Kd como los fragmentos de 85 Kd. (D) El cocultivo con LTK previene de la pérdida de la actividad PI3K/ATK en células LLC. Células LLC purificadas se cultivaron con medio solo, o con LTK tras una incubación previa con un inhibidor de PI3K (wortmanina o LY294002) y también en presencia o ausencia de anticuerpos anti-CD40 (0.5  $\mu$ g/ml). Análisis de la activación de AKT en tres pacientes representativos. Lisados proteicos totales se prepararon a partir de las células inmediatamente tras su aislamiento (no culture) y a partir de células cultivadas en las condiciones indicadas durante 48h. Los lisados proteicos se resolvieron por SDS-PAGE seguida de western blot utilizando un anticuerpo Ser473P-AKT. Los blots se lavaron y se volvieron a incubar con un anticuerpo anti AKT total. (E) muestra la evaluación densitométrica de los resultados de western. Se representa la actividad AKT en cada condición relativa a la de células LLC cultivadas en medio de cultivo solo (la banda de AKT total se utilizó como control para la normalización de las muestras). Se representa la media y desviación estándar de 6 muestras. (F) La actividad PI3K mediada por el contacto con LTK conduce a la activación de NF-kB en células LLC. Células de 3 pacientes de LLC se cultivaron en medio de cultivo, con LTK con o sin preincubación con wortmanina y con LTK y anticuerpos anti-CD40. Se prepararon extractos nucleares a partir de células LLC inmediatamente tras su aislamiento (no culture) o tras 48h de cultivo (ns indica bandas inespecíficas). Los extractos nucleares se analizaron por EMSA usando una sonda marcada con capacidad de unión a NF-kB.

35

**Fig. 5** La actividad sostenida de PI3K reduce el efecto apoptótico de la deguelina. Células mononucleares de 30 pacientes de LLC se incubaron con concentraciones crecientes de deguelina en presencia o ausencia de LTK. Tras 48 h de cultivo las células se recuperaron y el porcentaje de células viables en cada condición de cultivo se cuantificó mediante la doble tinción con anexinaV/ioduro de propidio y citometría de flujo. Se representa la media y desviación estándar. Se muestran los valores promedio y desviación estándar del efecto apoptótico específico de la deguelina a distintas dosis. Se señalan las dosis que inducen apoptosis en el 50% de las células (EC50) cuando se cultivan en presencia o ausencia de LTK.

45

**Fig. 6** La actividad sostenida de PI3K reduce efecto citotóxico de la fludarabina. Células de 8 pacientes de LLC se cultivaron con cantidades crecientes de fludarabina en presencia o ausencia

de LTK. Se muestran los valores promedio y desviación estándar del efecto citotóxico específico de la fludarabina a distintas dosis. Se señalan las dosis que inducen apoptosis en el 50% de las células (EC50) cuando se cultivan en presencia o ausencia de LTK.

5 **Fig. 7** El pretratamiento con deguelina sensibiliza a las células LLC frente a la acción de la fludarabina incluso en presencia de contacto LTK. Células de 14 pacientes de LLC se preincubaron durante 1h con cantidades crecientes de deguelina y a continuación con 1 ug/ml de fludarabina (barras negras). Después de 48h en cultivo en presencia (A) o ausencia de LTK (B) se cuantificó el porcentaje de células viables mediante la doble tinción AnexinaV/ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. Se representa la media y desviación estándar (\*t-Student  $p < 0.01$ ).

15 **Fig. 8** A diferencia del inhibidor de NF- $\kappa$ B BAY-117821 la deguelina sensibiliza a las células LLC frente a la acción de la fludarabina incluso en presencia de LTK. (B) Células de 15 pacientes de LLC se preincubaron durante 1h con 10  $\mu$ M de deguelina o con 5  $\mu$ M BAY-117821 (en 7 de los 15 pacientes) y a continuación con 1  $\mu$ M de fludarabina. Después de 48h en cultivo en presencia o ausencia de LTK se cuantificó el porcentaje de células viables mediante la doble tinción AnexinaV/ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. Se muestra la media y la desviación estándar.

20 **Fig. 9** La deguelina actúa de forma sinérgica con la fludarabina sobre células. Células de 8 pacientes de LLC se incubaron con cantidades crecientes de fludarabina, deguelina y combinaciones de ambas en una ratio constante 1:2. Después de 48h en cultivo en presencia o ausencia de LTK se cuantificó el porcentaje de células viables mediante la doble tinción AnexinaV/ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. A partir de estos datos y utilizando el software CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK) se calculó el efecto citotóxico (ED) a las distintas dosis empleadas, así como los índices de combinación de dosis (CI) utilizando el método de Chou-Talalay (Chou 2006). (A) Se representa el índice de combinación de dosis calculado para los valores de efecto citotóxico del 50%, 75% y 90% medido en presencia y ausencia de contacto con LTK. La línea horizontal en 1 marca el límite por debajo del cual los valores de CI indican sinergia. Para su comparación se muestran los resultados obtenidos con otra combinación que resultó antagónica clorambucil/deguelina a ratio constante 1:10 (B).

35 **Fig. 10** La combinación con deguelina permite reducir la dosis efectiva fludarabina. Células de 8 pacientes de LLC se incubaron con cantidades crecientes de fludarabina, deguelina y combinaciones de ambas en una ratio constante 1:2. Después de 48h en cultivo en presencia o ausencia de LTK se cuantificó el porcentaje de células viables mediante la doble tinción AnexinaV/ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. A partir de estos datos y utilizando el software CalcuSyn se calculó el efecto citotóxico (ED) a las distintas dosis empleadas, así como los índices de reducción de dosis (DRI) utilizando el método de Chou-Talalay. Para su comparación se muestran los resultados obtenidos con otra combinación clorambucil/deguelina a ratio constante 1:10.

45 **Fig. 11** La cepa NZB presenta en edades avanzadas y de forma espontánea una linfoproliferación B de fenotipo B220lowCD5lowIgM+ con una aneuploidía característica. Estas células tumorales se acumulan fundamentalmente en bazo, ascítico y ganglio. Tras el sacrificio

de los ratones se extrajeron los órganos linfoides y a partir de ellos se aislaron y purificaron las células mononucleares. Las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales frente a proteínas de superficie para la identificación de subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo. Para la identificación de aneuploidías las células se permeabilizaron y el DNA se cuantificó mediante la tinción con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo utilizando el software ModFit™ (Verity software House, Inc., Topsham, ME, USA ). (A) Ejemplar representativo joven sin enfermedad establecida. (B) Ejemplar representativo de 15 meses de edad con enfermedad establecida y presencia de células tumorales (←) en bazo, ascítico y sangre.

**Fig. 12** Infiltrado tumoral presente en bazo (A,B) y ganglio (C, D), médula ósea (E,F) e hígado (G,H) en un ratón NZB adulto representativo con enfermedad establecida. Tinción con hematoxilina /eosina.

**Fig. 13** In vivo la deguelina reduce la presencia de células tumorales en el bazo de ratones NZB. A ratones NZB adultos con neoplasia establecida se les administró deguelina a razón de 4 mg/kg por vía intragástrica, dos veces al día durante 3 días consecutivos, tras lo cual se sacrificaron para la posterior extracción de órganos. A continuación se aislaron y purificaron las células mononucleares a partir del bazo para el análisis de su fenotipo (paneles superiores) y ciclo celular (paneles inferiores) por citometría de flujo. Se muestran imágenes representativas de un animal no tratado (paneles izquierdos) y uno tratado (paneles derechos)(← células tumorales).

**Fig. 14** In vivo la deguelina reduce la actividad AKT de células esplénicas en ratones NZB. A ratones NZB adultos con neoplasia establecida se les administró deguelina a razón de 4 mg/kg por vía intragástrica dos veces al día durante 3 días consecutivos tras lo cual se sacrificó a los animales. Tras la extracción del bazo y su inclusión en parafina se realizó el análisis inmunohistoquímico utilizando un anticuerpo monoclonal específico para Ser473P-AKT y su revelado con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa. Se muestra la tinción diferencial entre las muestras de un ratón no tratado (paneles izquierdos) y tratado (paneles derechos). 10x Paneles superiores, 40x paneles inferiores.

**Fig. 15** In vivo la deguelina reduce la traslocación al núcleo de p65, y por tanto la actividad NF- $\kappa$ B, en células esplénicas en ratones NZB. A ratones NZB adultos con neoplasia establecida se les administró deguelina a razón de 4 mg/kg por vía intragástrica dos veces al día durante 3 días consecutivos tras lo cual se sacrificó a los animales. Tras la extracción del bazo y su inclusión en parafina se realizó el análisis inmunohistoquímico utilizando un anticuerpo monoclonal específico para p65 y su revelado con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa. Se muestra el patrón diferencial de tinción entre las muestras de un ratón no tratado (tinción citoplásmica y nuclear, paneles izquierdos) y tratado (tinción citoplásmica, paneles derechos). 10x Paneles superiores, 40x paneles inferiores.

**Fig. 16** In vivo la deguelina reduce la expresión de proteínas moduladas por la actividad AKT como la survivina, en células esplénicas (Jin et al. 2007). A ratones NZB adultos con neoplasia establecida se les administró deguelina a razón de 4 mg/kg por vía intragástrica dos veces al día durante 3 días consecutivos tras lo cual se sacrificó a los animales. Tras la extracción del bazo y su inclusión en parafina se realizó el análisis inmunohistoquímico utilizando un anticuerpo específico para Survivina y su revelado con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa. Se

muestra la tinción diferencial entre la muestra de un ratón no tratado (panel izquierdo) y tratado (panel derecho). 10x.

**Fig. 17** El tratamiento combinado fludarabina/deguelina incrementa la supervivencia de ratones NZB. 40 ratones NZB con neoplasia establecida se dividieron en grupos de 10 individuos. A un grupo se le suministraron dosis de 35 mg/kg de fludarabina por vía intraperitoneal, los 5 primeros días de cada mes durante 3 meses. A otro grupo dosis de deguelina de 4 mg/kg por vía intragástrica diluida en aceite de maíz a razón de 3 días a la semana durante 3 meses. A un tercer grupo se le suministró la combinación de deguelina y fludarabina con las pautas anteriores y al último grupo se le administraron únicamente los vehículos en los que se disolvieron las drogas y siguiendo las mismas pautas. Finalizado el periodo de tratamiento los animales se mantuvieron bajo observación y se sacrificaron en el momento que cumplían criterios de punto final tras lo cual se realizó un de supervivencia (\* $p < 0.05$  comparado con la condición “Deguelina + fludarabina”).

**Fig. 18** El tratamiento combinado fludarabina/deguelina reduce el grado de esplenomegalia en ratones NZB. Tras el sacrificio de los animales incluidos en el estudio de supervivencia se determinó el tamaño y peso de los bazo y se realizaron inclusiones en parafina de un fragmento del órgano. (A) Esplenomegalia y patrón de infiltración del bazo en un animal no tratado representativo comparado con otro tratado. Se cuantificó el peso relativo del bazo referido al peso del animal. (B) Se representa la media  $\pm$  desviación estándar del porcentaje del peso del bazo respecto al del animal, agrupados por tratamiento.

**Fig. 19** El tratamiento combinado fludarabina/deguelina reduce el grado de infiltración tumoral en órganos linfoides en ratones NZB. Tras el sacrificio de los animales incluidos en el estudio de supervivencia se extrajeron los órganos linfoides y se realizaron inclusiones en parafina de un fragmento de cada órgano. Se muestra el patrón de infiltración tumoral en una animal control representativo: bazo (A,B) y médula ósea (C,D) y el patrón de infiltración tumoral en una animal tratado con fludarabina y deguelina: bazo (E, F) y médula ósea (G,H). Tinción hematoxilina-eosina.  $\uparrow$  indica células de alto índice mitótico.

**Fig. 20** El tratamiento combinado deguelina/fludarabina reduce el grado de anemia hemolítica en ratones NZB. En las muestras de sangre obtenidas en el momento del sacrificio por punción cardíaca se realizó un hemograma. (A) Se representan la media y desviación estándar en cada grupo de tratamiento de distintos parámetros expresados en las unidades indicadas en el gráfico. (B) Los anticuerpos anti-hematíes se cuantificaron mediante la tinción de hematíes lavados por citometría de flujo con un anticuerpo secundario frente a inmunoglobulinas de ratón. Se representa el cociente entre la intensidad media de fluorescencia (MFI) en presencia del anticuerpo frente a inmunoglobulinas de ratón respecto a un control negativo. (\*Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ , \*\*U-Mann Whitney  $p < 0.05$ ).

**Fig. 21** El tratamiento combinado deguelina/fludarabina no empeora los perfiles hepático (A) y renal (B). Inmediatamente tras el sacrificio de los ratones incluidos en el estudio de supervivencia se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca para la realización de un perfil bioquímico. Se representan la media y desviación estándar en cada grupo de tratamiento de distintos parámetros expresados en las unidades indicadas en el gráfico.

5 **Fig. 22** El tratamiento combinado de guelina/fludarabina no modifica significativamente el perfil de inmunoglobulinas. Inmediatamente tras el sacrificio de los ratones incluidos en el estudio de supervivencia se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca para la cuantificación de inmunoglobulinas por ELISA. Se representan la media y desviación estándar en cada grupo de tratamiento en las unidades indicadas en el gráfico.

10 **Fig. 23.** Isobogramas de interacción de una combinación de dos sustancias A y B. Relacionan las dosis equiefectivas de cada uno de los fármacos aislados y de su combinación de ambos para una fracción afectada determinada. Se muestran ejemplos tipo de la interacción 0 o aditividad (A), de la interacción sinérgica (B) y de la interacción antagónica (C).

### 15 **Descripción de la invención**

#### 15 - **Definiciones**

20 En el contexto de la presente invención se entiende por leucemia linfática crónica un trastorno de linfocitos B morfológicamente maduros pero inmunológicamente menos maduros, y se manifiesta por la acumulación progresiva de estas células en la sangre, médula ósea y tejido linfático. En este trastorno, el recuento de linfocitos en la sangre generalmente es mayor o igual a 5.000/mm<sup>3</sup> con un inmunofenotipo característico (linfocitos B positivos para CD5 y CD23). La LLC se presenta principalmente en pacientes de mediana edad y ancianos, con un curso clínico que evoluciona de una linfocitosis poco activa sin otra enfermedad evidente a un estado que  
25 presenta aumento generalizado de volumen linfático con pancitopenia concomitante. Las complicaciones de la pancitopenia, incluyendo hemorragia e infección, son la causa principal de muerte en estos pacientes. Aberraciones inmunológicas, incluyendo anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia inmune y concentraciones reducidas de inmunoglobulina pueden complicar el manejo de LLC.

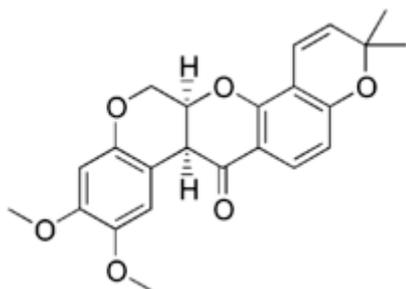
30 En el contexto de la presente invención se entiende como terapia primaria, el utilizado actualmente en la práctica clínica para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica. Particularmente, como terapia primaria se entiende la utilización de fludarabina.

35 En el contexto de la presente invención, se entiende por tratamiento suplementario o coadyuvante aquel tratamiento que administrado simultánea, alternativa o sucesivamente a una terapia primaria permite aumentar las posibilidades de ralentizar o detener la progresión de la leucemia linfocítica crónica.

40 En el contexto de la presente invención se entiende como guelina al compuesto identificable con número CAS 522-17-8 y la siguiente estructura química:

45

5

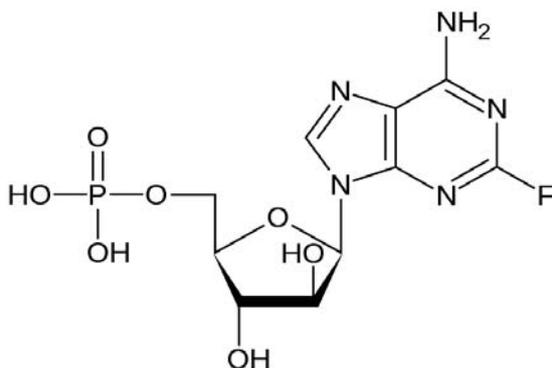


10

En el contexto de la presente invención se entiende como fludarabina al compuesto identificable con número CAS 75607-67-9 y la siguiente estructura química:

15

20



25

30

El procedimiento de estudio de la sinergia y el índice de combinación entre dos drogas empleado en la presente invención, se basa en una ecuación derivada por Chou (Chou 2006) a partir de modelos enzimáticos cinéticos y en la construcción de representaciones gráficas llamadas isobogramas. Para el cálculo de estos parámetros se utilizó el software CalcuSyn© (Biosoft, Cambridge, UK).

35

Brevemente, los isobogramas son representaciones gráficas en un eje de coordenadas de dosis equi-efectivas de dos o más fármacos (para conseguir un determinado efecto o “fracción de células afectadas”). En cada uno de los ejes se representa la dosis equi-efectiva de uno de los fármacos que se estudian ( $D_a$ ) y ( $D_b$ ) respectivamente. Estos dos puntos se unen mediante una línea (isobolo) que también se conoce como línea de aditividad o de no interacción. A continuación se representa el valor de dosis de la combinación de ambos ( $d_a, d_b$ ) que es equi-efectiva con las dosis individuales de los fármacos.

40

45

Cuando los agentes no interaccionan (interacción cero) los puntos que representan las dosis isoeffectivas de la combinación están situados sobre el isobolo formando una línea recta (ver figura 23a). Cada uno de los puntos de esta línea representa una combinación de A y B en la que las sustancias se comportan de modo aditivo es decir, no se produce interacción.

Cuando la combinación es más efectiva que de lo que se espera se requieren menos cantidades de *da* o *db* para producir el mismo efecto, mientras que *Da* y *Db* permanecen inalteradas, con lo que la ecuación se transforma en una desigualdad y define un isobograma cóncavo (sinergia, ver figura 23b).

5

Por otra parte, cuando los agentes en combinación son menos efectivos que lo esperado *da* y/o *db* deberían ser incrementados con el fin de obtener el mismo efecto (antagonismo). La ecuación en este caso describe un isobolo convexo (ver figura 23c).

10 La solución de las ecuaciones anteriores se define como índice de combinación de dosis (CI) el cual evalúa la divergencia entre las dosis de dos o más sustancias que producen un efecto en combinación y aquellas dosis que sería esperado que produjeran el mismo efecto según las curvas dosis-respuesta de los agentes individuales. Este índice se calcula como una función de la fracción de células afectadas de acuerdo con el procedimiento de (Chou 2006). Este es un test  
15 bien conocido que evalúa el coeficiente de interacción de dos drogas en función de un rango de proporciones de muerte celular. Cuando el resultado de la ecuación que relaciona las dosis aisladas y combinadas es igual a uno no existe interacción y los efectos son aditivos. Cuando el CI es mayor que uno se produce una interacción de tipo antagónico e inversamente, cuando es menor que uno se produce sinergia. El CI de dos drogas puede variar en función de la fracción  
20 afectada para la que se construye el isobograma, por eso se suelen generar isobogramas a distintos niveles de efecto. En nuestro caso EC50, EC75 y EC90 (valores del 50%, 75% y 90% de apoptosis).

25 Otro factor matemático derivado de las ecuaciones anteriores es el Índice de reducción de dosis (DRI) que indica el grado de reducción de la dosis de uno de los fármacos en la combinación, con respecto a la dosis del fármaco que teóricamente es necesaria para producir el mismo efecto ( $DRI_a = da/Da$  y  $DRI_b = db/Db$ ).

30 El DRI es importante en situaciones clínicas en las que la reducción de dosis implica una reducción de la toxicidad de un fármaco mientras mantiene la eficacia terapéutica. Aunque el  $DRI > 1$  es beneficioso no indica necesariamente la existencia de sinergia. Si la droga *a* y la droga *b* inhiben un 50% cada una y  $(0.5a + 0.5b)$  también inhibe un 50%, entonces tienen un efecto aditivo y  $DRI_a = 2$  y  $DRI_b = 2$ . Si ambas drogas no tienen un efecto tóxico solapado, su combinación no ofrecería un beneficio en cuanto a efectividad pero se reduciría a la mitad la  
35 toxicidad de cada una.

#### - Descripción detallada de la invención

40 La LLC se caracteriza por una linfocitosis de células B CD19+CD5+CD23+, clonales y maduras, que expresan receptores de antígeno en baja densidad. Las células de LLC se acumulan en la médula ósea y otros tejidos linfoides como los ganglios y el bazo, donde proliferan en los llamados centros de proliferación. En la sangre periférica de los pacientes se observan muy pocas células en división, por lo que clásicamente se ha considerado una enfermedad acumulativa  
45 causada por defectos en la apoptosis. Se piensa que son las señales de supervivencia que las células LLC reciben del microambiente in vivo (antígeno, CD40L, interleucinas, quimiocinas,

moléculas de adhesión...) las que confieren a estas células una mayor resistencia a la apoptosis, ya que cuando se cultivan in vitro sufren apoptosis espontánea a no ser que se co-cultiven en presencia de células accesorias como células estromales de médula ósea o nurse-like cells derivadas de células mononucleares. La interrelación entre las células LLC y las células de soporte en el microambiente tisular comprende una compleja red de señales que son críticas para la progresión de la enfermedad y la resistencia a la acción de las drogas quimioterápicas. Parece que la progresión a la quimiorresistencia puede ser una consecuencia de la elevada expresión de proteínas antiapoptóticas y la activación constitutiva de rutas metabólicas que favorecen la supervivencia como es el caso de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K). Por tanto la interferencia en esta red de señalización constituye una interesante diana terapéutica.

La PI3K kinasa integra y transmite señales de diversas moléculas de superficie de los linfocitos B como el receptor de antígeno BCR, los receptores de quimiocinas y las moléculas de adhesión regulando de esta forma funciones celulares clave como el crecimiento, la supervivencia y la migración. Las PI3K se dividen en tres grupos I, II y III. Las kinasas de tipo I comprenden cuatro isoformas designadas PI3K  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Mientras que las formas  $\alpha$  y  $\beta$  se expresan de forma ubicua, las formas  $\gamma$  lo hacen en linfocitos T y las formas  $\delta$  están restringidas a la línea hematopoyética y tienen un papel crítico en linfocitos B. Con la vía de PI3K jugando un papel tan diverso en la regulación de la supervivencia y apoptosis, se podría llegar a considerar una diana para el tratamiento de neoplasias de linfocitos B, entre ellas la LLC, que se caracteriza por una supervivencia prolongada de las células tumorales. Sin embargo la inhibición de la vía PI3K se ha demostrado que es muy compleja, puesto que se trata de una vía implicada en el mantenimiento de multitud de tipos celulares y crítica en diversos procesos metabólicos.

En la actualidad los regímenes de tratamiento de la leucemia linfocítica crónica incluyen combinaciones de fludarabina y anti-CD20 o fludarabina/ciclofosfamida y anti-CD20. Sin embargo, en ancianos y pacientes con determinados procesos co-mórbidos esta aproximación puede resultar excesivamente tóxica por lo que en estos casos el tratamiento de elección es el clorambucil.

Entre los principales efectos secundarios de la fludarabina están la toxicidad hematológica, que aparece en la mayoría de los pacientes, y la inmunodeficiencia secundaria al tratamiento que se presenta con hipogammaglobulinemia y aumento de la susceptibilidad a infecciones. Por ello habitualmente los pacientes necesitan tratamiento profiláctico con antibióticos y antivirales. También puede aparecer anemia hemolítica autoinmune que generalmente se resuelve con inmunosupresores, pero esto a su vez compromete la susceptibilidad a infección.

Una posible alternativa para estos pacientes sería introducir regímenes basados en fludarabina a dosis atenuadas, en combinación con otros agentes que mantengan una buena eficacia.

Con este propósito los autores de la presente invención estudiaron posibles combinaciones farmacológicas basadas en fludarabina a dosis atenuadas, que permitieran una buena eficacia y una reducción significativa de los efectos secundarios asociados a la fludarabina. En este sentido, uno de los fármacos estudiados para actuar en combinación con la fludarabina fue la deguelina.

Así, tal y como se muestra en el ejemplo 1, los autores de la presente invención han demostrado como la deguelina utilizada de forma aislada (cultivo ex vivo), induce apoptosis en células de pacientes con leucemia linfocítica crónica. Sorprendentemente el efecto citotóxico es mayor en pacientes que en controles sanos (Fig.2A) y afecta en mayor medida a células tumorales que a las células normales del mismo paciente o de controles sanos (Fig.2B). No obstante, tal y como se ha comentado anteriormente, en el caso de la LLC la activación constitutiva de PI3K/Akt/NF-kB se mantiene gracias a señales del microambiente de la célula tumoral existentes in vivo, que favorecen su supervivencia, entre ellos el CD154 de los linfocitos T, la interleucina-4, el receptor de antígeno y el plasma autógeno. Además, la activación de la ruta de PI3K confiere resistencia a la quimioterapia. Estas señales se pierden en el cultivo ex vivo, lo cual dificulta el estudio del papel de dicha actividad en la quimiorresistencia, así como el efecto que tendría su bloqueo en la sensibilización a otras drogas.

Por tanto, para poder verificar si la deguelina presentaba dicho efecto citotóxico *in vivo*, resultaba necesario ensayar dicha molécula en un cultivo que permita mantener dichas señales, así, con este propósito, los autores de la presente invención utilizaron el co-cultivo sobre monocapas de fibroblastos de ratón transfectados con CD32 (Ltk-). Este co-cultivo permite mantener activa de forma sostenida la vía de PI3K/Akt/NF-kB, incrementando la viabilidad en cultivo de células LLC e inhibiendo la activación de caspasas. Por tanto, este modelo permite predecir de una forma más ajustada cuál sería el comportamiento *in vivo* de las células de LLC tratadas con agentes citotóxicos, especialmente el de aquellas presentes en tejidos linfoides.

Así tal y como se demuestra en el ejemplo 2, la actividad sostenida de PI3K reduce el efecto apoptótico de la deguelina como indican las diferencias encontradas en las dosis necesarias para inducir apoptosis en el 50% de las células LLC (EC50) cuando se cultivan en presencia o ausencia de LTK: 6.1  $\mu\text{M}$  y 2.91  $\mu\text{M}$  respectivamente (Fig. 5). No obstante, la actividad sostenida de PI3K también reduce el efecto apoptótico de la fludarabina como indican las diferencias encontradas en las dosis necesarias para inducir apoptosis en el 50% de las células LLC (EC50) cuando se cultivan en presencia o ausencia de LTK: 4.33  $\mu\text{M}$  y 1.16  $\mu\text{M}$  respectivamente (Fig. 6). Este incremento resulta sorprendente ya que es aproximadamente un 75% mayor que el necesario en el caso de la deguelina, lo cual constituye un importante hallazgo ya que evidencia la utilidad de la deguelina como agente útil para el tratamiento de LLC.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica, preferiblemente la leucemia linfocítica crónica humana.

Sin perjuicio de lo anterior y con el propósito de seguir estudiando posibles combinaciones farmacológicas basadas en fludarabina a dosis atenuadas, que permitan una buena eficacia y una reducción significativa de los efectos secundarios asociados a la fludarabina. Los autores de la presente invención, llevaron a cabo el pre-tratamiento con deguelina que se refleja en el ejemplo 3 con el objeto de sensibilizar a las células LLC frente a la posterior acción de la fludarabina, incluso en situación de actividad sostenida de PI3K (Fig. 7).

Los resultados mostraron que la combinación concreta de fludarabina con deguelina mejora la acción de la fludarabina sobre células LLC y que ambas drogas interaccionan de manera sinérgica sobre células LLC incluso en situación de actividad sostenida de PI3K. Así, la combinación de ambas drogas muestra un valor inferior a 1 en los índices de combinación de dosis (CIs) (calculados por el método de Chou-Talalay): (Fig. 9A). Por el contrario, sorprendentemente la combinación de deguelina con otro agente quimioterápico utilizado en el tratamiento de LLC (clorambucil) mostró una interacción antagónica con valores de CI muy superiores a 1 (Fig. 9B). Tampoco ocurre lo mismo cuando en vez de utilizar deguelina se utiliza la combinación de fludarabina con otro inhibidor de la misma ruta que la deguelina, como el inhibidor de NF-kB BAY-117821 (Fig. 8).

Por lo tanto, estos ensayos demuestran como la concreta combinación de fludarabina con deguelina permite reducir la dosis efectiva fludarabina entre 2 ó 3 veces manteniendo un buen efecto citotóxico tal y como indican los valores de índice de reducción de dosis calculados por el método de Chou-Talalay (Fig. 10).

En base a estos resultados, se puede concluir que la combinación de fludarabina con deguelina mejora la acción de estos fármacos sobre células LLC haciendo que esta combinación interaccione de forma sinérgica sobre células LLC incluso en situación de actividad sostenida de PI3K.

Por lo tanto, un segundo aspecto de la invención, se refiere al uso de una composición que comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la elaboración de un medicamento para su uso como terapia coadyuvante administrada simultánea, alternativa o sucesivamente a una terapia primaria adecuada para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica, preferiblemente la leucemia linfocítica crónica humana., donde preferiblemente dicha terapia primaria comprende fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto. En particular, un aspecto preferido de este segundo aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la elaboración de un medicamento para su uso como terapia coadyuvante administrada simultáneamente a una terapia primaria adecuada para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica, preferiblemente la leucemia linfocítica crónica humana, donde preferiblemente dicha terapia primaria comprende fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto.

Las dosificaciones efectivas y los calendarios de administración de las composiciones descritas en el segundo aspecto de la presente invención pueden ser determinadas empíricamente. Los intervalos de dosificación para la administración de dichas composiciones son aquellos lo suficientemente grandes para producir el deseado efecto anti-cancerígeno pero no tan elevados que causen efectos secundarios adversos graves. La dosificación variará con la edad, condición, sexo y extensión de la enfermedad en el paciente así como con la vía de administración. La dosificación puede ser ajustada por el médico en el supuesto de cualquier contraindicación. Las dosis pueden variar y pueden ser administradas en una o más dosis diarias, a lo largo de uno o varios días.

Sin perjuicio de lo anterior, a partir de los datos experimentales llevados a cabo por los autores de la presente invención, se ha realizado un escalado a partir de los datos obtenidos en ratones a humanos que permite determinar las dosis máximas de los compuestos descritos en el segundo aspecto de la invención. A partir de las dosis efectivas en su modelo experimental y en otros similares se han estimado una dosis aproximadas para una superficie equivalente en otra especie, en este caso en humanos utilizando la relación:

$$\text{Dosis en humano (mg/kg)} = \text{Km animal} / \text{Km humano} \times \text{Dosis en animal (mg/kg)}.$$

Los factores aproximados para la conversión de la dosis utilizada en una especie (en mg/kg) a la dosis recomendada para una superficie equivalente en otra especie (en mg/kg) son conocidos y están tabulados a partir de las consideraciones y constantes descritas en: Freireich, EJ, et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, dog, monkey and man. Cancer Chemother Rep.1966;50(4):219-244. También son conocidas las constantes que relacionan la superficie corporal media con el peso pedio (Km) y que son características de cada especie.

A continuación mostramos la tabla a partir de la cual se han realizado las extrapolaciones de dosis en humanos que se describen a lo largo de la presente invención.

| FLUDARABINA, estudios en ratón |                           |                                      |                  | Equivalencia en humano |        |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------------------|------------------------|--------|
| Cepa                           | Modelo de estudio         | Referencia                           | Dosis max mg/día | mg/kg*                 | mg/m2† |
| C57BL                          | xenografo leucemia (P388) | Brockman, 1980, Cancer Res., 40:3610 | 150              | 12.16                  | 450    |
| C57BL                          | xenografo leucemia (P388) | Avramis, 1982, Cancer Res., 42:2587  | 52               | 4.22                   | 156    |
| SCID                           | xenografo LLC             | Bai L, 2000, Oncolgy Reports, 7:33   | 135              | 10.95                  | 405    |
| B1/B6                          | trasgénico LLC            | Jhonson, 2006, Blood, 108:1334       | 34               | 2.76                   | 102    |
| NZB                            | espontáneo LLC            | presente estudio                     | 35               | 2.84                   | 105    |

| DEGUELINA, estudios en animales |                          |   |                  | Equivalencia en humano |        |
|---------------------------------|--------------------------|---|------------------|------------------------|--------|
| Cepa                            | Modelo de estudio        | Referencia                                  | Dosis max mg/día | mg/kg*                 | mg/m2† |
| A/J                             | xenografo Ca pulmón      | Yan, 2005, Neoplasia, 7:1053                | 10               | 0.81                   | 30     |
| CF1                             | xenografo Ca colon       | Murillo, 2003, Int. J. Cancer. 104:7        | 10               | 0.81                   | 30     |
| Nude                            | xenografo Ca estómago... | Oh, et al , 2007, J.Natl. Can Inst., 99:949 | 8                | 0.65                   | 24     |
| A/J                             | xenografo Ca pulmón      | Lee, 2005, J.Natl. Can Inst., 97:1695       | 4                | 0.32                   | 12     |
| NZB                             | espontáneo LLC           | presente estudio                            | 4                | 0.32                   | 12     |

\* Factor de conversion asumiendo un peso medio de 60 kg en humanos= 0.08

† Factor Km de conversión en humanos (peso corporal en Kg/área corporal en m<sup>2</sup>)= 37

Así en una realización preferida del segundo aspecto de la invención y basándonos en la extrapolación realizada por los autores de la presente invención, la terapia coadyuvante comprende la administración máxima diaria de una concentración de deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto menor o igual a 12 mg/m<sup>2</sup> y la terapia principal

o primaria comprende la administración máxima diaria de una concentración de fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto menor o igual a  $105 \text{ mg/m}^2$ .

5 En otra realización preferida, la terapia coadyuvante comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto y la cantidad de deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto por unidad de dosis es menor o igual a  $12 \text{ mg/m}^2$  y la terapia principal o primaria comprende fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto y la cantidad de fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto por unidad de dosis es menor o igual a  $105$   
10  $\text{mg/m}^2$ .

Adicionalmente, se hace notar que las dosis reflejadas en la tabla para humanos se pueden reducir hasta en un 75%, preferiblemente hasta en un 90% (de hecho las dosis utilizadas hoy en día de fludarabina en humanos adultos son de aproximadamente  $25 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ ), lo que nos  
15 permite aseverar que en otra realización preferida de la invención, la terapia coadyuvante comprende la administración máxima diaria de una concentración de deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto menor a  $12 \text{ mg/m}^2$  y la terapia principal o primaria comprende la administración máxima diaria de una concentración de fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto menor de  $25 \text{ mg/m}^2$ .

20 En otra realización preferida, la terapia coadyuvante comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto y la cantidad de deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto por unidad de dosis es menor o igual a  $12 \text{ mg/m}^2$  y la terapia principal o primaria comprende fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto y la cantidad de fludarabina o sales o ésteres  
25 farmacéuticamente aceptables de este compuesto por unidad de dosis es menor o igual a  $25 \text{ mg/m}^2$ .

Más aún las dosis utilizadas hoy en día de fludarabina en humanos ancianos, debido a la alta toxicidad de este fármaco, son de aproximadamente  $13 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ . Por lo tanto, en otra  
30 realización preferida de la invención, la terapia coadyuvante comprende la administración máxima diaria de una concentración de deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto menor a  $12 \text{ mg/m}^2$  y la terapia principal o primaria comprende la administración máxima diaria de una concentración de fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto menor de  $13 \text{ mg/m}^2$ .

35 En otra realización preferida, la terapia coadyuvante comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto y la cantidad de deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto por unidad de dosis es menor o igual a  $12 \text{ mg/m}^2$  y la terapia principal o primaria comprende fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto y la cantidad de fludarabina o sales o ésteres  
40 farmacéuticamente aceptables de este compuesto por unidad de dosis es menor o igual a  $13 \text{ mg/m}^2$ .

En otra realización preferida de la invención, la terapia coadyuvante comprende la administración máxima diaria de una concentración de deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto menor a 6 mg/m<sup>2</sup> y la terapia principal o primaria comprende la administración máxima diaria de una concentración de fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto menor de 13 mg/m<sup>2</sup>.

En todavía otra realización preferida, la terapia coadyuvante comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto y la cantidad de deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto por unidad de dosis es menor o igual a 6 mg/m<sup>2</sup> y la terapia principal o primaria comprende fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto y la cantidad de fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto por unidad de dosis es menor o igual a 13 mg/m<sup>2</sup>.

Por otro lado, y con el objeto de poder verificar los anteriores resultados, los autores de la presente invención utilizando un modelo in vivo, concretamente la cepa murina New Zeland Black (NZB/Ola Hsd, Harlan laboratories).

La cepa murina New Zeland Black (NZB/Ola Hsd, Harlan laboratories) en edades tempranas se caracteriza por una hiperactividad de linfocitos B CD5<sup>low</sup>B220<sup>low</sup>IgM<sup>+</sup> y producción de autoanticuerpos, entre ellos, anticuerpos anti-hemáties, que son responsables de un cuadro de anemia hemolítica semejante al que aparece en la enfermedad en humanos (Fig.11A). Con el tiempo, y de forma espontánea, este fenotipo progresa hacia una proliferación clonal de linfocitos B neoplásicos, con una aneuploidía característica (Fig.11B), que se acumulan en bazo y ganglio y en ocasiones llegan a infiltrar médula e hígado (Fig.12). Los linfocitos B tumorales también se caracterizan por una elevada inestabilidad cromosómica y alteraciones genéticas localizadas preferentemente en una región del cromosoma 14 murino, que es sinténica con la región 13q14 humana, frecuentemente alterada en la enfermedad.

Por su similitud con la LLC humana se ha propuesto como modelo experimental de la enfermedad y se ha depositado en la base de datos de modelos de cáncer del Instituto Nacional del Cáncer de EEUU (<http://cancermodels.nci.nih.gov/mmhcc>).

Utilizando este modelo, los autores de la presente invención, tal y como se ilustra en el ejemplo 5, determinaron que la deguelina a una dosis tolerable de 4 mg/kg, y administrado oralmente, tiene actividad sobre las células neoplásicas residentes en bazo de ratones NZB ya que reduce la presencia de células tumorales en bazo (Fig.13). Es decir, la deguelina inhibe los mecanismos de supervivencia bloqueando el efecto protector estímulos microambientales y previniendo de la fosforilación de AKT (Fig. 14), la traslocación de p65, y por tanto la actividad NF-kB (Fig. 15) y la expresión de proteínas antiapoptóticas moduladas por AKT (Fig. 16).

Estos resultados nos permiten confirmar la utilidad de este fármaco en el tratamiento de la LLC.

Adicionalmente, para el ensayo del efecto in vivo de la combinación de la deguelina con fludarabina se establecieron 4 grupos de 10 animales cada uno: Control, deguelina, fludarabina y

deguelina más fludarabina. La combinación de una dosis tolerable de deguelina con bajas dosis de fludarabina (35 mg/kg) alarga la supervivencia de ratones NZB de forma significativa ( $p < 0.05$ ) comparado con el grupo control o con el grupo tratado solo con fludarabina (Fig. 17). Esto replica los hallazgos in vitro indicando que in vivo se consigue incrementar la efectividad de  
5 dosis subóptimas de fludarabina.

Por último, se hace notar que una parte muy importante de la invención lo constituye el descubrimiento de una combinación farmacológica que no presente importantes efectos secundarios. Así, los autores de la presente invención han verificado como el tratamiento  
10 combinado de deguelina/fludarabina no presenta una toxicidad elevada como indican los valores de los distintos marcadores de daño hepático y renal en los distintos grupos de tratamiento (ver ejemplo 6). Únicamente se señala el descenso significativo de la enzima hepática GOT, que todo caso sería compatible con una mejoría de la función hepática (Fig. 21). Tampoco se observa una  
15 variación significativa en el perfil de inmunoglobulinas séricas (Fig. 22).

Las composiciones descritas en el segundo aspecto de la invención, o en cualquiera de sus realizaciones preferidas, se administran en forma de composición farmacéutica que comprende  
20 los compuestos de esta invención junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. De esta manera, los compuestos de esta invención se pueden administrar en cualquier forma de dosificación oral, parenteral o transdermal convencional.

Para la administración oral, una composición farmacéutica pueda tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones (como por ejemplo nanoemulsiones), comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos o similares. Cuando se desean suspensiones acuosas y/o elixires para administración oral,  
25 los compuestos de esta invención se pueden combinar con diversos agentes endulzantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, agentes emulsificantes y/o agentes suspensores, así como diversos diluyentes. Composiciones farmacéuticas preferidas para la administración oral son aquellas que comprendan liposomas, nanoemulsiones o nanopartículas donde en un aspecto  
30 particularmente preferido de la invención dichas composiciones permitan la administración simultánea de fludarabina y deguelina.

La combinación de esta invención se puede administrar también en una formulación de liberación controlada, tal como una formulación de liberación lenta o una de liberación rápida. Tales formulaciones dosificadas de liberación controlada de la combinación de la invención se  
35 pueden preparar usando procedimientos bien conocidos por aquellos expertos en la materia. El procedimiento de administración preferido se determinará por el médico a cargo del paciente u otra persona experta en la técnica después de una evaluación de las condiciones y necesidades del sujeto.

Para los objetivos de administración parenteral, se pueden emplear nanoemulsiones o soluciones que comprendan nanopartículas o liposomas que comprendan fludarabina y deguelina. Dichas nanoemulsiones o soluciones se pueden tamponar adecuadamente. Estas soluciones acuosas son especialmente adecuadas para objetivos de inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea e  
45 intraperitoneal.

Son conocidos los procedimientos de preparación de diversas composiciones farmacéuticas, o serán aparentes a la luz de este hallazgo para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing company, Easter, Pa, 15th Edition (1975).

5

Por ultimo, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un kit que comprende:

10

a) una cantidad de fludarabina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una primera unidad de dosis

b) una cantidad de deguelina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una segunda unidad de dosis, y

15

c) un medio contenedor de la primera y la segunda unidades de dosificación;

20

donde referiblemente la cantidad de fludarabina por unidad de dosis es menor o igual a 105mg/m<sup>2</sup>, preferentemente menor a 25mg/m<sup>2</sup>; más preferentemente menor a 13mg/m<sup>2</sup>, mientras que la cantidad de deguelina por unidad de dosis es menor o igual a 12 mg/m<sup>2</sup> y preferentemente menor a 6mg/m<sup>2</sup>.

25

El contenedor puede ser dividido o no dividido y las formas unitarias de dosificación pueden ser ambas orales o una oral y la otra parenteral.

Los siguientes ejemplos tienen como único propósito ilustrar la presente invención y en ningún caso han de entenderse como limitativos de la misma.

30

### **Ejemplos**

#### **- Ejemplo 1: Efecto citotóxico de la deguelina sobre células LLC**

35

Para llevar a cabo este ensayo, los autores de la presente invención cultivaron células mononucleares en presencia de cantidades crecientes de deguelina. Después de 24 ó 48h en cultivo se cuantificó la viabilidad celular mediante la doble tinción AnexinaV/Ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 2A y se expresan como porcentajes de células viables relativos referidos a la condición 0µM deguelin. Se muestran la media y la desviación estándar de los valores de 45 pacientes LLC y 16 controles sanos (\*t-Student p<0.05).

40

45

Adicionalmente los autores de la presente invención incubaron células mononucleares en presencia o ausencia de deguelina 10 µM (+DEG, -DEG) durante 24h, tras las cuales las células se tiñeron con un agente fluorescente que se une a la actina polimerizada (Faloidina conjugada con AlexaFluor488) y con anticuerpos frente a proteínas de superficie anti-CD3 y anti-CD19 para la identificación de linfocitos T y B. Se analizó por citometría de flujo el grado de

despolimerización de la actina como indicador de apoptosis en las distintas subpoblaciones T (CD3+CD19-), B (CD3-CD19+) y no T no B (CD3-CD19-). En la figura 2B se muestran los resultados de un paciente LLC y un control sano. En gris linfocitos totales y en negro la subpoblación seleccionada por los marcadores de superficie indicados en cada caso.

5

A partir de estos ensayos los autores de la presente invención concluyeron que la deguelina, utilizada de forma aislada, induce apoptosis en células de pacientes con leucemia linfoide crónica. El efecto citotóxico es mayor en pacientes que en controles sanos (Fig.2A) y afecta en mayor medida a células tumorales que a las células normales del mismo paciente o de controles sanos (ver Fig.2B y tabla abajo).

10

### Porcentaje de apoptosis inducido por 10µM en distintas subpoblaciones

| LLC                                |                                    | Control                            |                                    |
|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| CD19 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> | CD19 <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> | CD19 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> | CD19 <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> |
| 18* (55)                           | 11 (45)                            | 5 (7)                              | 0 (77)                             |
| 17 (76)                            | 0 (19)                             | 2 (6)                              | 3 (73)                             |
| 32 (73)                            | 0 (21)                             | 0 (9)                              | 4 (57)                             |
| 28 (65)                            | 1(45)                              | 4 (4)                              | 7 (62)                             |
| 23 (84)                            | 7 (17)                             | 0 (4)                              | 9 (76)                             |

15

\*Porcentaje de apoptosis específica a 10µM de deguelina analizado en la población celular indicada. Entre paréntesis el porcentaje de células con la tinción indicada en cada columna, referida a los PBMCs totales de la muestra (linfocitos T: CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>; linfocitos B:CD19<sup>+</sup>CD3).

20

### - Ejemplo 2: Modelo de estudio in vitro de la quimiorresistencia/actividad vía PI3K

25

En el caso de la LLC se ha demostrado que la activación constitutiva de PI3K/Akt/NF-kB se mantiene gracias a señales del microambiente de la célula tumoral existentes in vivo, que favorecen su supervivencia, entre ellos el CD154 de los linfocitos T, la interleucina-4, el receptor de antígeno y el plasma autólogo. Además, la activación de la ruta de PI3K confiere resistencia a la quimioterapia como lo demuestran diversos estudios in vivo e in vitro en los que la combinación de inhibidores de la ruta con la quimioterapia estándar atenúa la quimiorresistencia señalándola como vía potencial terapéutica de gran interés. Estas señales se pierden en el cultivo ex vivo, lo cual dificulta el estudio del papel de dicha actividad en la quimiorresistencia, así como el efecto que tendría su bloqueo en la sensibilización a otras drogas. No obstante, los

30

autores de la presente invención han descubierto como el co-cultivo sobre monocapas de fibroblastos de ratón transfectados con CD32 (Ltk-) permite mantener activa de forma sostenida

la vía de PI3K/Akt/NF-kB, incrementando la viabilidad en cultivo de células LLC e inhibiendo la activación de caspasas. Este efecto se anula cuando el cultivo se realiza en presencia de inhibidores farmacológicos de la ruta (wortmanina y LY294002) (Fig.4).

5 Por tanto, a la luz de los datos mostrados en la figura 4 se puede inferir como este modelo de estudio nos permite predecir de una forma más ajustada cuál sería el comportamiento *in vivo* de las células de LLC tratadas con agentes citotóxicos, especialmente el de aquellas presentes en tejidos linfoides.

10 En este sentido, utilizando este modelo, los autores de la presente invención han demostrado como la actividad sostenida de PI3K reduce el efecto apoptótico de la deguelina. Esto se visualiza claramente en base a las diferencias encontradas en las dosis necesarias para inducir apoptosis en el 50% de las células LLC (EC50) cuando se cultivan en presencia o ausencia de LTK: 6.1  $\mu\text{M}$  y 2.91  $\mu\text{M}$  respectivamente (Fig. 5).

15 Adicionalmente, la actividad sostenida de PI3K también reduce el efecto apoptótico de la fludarabina como indican la diferencias encontradas en las dosis necesarias para inducir apoptosis en el 50% de las células LLC (EC50) cuando se cultivan en presencia o ausencia de LTK: 4.33  $\mu\text{M}$  y 1.16  $\mu\text{M}$  respectivamente (Fig. 6). No obstante, se hace notar como sorprendentemente este incremento es aproximadamente un 75% mayor que el necesario en el caso de la deguelina.

- **Ejemplo 3: Efecto quimiosensibilizante de la deguelina sobre células LLC**

25 Células de 14 pacientes de LLC se preincubaron durante 1h con cantidades crecientes de deguelina y a continuación con 1  $\mu\text{g/ml}$  de fludarabina. Después de 48h en cultivo en presencia, figura 7A, o ausencia de LTK, figura 7B, se cuantificó el porcentaje de células viables mediante la doble tinción AnexinaV/ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. Se representa la media y desviación estándar (\*t-Student  $p < 0.01$ ) en la figura 7.

30 Adicionalmente, células de 15 pacientes de LLC se preincubaron durante 1h con 10  $\mu\text{M}$  de deguelina o con 5  $\mu\text{M}$  de BAY-117821 (en 7 de los 15 pacientes) y a continuación con 1  $\mu\text{M}$  de fludarabina. Después de 48h en cultivo en presencia o ausencia de LTK se cuantificó el porcentaje de células viables mediante la doble tinción AnexinaV/ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. En la figura 8 se muestra la media y la desviación estándar.

35 En base a estos resultados, los autores de la presente invención concluyeron que el pre-tratamiento con deguelina sensibiliza a las células LLC frente a la acción de la fludarabina incluso en situación de actividad sostenida de PI3K (Fig. 7). No ocurre lo mismo con otro inhibidor de la misma ruta como el inhibidor de NF-kB BAY-117821 (Fig. 8).

40 - **Ejemplo 4: La combinación con deguelina mejora la acción de la fludarabina sobre células LLC y ambas drogas interactúan de forma sinérgica sobre células LLC incluso en situación de actividad sostenida de PI3K.**

45 Células de 8 pacientes de LLC se incubaron con cantidades crecientes de fludarabina, deguelina y combinaciones de ambas en una ratio constante 1:2. Después de 48h en cultivo en presencia o

ausencia de LTK se cuantificó el porcentaje de células viables mediante la doble tinción AnexinaV/ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. A partir de estos datos y utilizando el software CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, UK) se calculó el efecto citotóxico (ED) a las distintas dosis empleadas, así como los índices de combinación de dosis (CI) utilizando el método de Chou-Talalay. En la figura 9A se representa el índice de combinación de dosis calculado para los valores de efecto citotóxico del 50%, 75% y 90% medido en presencia y ausencia de contacto con LTK. La línea horizontal en 1 marca el límite por debajo del cual los valores de CI indican sinergia. Para su comparación se muestran los resultados obtenidos con otra combinación que resultó antagónica clorambucil/deguelina a ratio constante 1:10. En la figura 9B se muestra el índice de combinación de dosis (CI) de fludarabina/deguelina a un ratio constante 1:2.

En base a estos resultados se puede concluir que la combinación de fludarabina con deguelina mejora la acción de este fármaco sobre células LLC haciendo que esta combinación interaccione de forma sinérgica sobre células LLC incluso en situación de actividad sostenida de PI3K. De hecho la combinación a razón constante 2:1 deguelina 2 $\mu$ M/fludarabina 1 $\mu$ g/ml muestra un valor inferior a 1 en los índices de combinación de dosis (CIs) para efectos del 50%, 75% y 90% de apoptosis (calculados por el método de Chou-Talalay): CIED50=0.66 $\pm$ 0.34; CIED75=0.45 $\pm$ 0.35 y CIED90= 0.389 $\pm$ 0.44 respectivamente (Fig. 9).

Adicionalmente, los autores de la presente invención incubaron células de 8 pacientes de LLC con cantidades crecientes de fludarabina, deguelina y combinaciones de ambas en una ratio constante 1:2. Después de 48h en cultivo en presencia o ausencia de LTK se cuantificó el porcentaje de células viables mediante la doble tinción AnexinaV/ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. A partir de estos datos y utilizando el software CalcuSyn se calculó el efecto citotóxico (ED) a las distintas dosis empleadas, así como los índices de reducción de dosis (DRI) utilizando el método de Chou-Talalay. A partir de lo cual se pudo concluir que la combinación con deguelina permite reducir la dosis efectiva fludarabina entre 2 ó 3 veces manteniendo un mismo efecto citotóxico como indican los valores de índice de reducción de dosis calculados por el método de Chou-Talalay (Fig. 10). Este descubrimiento resulta de una enorme relevancia ya que permitirá reducir la dosis de fludarabina limitando su toxicidad, puesto que en principio la toxicidad aportada por la deguelina es inferior a la de la fludarabina.

- **Ejemplo 5: Efecto de la deguelina en un modelo murino de leucemia linfocítica crónica**

La cepa murina New Zeland Black (NZB/Ola Hsd, Harlan laboratories) en edades tempranas se caracteriza por una hiperactividad de linfocitos B CD5lowB220lowIgM+ y producción de autoanticuerpos, entre ellos, anticuerpos anti-hematías, que son responsables de un cuadro de anemia hemolítica semejante al que aparece en la enfermedad en humanos (Fig.11A). Con el tiempo, y de forma espontánea, este fenotipo progresa hacia una proliferación clonal de linfocitos B neoplásicos, con una aneuploidía característica (Fig.11B), que se acumulan en bazo y ganglio y en ocasiones llegan a infiltrar médula e hígado (Fig.12). Los linfocitos B tumorales también se caracterizan por una elevada inestabilidad cromosómica y alteraciones genéticas localizadas preferentemente en una región del cromosoma 14 murino, que es sinténica con la región 13q14 humana, frecuentemente alterada en la enfermedad. Por su similitud con la LLC

humana se ha propuesto como modelo experimental de la enfermedad y se ha depositado en la base de datos de modelos de cáncer del Instituto Nacional del Cáncer de EEUU (<http://cancermodels.nci.nih.gov/mmhcc>). La enfermedad que se presenta en NZB se caracteriza por una baja agresividad y progreso lento, aunque de forma excepcional pueden aparecer clones con transformación blástica. Una diferencia importante con la enfermedad humana, fundamentalmente leucémica, es que en NZB la enfermedad se presenta como un linfoma infiltrando tejidos linfoides. Esta característica resulta de especial interés para la evaluación de la acción quimiosensibilizante de nuevos fármacos y la evaluación de su acción sobre células tumorales en las condiciones de protección que ofrece el microambiente de órganos linfoides.

Utilizando este modelo murino de leucemia linfóide crónica los autores de la presente invención llevaron a cabo los siguientes ensayos para evaluar el efecto *in vivo* de la combinación de la deguelina con fludarabina.

Para el ensayo del efecto *in vivo* de la combinación de la deguelina con fludarabina, 40 ratones NZB con neoplasia establecida se dividieron en grupos de 10 individuos: Control, deguelina, fludarabina y deguelina más fludarabina. A un grupo se le suministraron dosis de 35 mg/kg de fludarabina por vía intraperitoneal, los 5 primeros días de cada mes durante 3 meses. A otro grupo dosis de deguelina de 4 mg/kg por vía intragástrica diluida en aceite de maíz a razón de 3 días a la semana durante 3 meses. A un tercer grupo se le suministró la combinación de deguelina y fludarabina con las pautas anteriores y al último grupo se le administraron únicamente los vehículos en los que se disolvieron las drogas y siguiendo las mismas pautas. Finalizado el periodo de tratamiento los animales se mantuvieron bajo observación y se sacrificaron en el momento que cumplían criterios de punto final tras lo cual se realizó un de supervivencia (\* $p < 0.05$  comparado con la condición “Deguelina + fludarabina”) (ver figura 17).

En base a estos resultados se puede concluir como la combinación de una dosis tolerable de deguelina con bajas dosis de fludarabina (35 mg/kg) alarga la supervivencia de ratones NZB de forma significativa ( $p < 0.05$ ) comparado con el grupo control o con el grupo tratado solo con fludarabina (Fig. 17). Esto replica los hallazgos *in vitro* (ver ejemplo 4) indicando que *in vivo* se consigue incrementar la efectividad de dosis subóptimas de fludarabina.

- **Ejemplo 6: Efecto del tratamiento con la combinación farmacológica deguelina/fludarabina en el modelo murino de leucemia linfóide crónica.**

Respecto al efecto del tratamiento en el grado de infiltración tumoral, la comparación del peso del bazo en animales tratados y no tratados (cuantificado como porcentaje del peso corporal del animal) indica un efecto positivo del tratamiento aunque sin alcanzar la significación estadística. La falta de significación posiblemente se debe a que el peso del bazo se analizó en el momento del sacrificio del animal y no inmediatamente tras el tratamiento (Fig. 18).

El análisis patológico de la infiltración tumoral de distintos órganos y tejidos indica un patrón similar al previamente descrito para esta cepa, siendo las dianas principales bazo, ganglio e hígado. La evaluación del efecto del tratamiento en el grado de infiltración de estos órganos indica un efecto beneficioso puesto que en general la infiltración tumoral afecta a más órganos y resulta más evidente en los animales no tratados. Pero, al igual que en el punto anterior, el grado

de infiltración en el momento de la necropsia posiblemente no refleja la acción inmediata del fármaco (Fig. 19).

5 Además el tratamiento combinado reduce el grado de anemia hemolítica en ratones NZB como indican la recuperación del conteo de hematíes y la disminución de los anticuerpos anti-eritrocitos en los ejemplares tratados (Fig. 21).

10 Por último, el tratamiento combinado deguelina/fludarabina no presenta una toxicidad importante como indican los valores de los distintos marcadores de daño hepático y renal en los distintos grupos de tratamiento, que no se modifican significativamente. Únicamente se señala el descenso significativo de la enzima hepática gamma GT, que todo caso sería compatible con una mejoría de la función hepática (Fig. 22). Tampoco se observa una variación significativa en el perfil de inmunoglobulinas séricas (Fig.23).

15

20

25

30

35

40

45

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición que comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de la leucemia linfóide crónica humana.
- 10 2. Uso de una composición que comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la elaboración de un medicamento para su uso como terapia coadyuvante administrada simultánea, alternativa o sucesivamente a una terapia primaria adecuada para el tratamiento de la leucemia linfóide crónica humana.
- 15 3. Uso de una composición que comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la elaboración de un medicamento para su uso como terapia coadyuvante administrada simultánea, alternativa o sucesivamente a una terapia primaria adecuada para el tratamiento de la leucemia linfóide crónica humana, donde dicha terapia primaria comprende fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto.
- 20 4. Uso de una composición que comprende deguelina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, para la elaboración de un medicamento para su uso como terapia coadyuvante administrada simultáneamente a una terapia principal o primaria adecuada para el tratamiento de la leucemia linfóide crónica humana que comprende fludarabina o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto.
- 25 5. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, donde la terapia coadyuvante comprende deguelina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, y **donde la cantidad de deguelina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, por unidad de dosis es menor** o igual a  $12 \text{ mg/m}^2$  y donde la terapia principal o primaria comprende fludarabina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, y **donde la cantidad de fludarabina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, por unidad de dosis es menor** o igual a  $105 \text{ mg/m}^2$ .
- 30 6. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, donde la terapia coadyuvante comprende deguelina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, y **donde la cantidad de deguelina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, por unidad de dosis es menor** o igual a  $12 \text{ mg/m}^2$  y donde la terapia principal o primaria comprende fludarabina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, y **donde la cantidad de fludarabina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, por unidad de dosis es menor** o igual a  $25 \text{ mg/m}^2$ .
- 35 7. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, donde la terapia coadyuvante comprende deguelina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, y **donde la cantidad de deguelina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, por unidad de dosis es menor** o igual
- 40
- 45

a  $12 \text{ mg/m}^2$  y donde la terapia principal o primaria comprende fludarabina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, y **donde la cantidad de fludarabina,** o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, **por unidad de dosis es menor** o igual a  $13 \text{ mg/m}^2$ .

5

8. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, donde la terapia coadyuvante comprende deguelina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, y **donde la cantidad de deguelina,** o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, **por unidad de dosis es menor** o igual a  $6 \text{ mg/m}^2$  y donde la terapia principal o primaria comprende fludarabina, o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, y **donde la cantidad de fludarabina,** o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de este compuesto, **por unidad de dosis es menor** o igual a  $13 \text{ mg/m}^2$ .

10

9. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-8, donde la terapia coadyuvante y la terapia principal o primaria se administran simultáneamente usando un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde dicho vehículo farmacéuticamente aceptable es adecuado para su administración oral o parenteral y se selecciona del grupo que consiste en nanoemulsión, nanopartícula y liposomas.

20

10. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 9 donde el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende liposomas.

11. kit que comprende:

25

a) una cantidad de fludarabina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una primera unidad de dosis

b) una cantidad de deguelina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una segunda unidad de dosis, y

30

c) un medio contenedor de la primera y la segunda unidades de dosificación.

12. kit que comprende:

35

a) una cantidad de fludarabina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una primera unidad de dosis

b) una cantidad de deguelina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una segunda unidad de dosis, y

c) un medio contenedor de la primera y la segunda unidades de dosificación;

40 donde la cantidad de fludarabina por unidad de dosis es menor a  $105 \text{ mg/m}^2$  mientras que la cantidad de deguelina por unidad de dosis es menor o igual a  $12 \text{ mg/m}^2$ .

13. kit que comprende:

- 5
- a) una cantidad de fludarabina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una primera unidad de dosis
  - b) una cantidad de deguelina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una segunda unidad de dosis, y
  - c) un medio contenedor de la primera y la segunda unidades de dosificación;

donde la cantidad de fludarabina por unidad de dosis es menor a  $25\text{mg}/\text{m}^2$  mientras que la cantidad de deguelina por unidad de dosis es menor o igual a  $12\text{ mg}/\text{m}^2$ .

10 14. kit que comprende:

- a) una cantidad de fludarabina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una primera unidad de dosis
- b) una cantidad de deguelina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una segunda unidad de dosis, y
- c) un medio contenedor de la primera y la segunda unidades de dosificación;

15

donde la cantidad de fludarabina, o una sal farmacéuticamente aceptable, por unidad de dosis es menor a  $13\text{mg}/\text{m}^2$  mientras que la cantidad de deguelina, o una sal farmacéuticamente aceptable, por unidad de dosis es menor o igual a  $12\text{ mg}/\text{m}^2$ .

20 15. kit que comprende:

- a) una cantidad de fludarabina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una primera unidad de dosis
- b) una cantidad de deguelina o una sal farmacéuticamente aceptable y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una segunda unidad de dosis, y
- c) un medio contenedor de la primera y la segunda unidades de dosificación;

30 donde la cantidad de fludarabina, o una sal farmacéuticamente aceptable, por unidad de dosis es menor a  $13\text{mg}/\text{m}^2$  mientras que la cantidad de deguelina, o una sal farmacéuticamente aceptable, por unidad de dosis es menor o igual a  $6\text{ mg}/\text{m}^2$ .

35

40

45

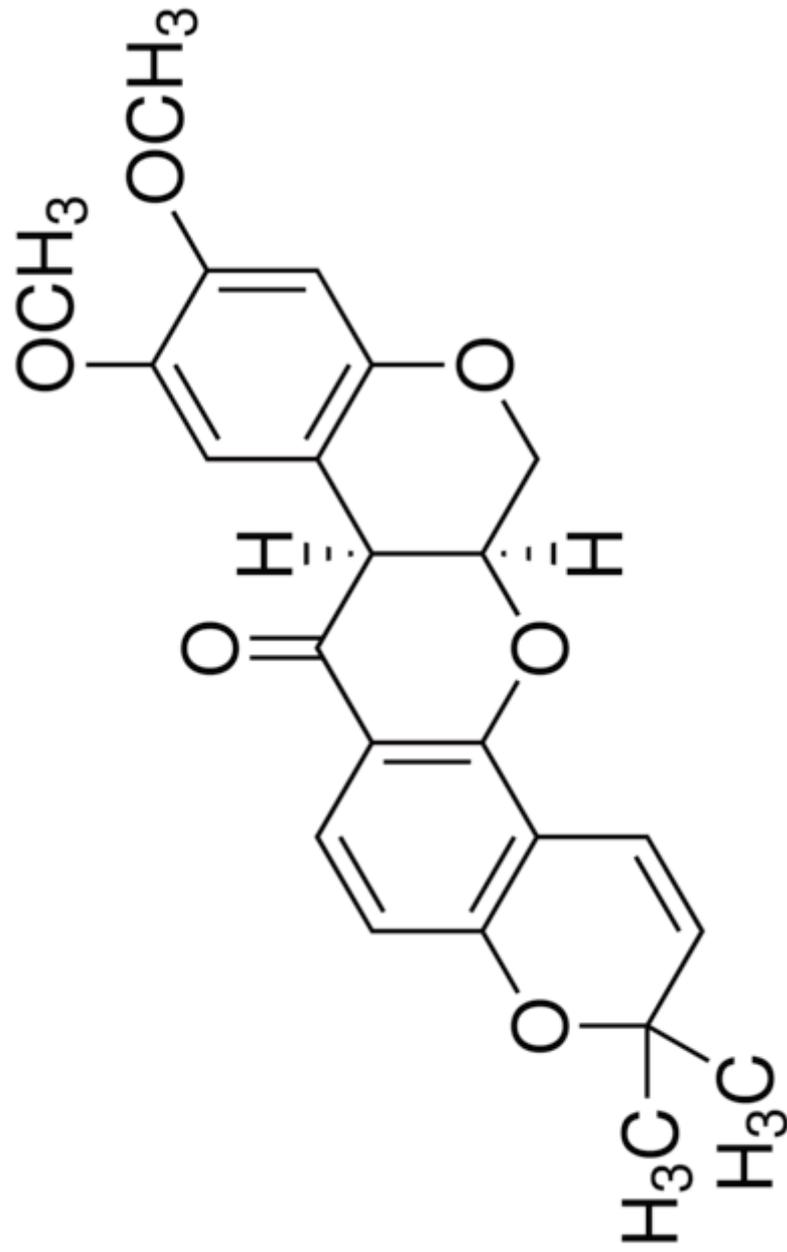


Fig 1

Fig. 2A

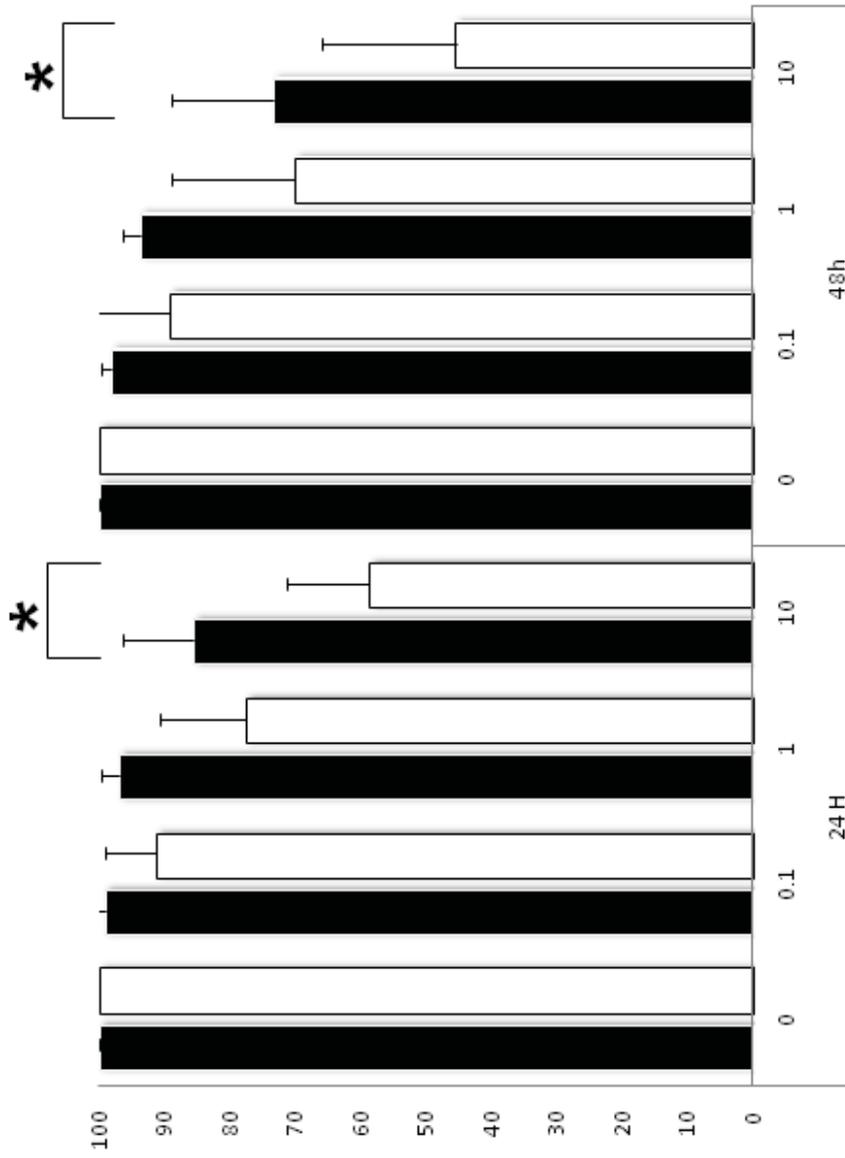


Fig 2B

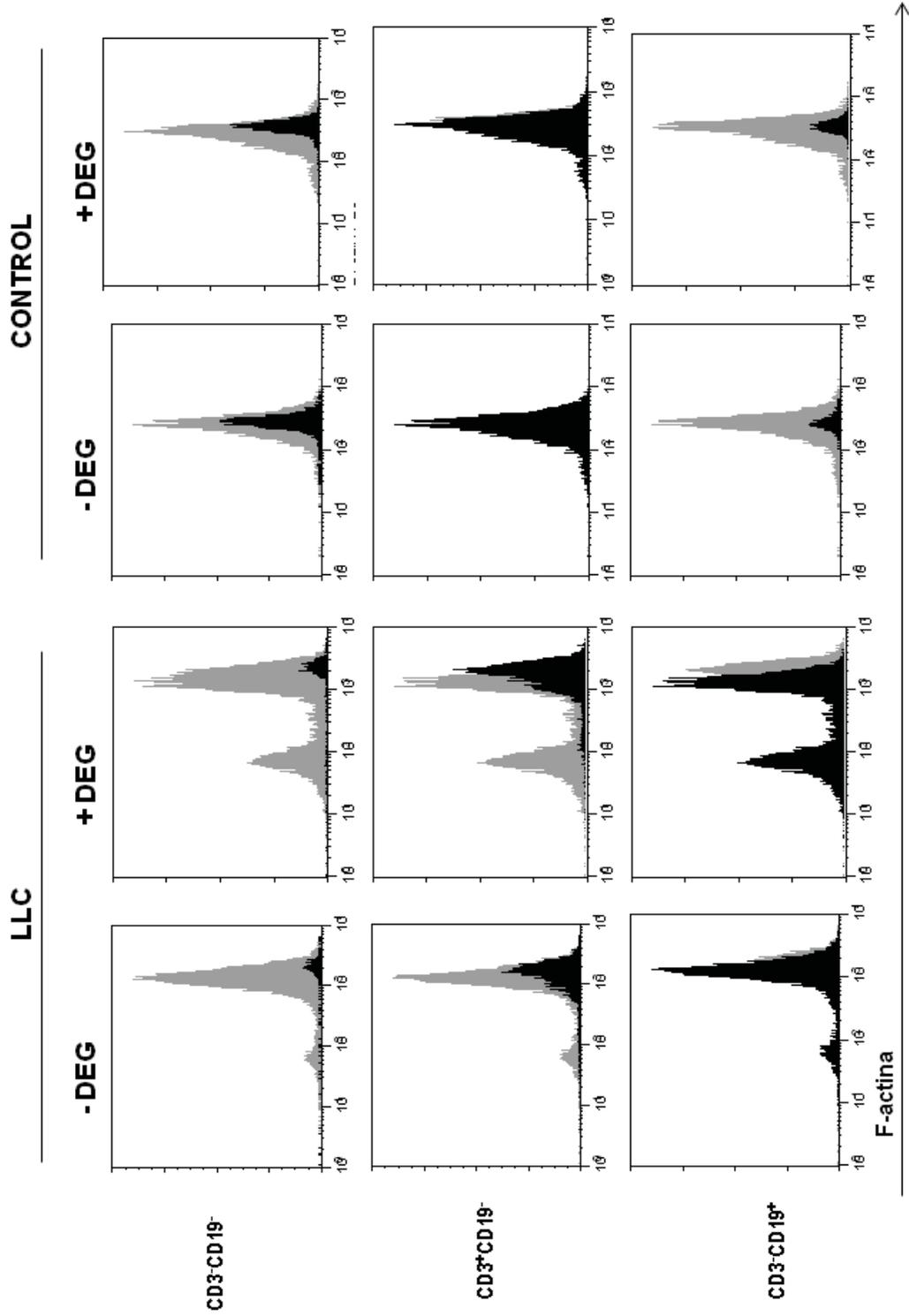


Fig 3A

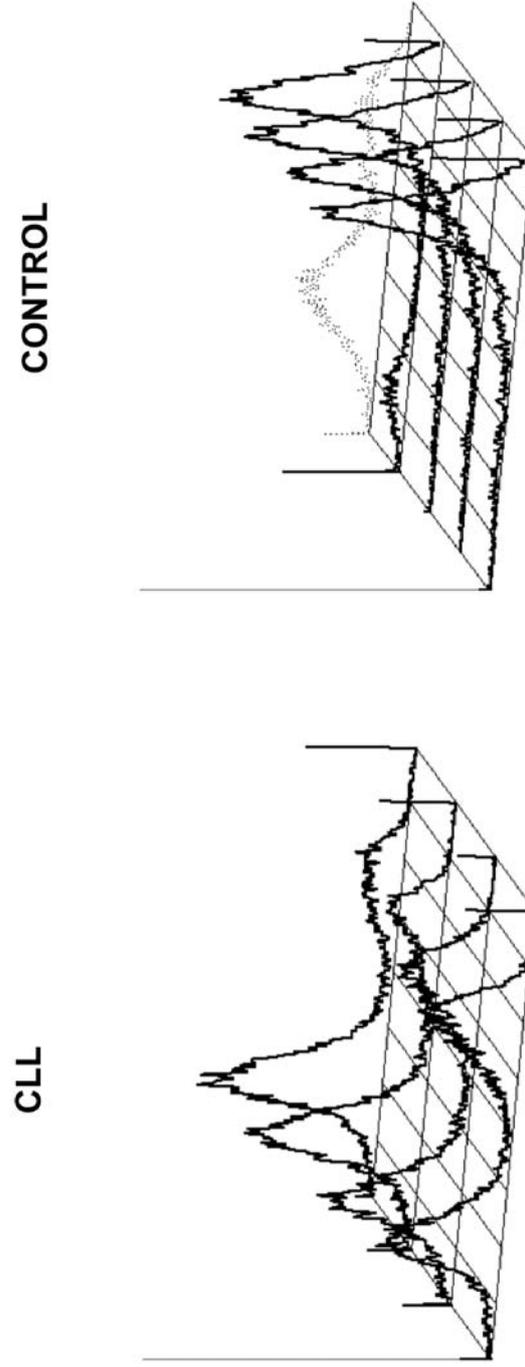


Fig 3B

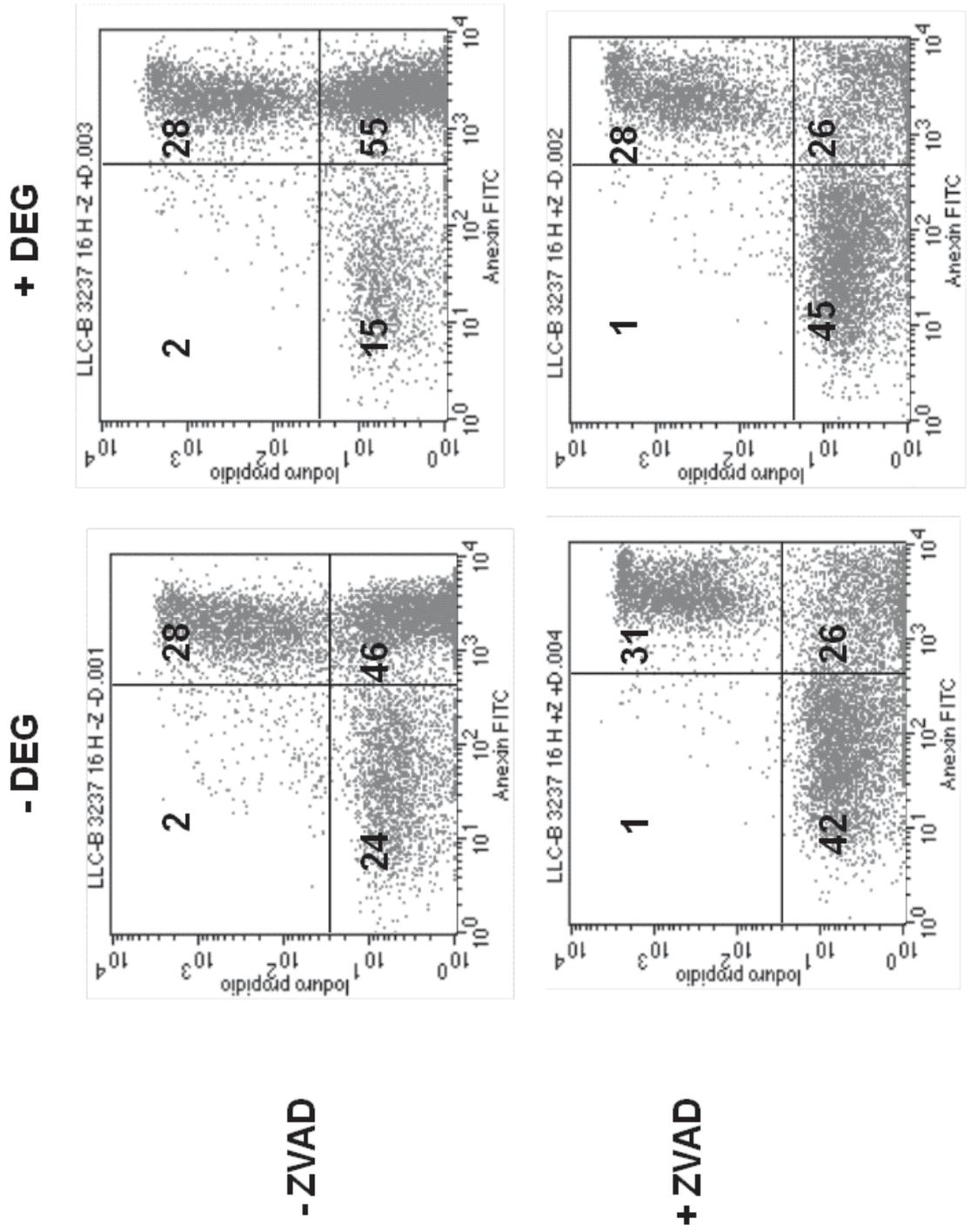


Fig 4

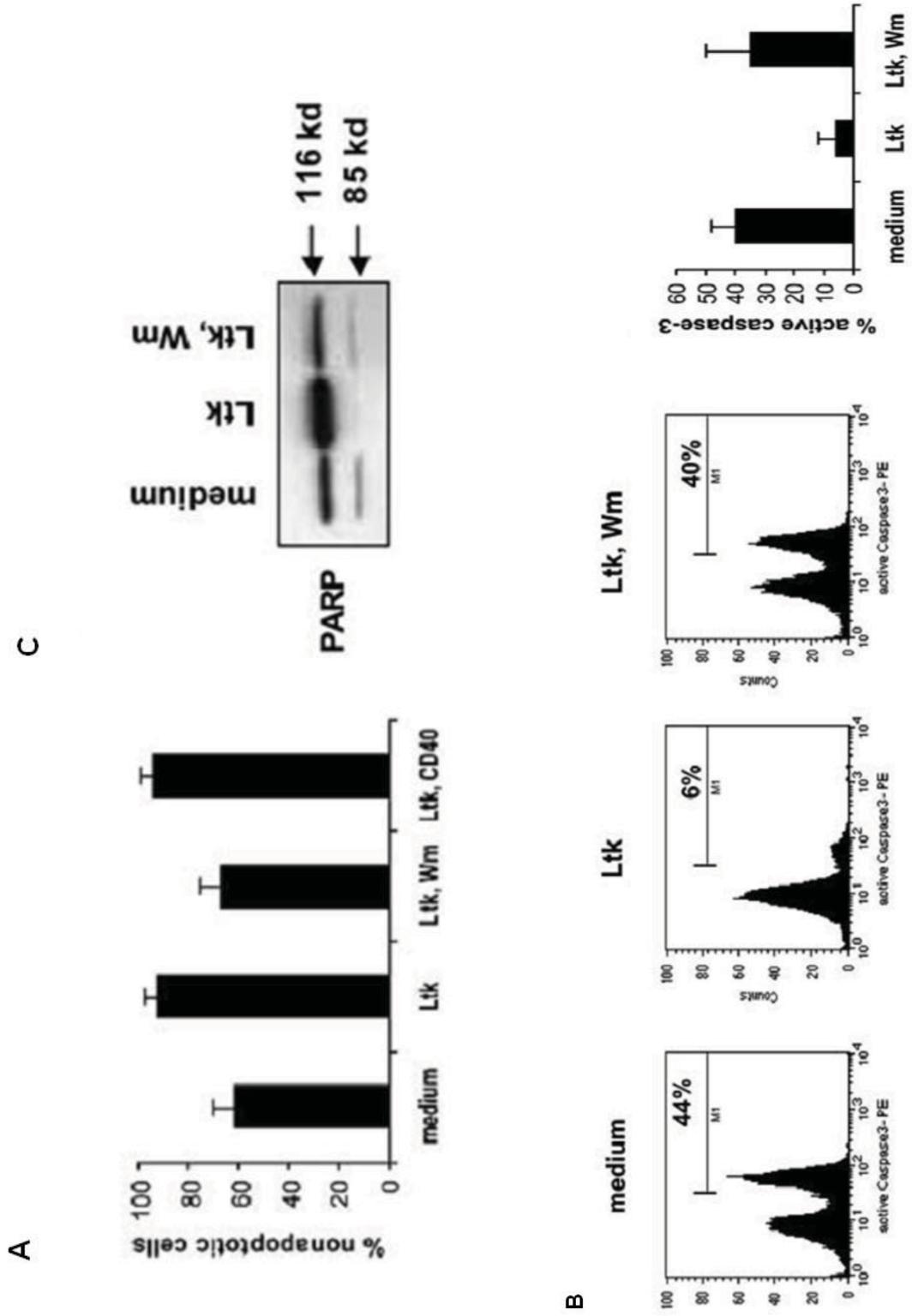
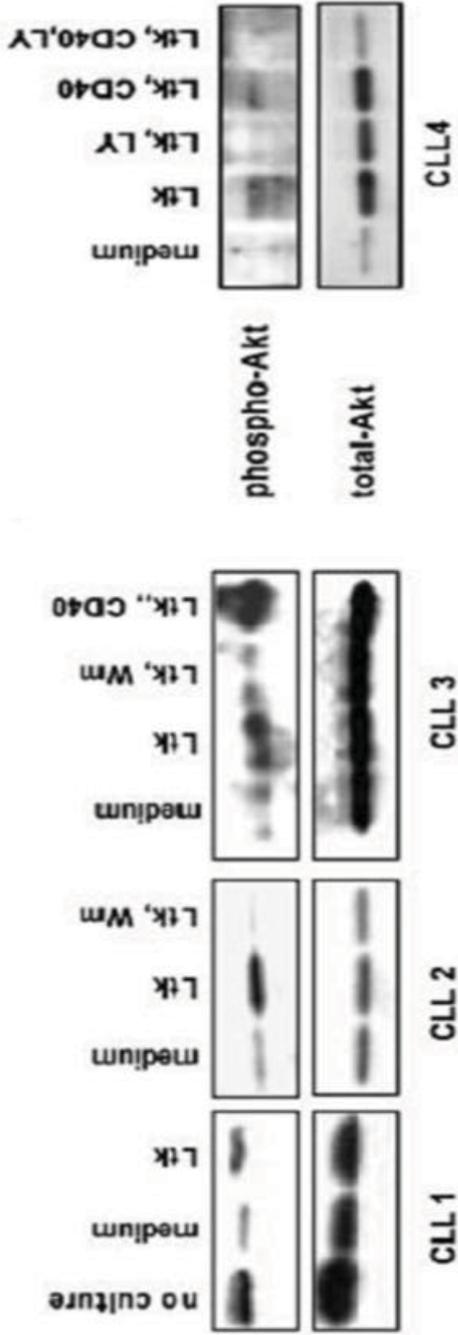


Fig 4 D



E

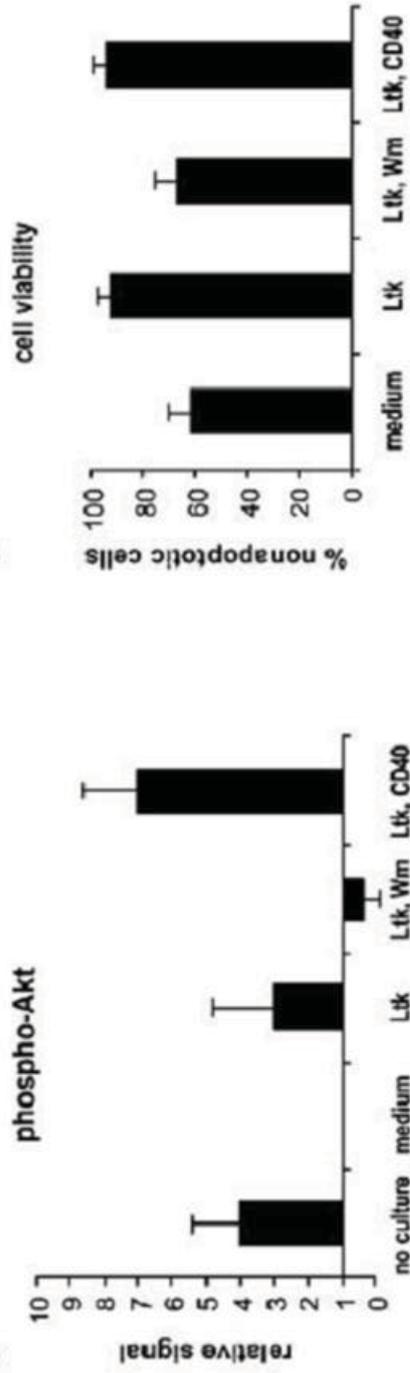


Fig. 5

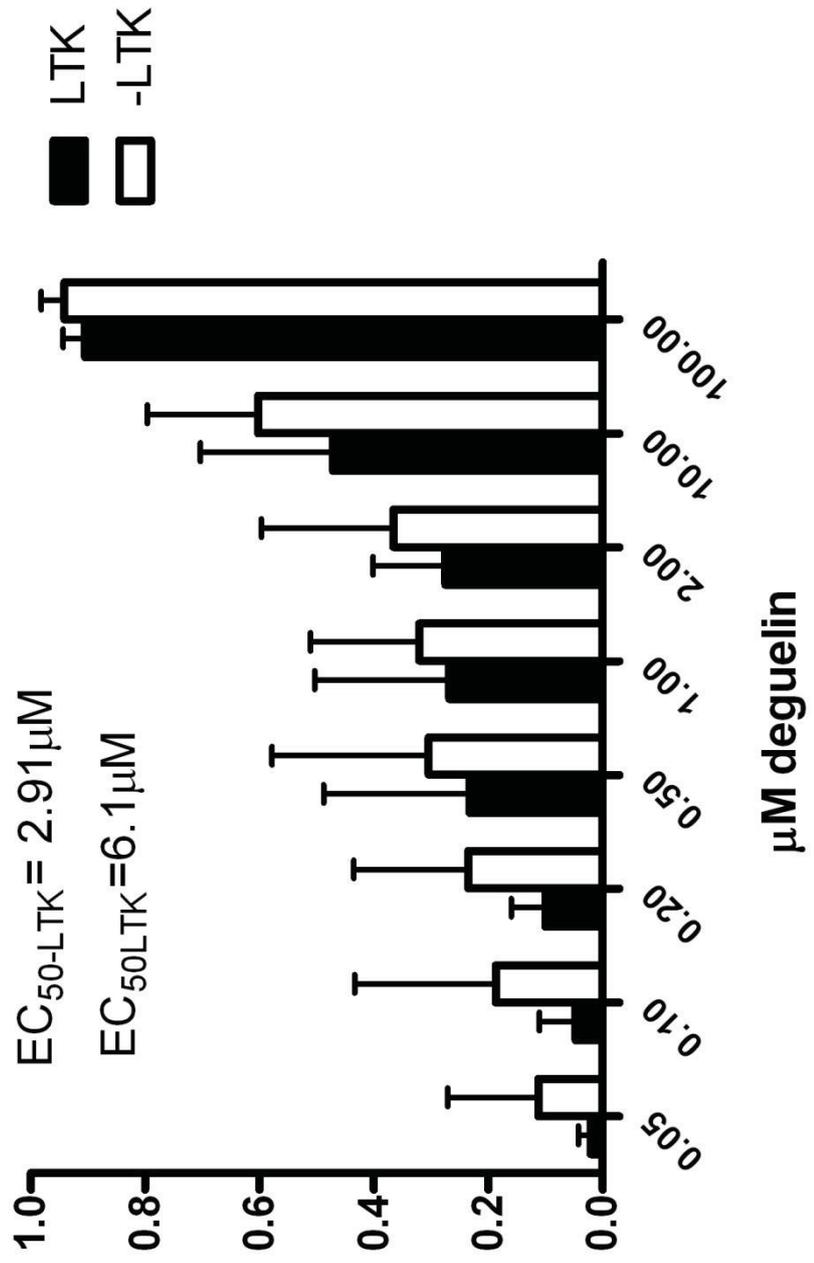


Fig 6

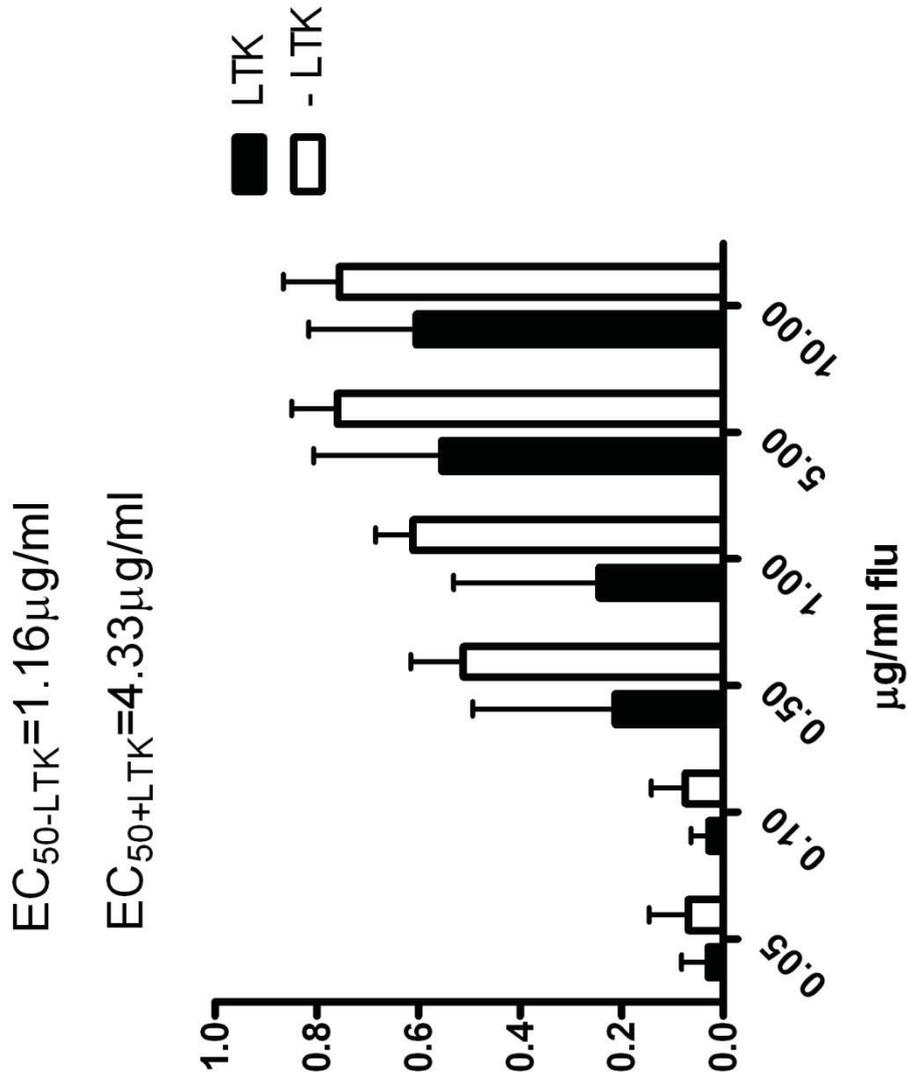
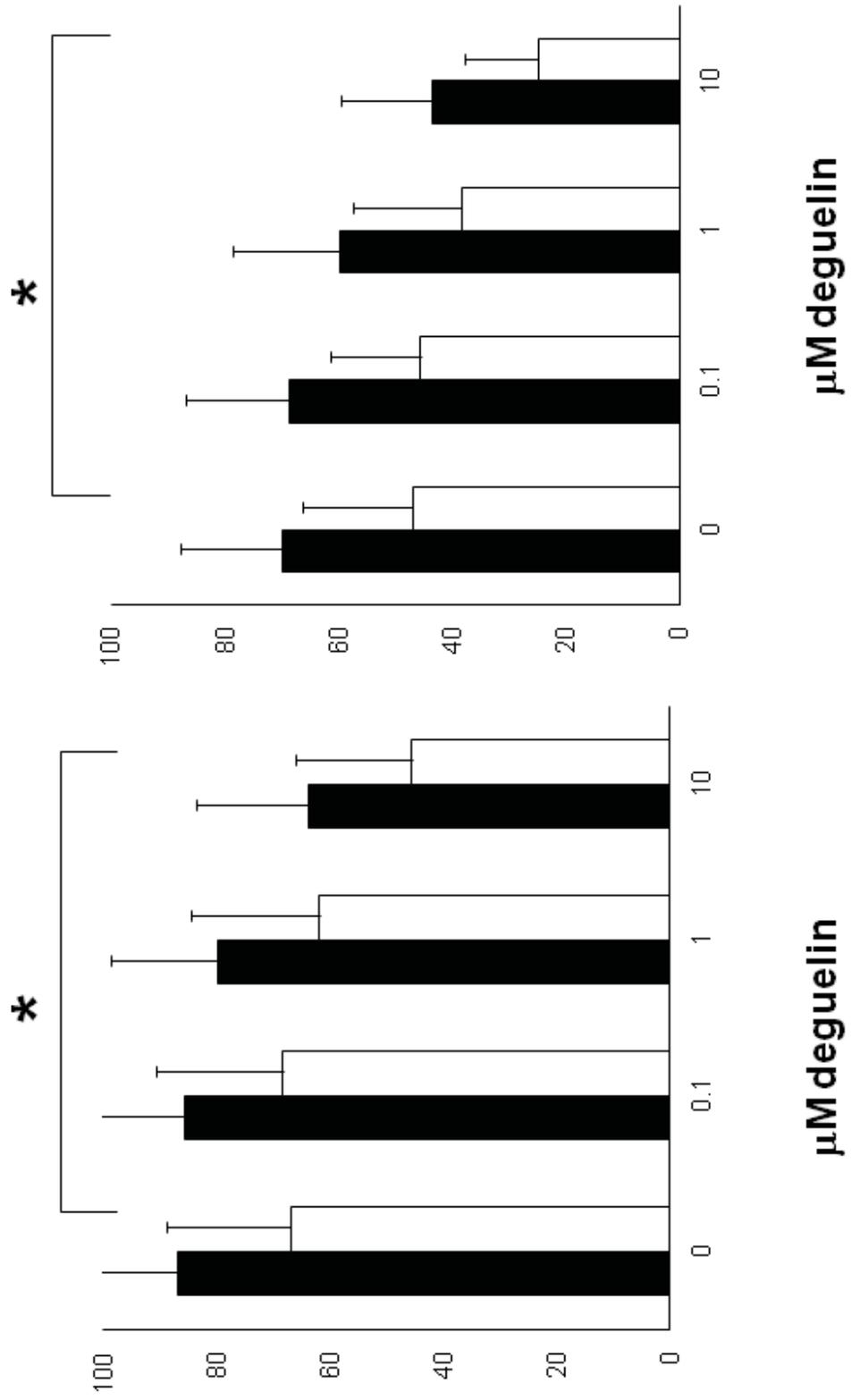


Fig 7



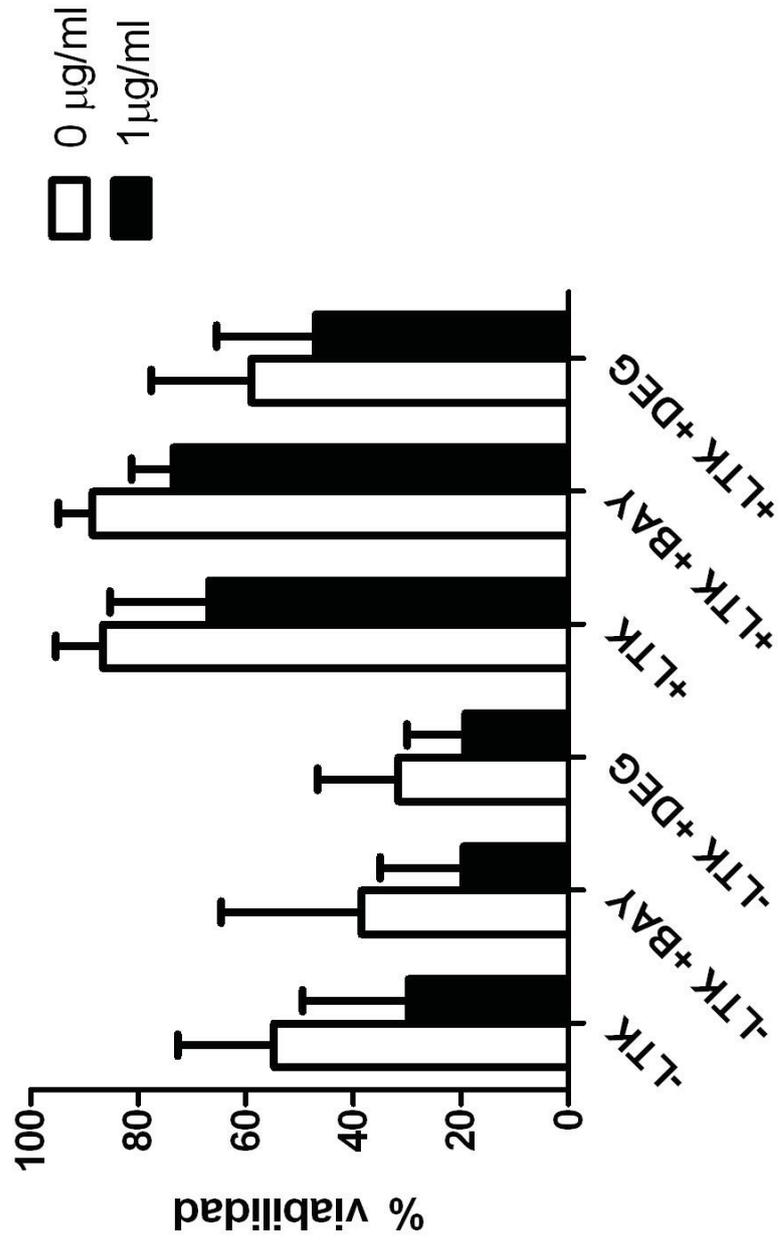


Fig 8

Fig 9

A

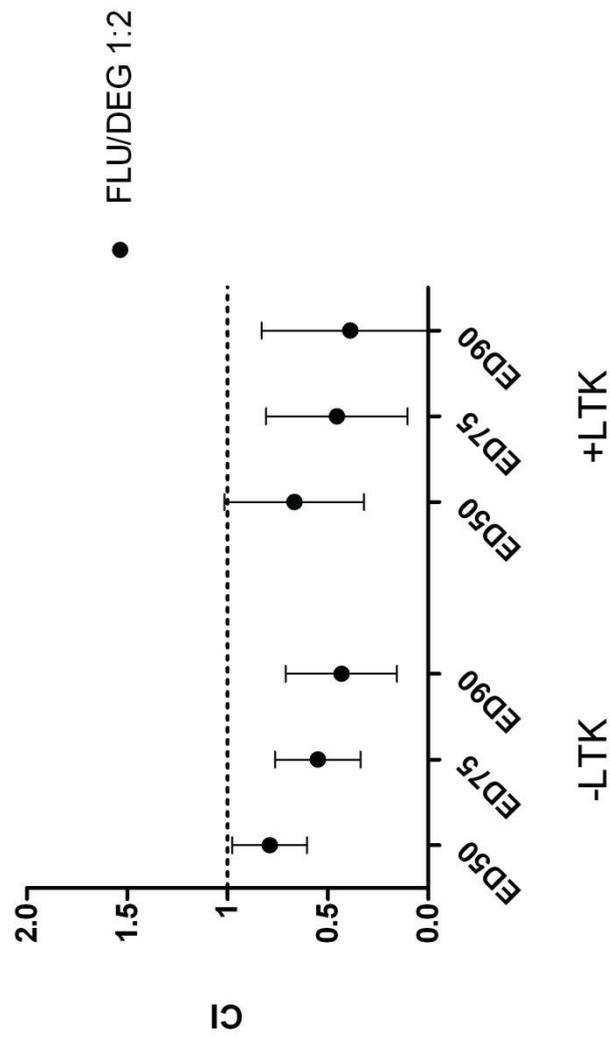


Fig 9B

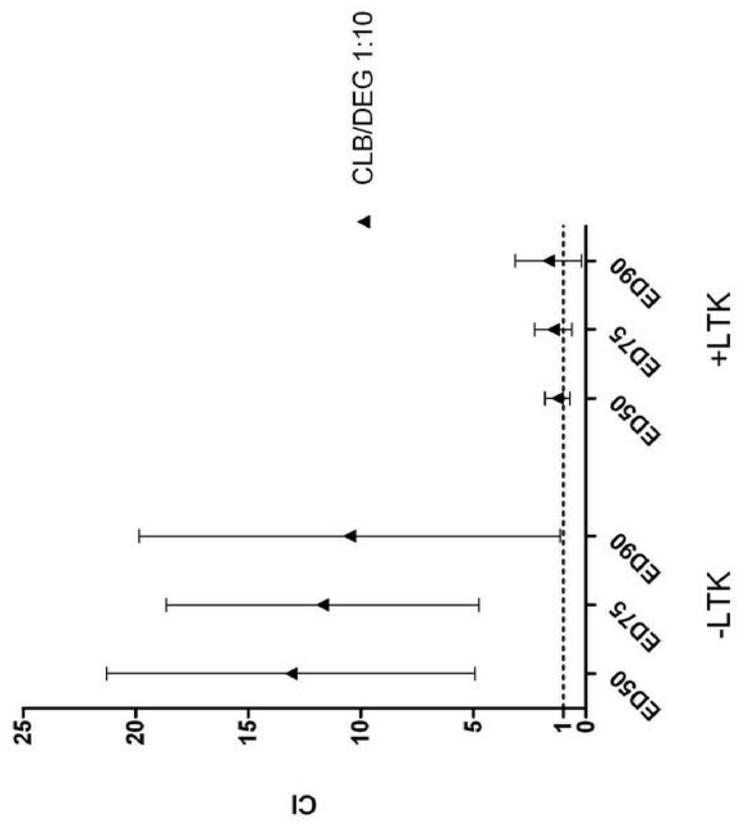
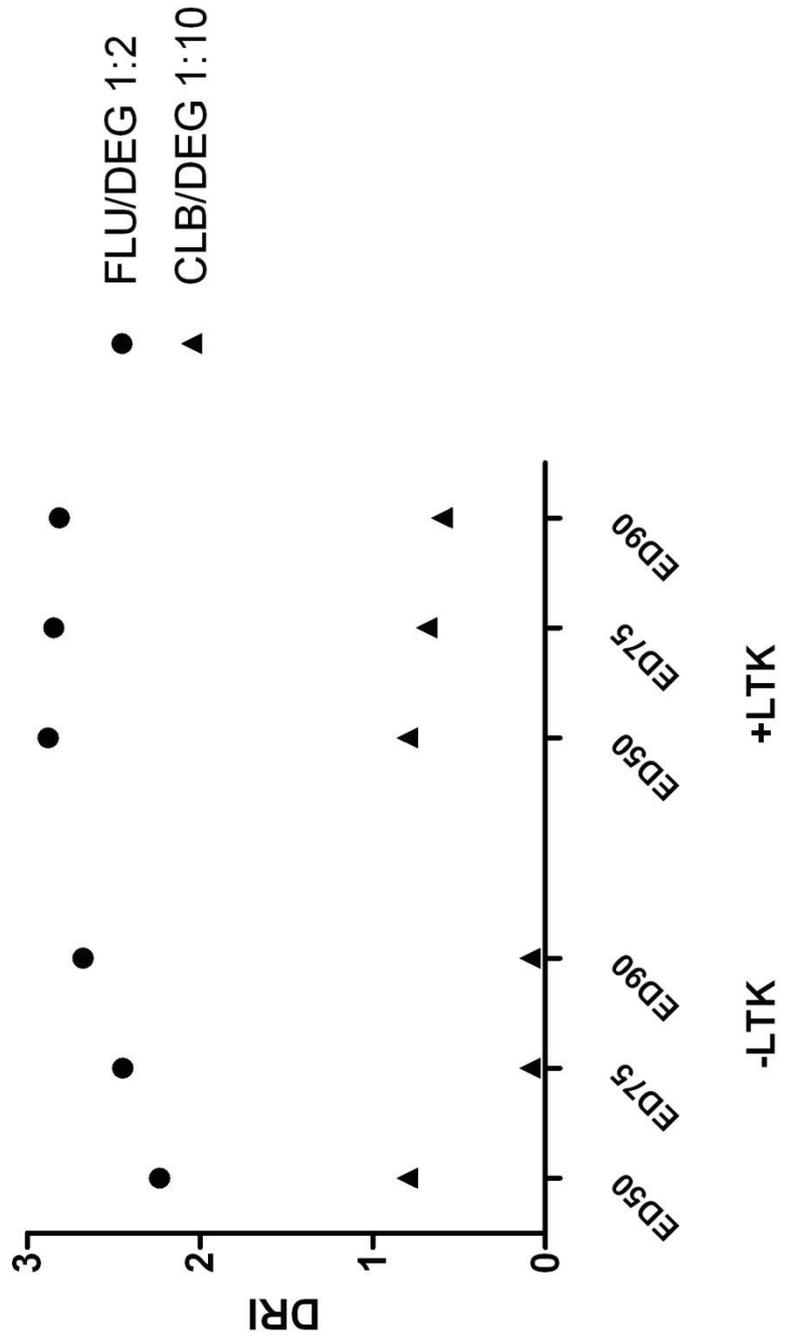


Fig 10



**Fig 11A**

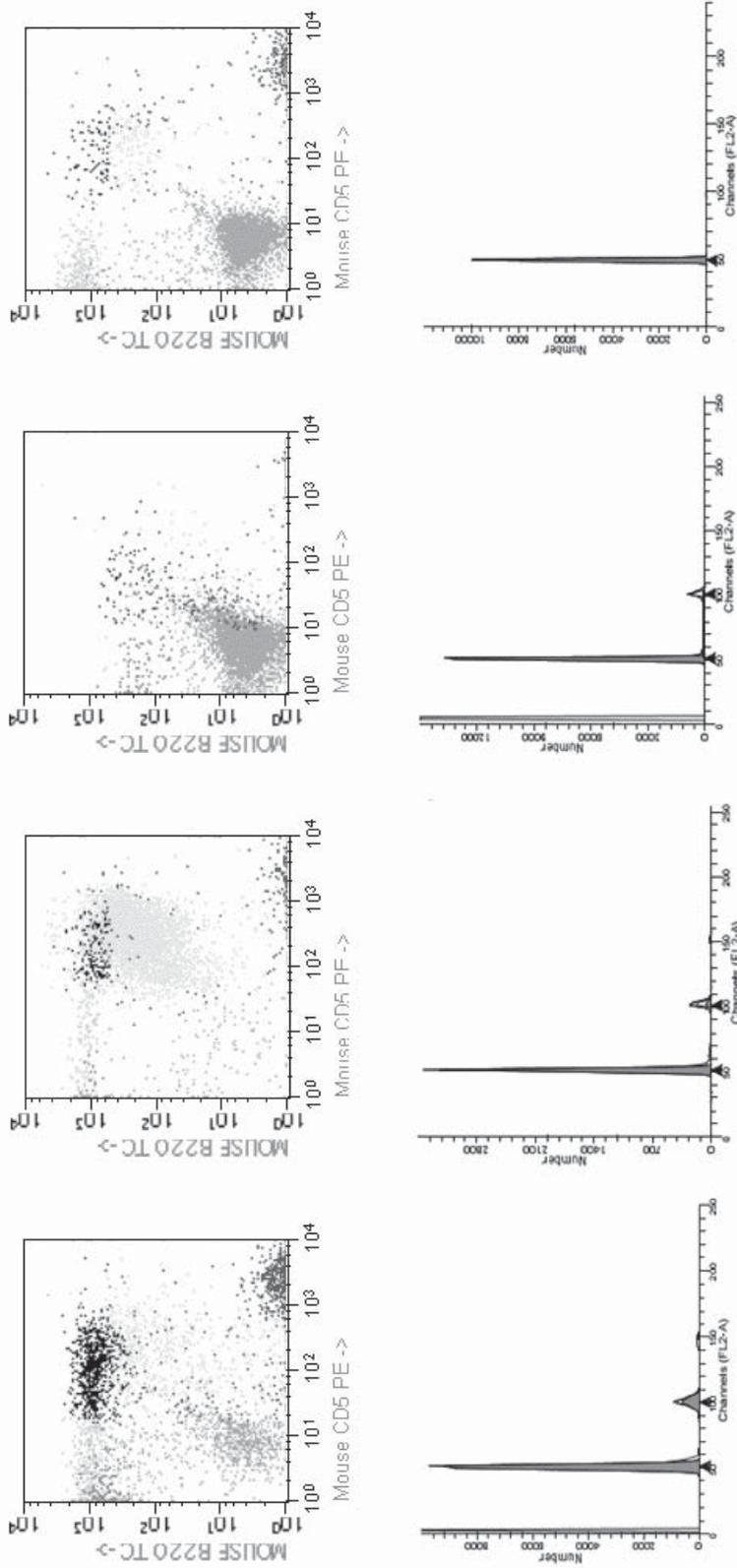
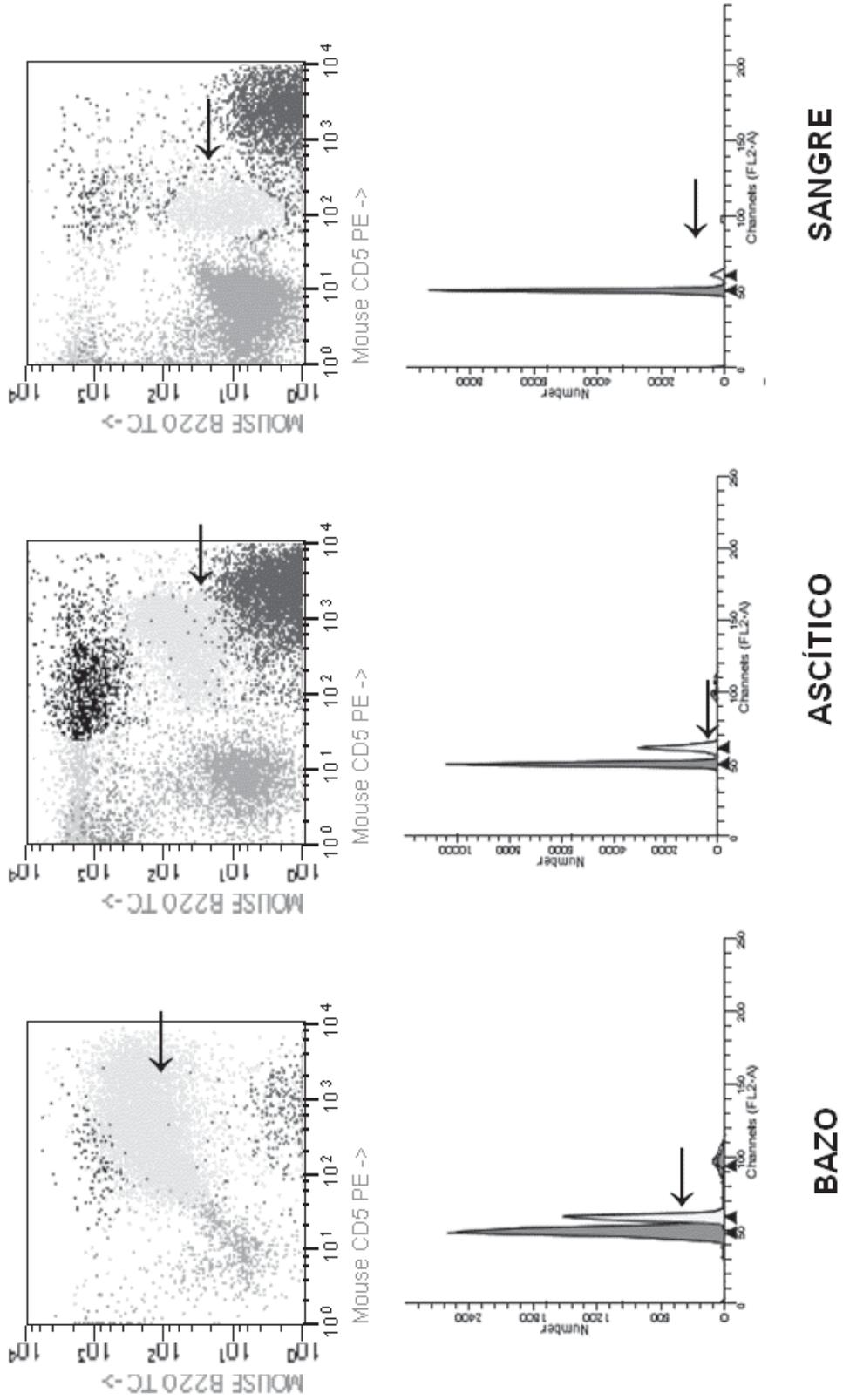


Fig 11B



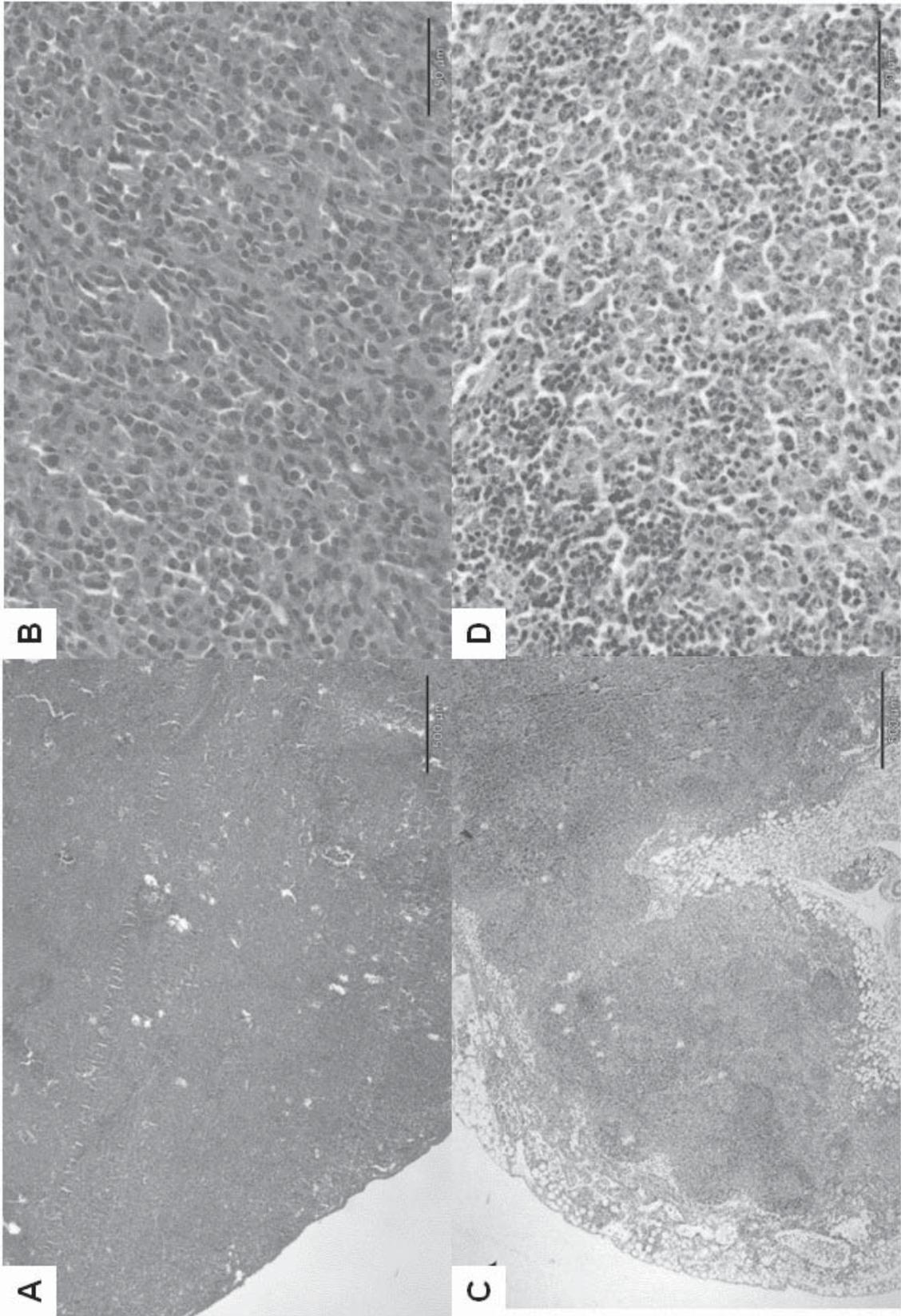


Fig 12A

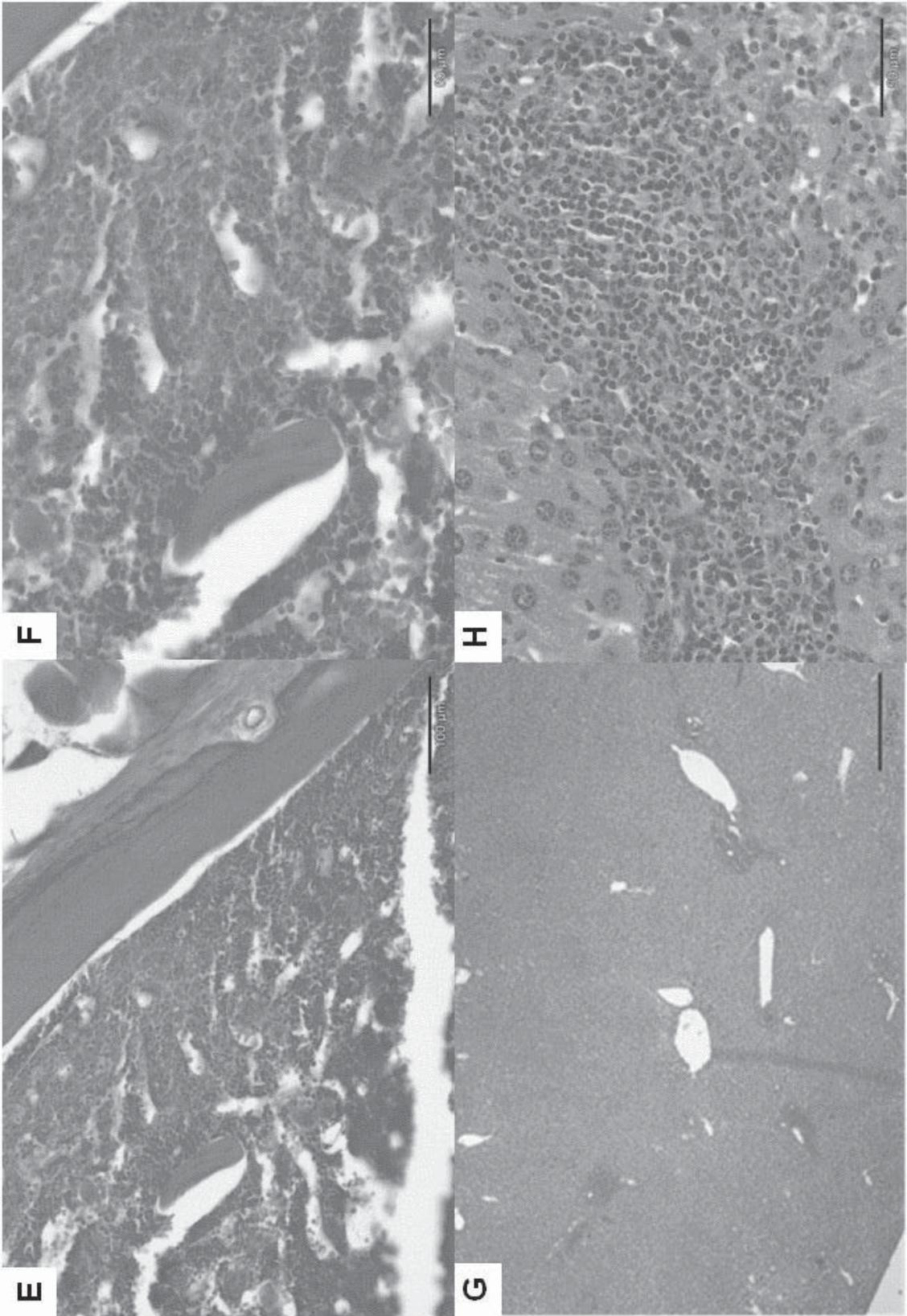


Fig 12B

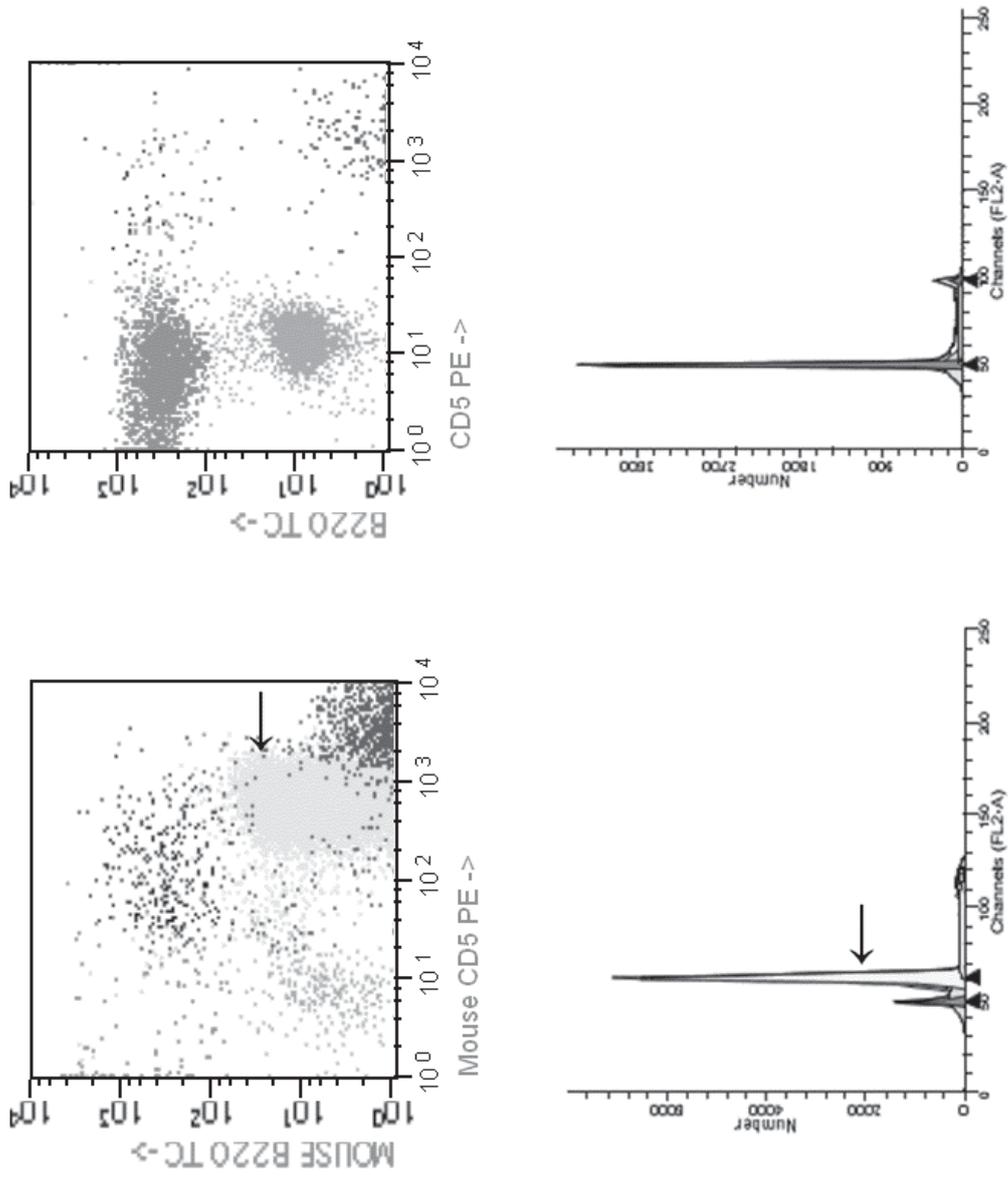
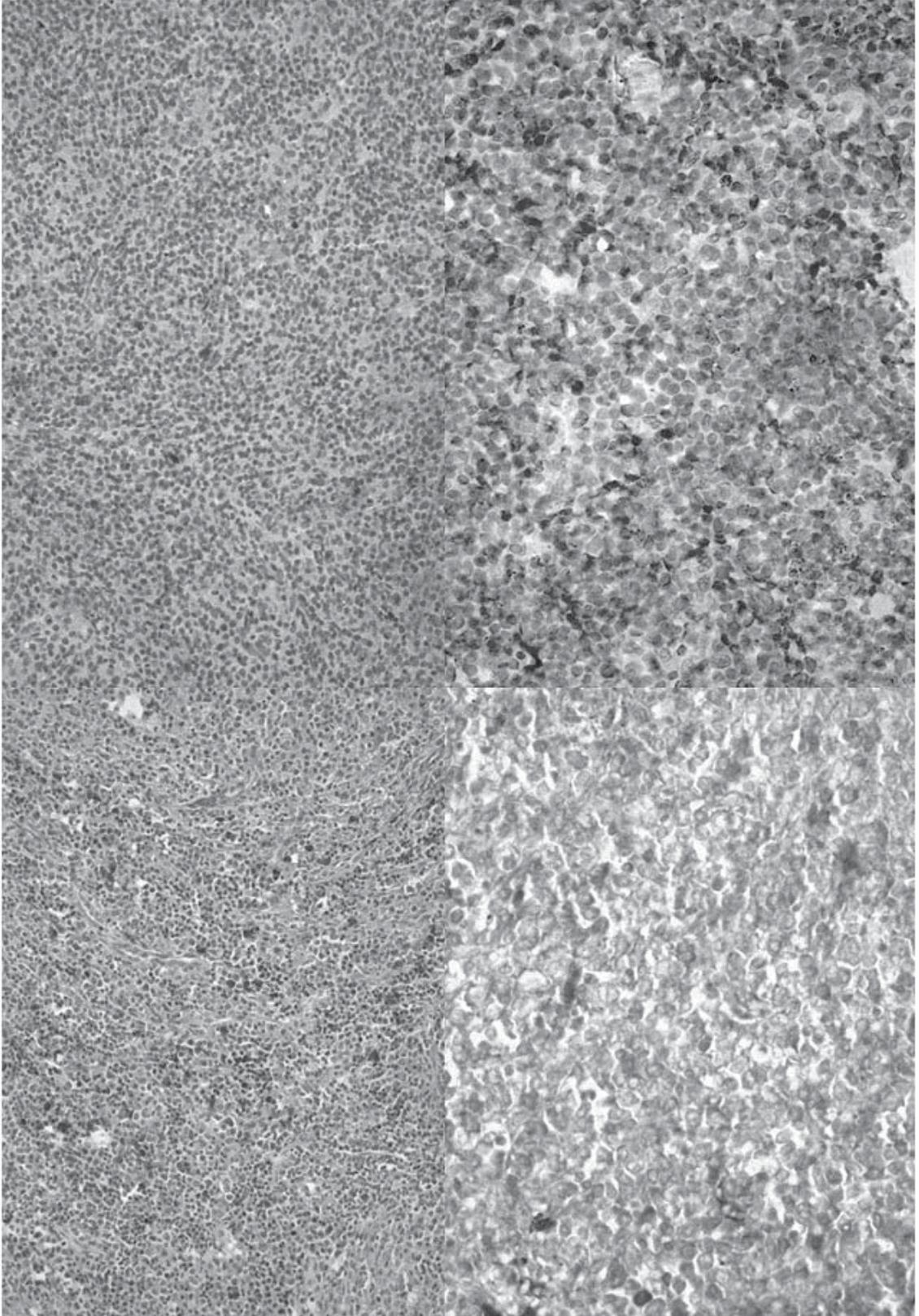


Fig 13



**Fig 14**

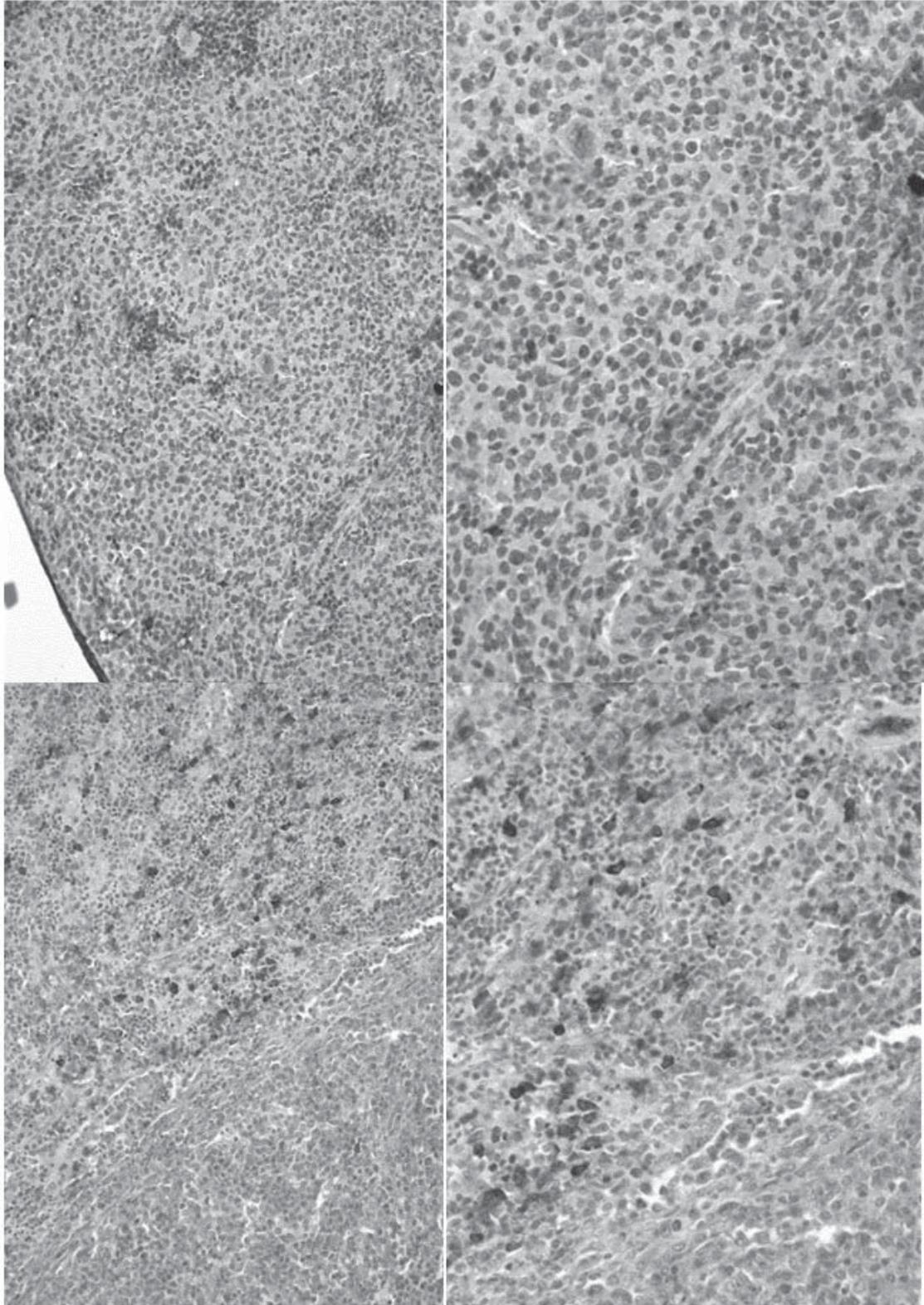
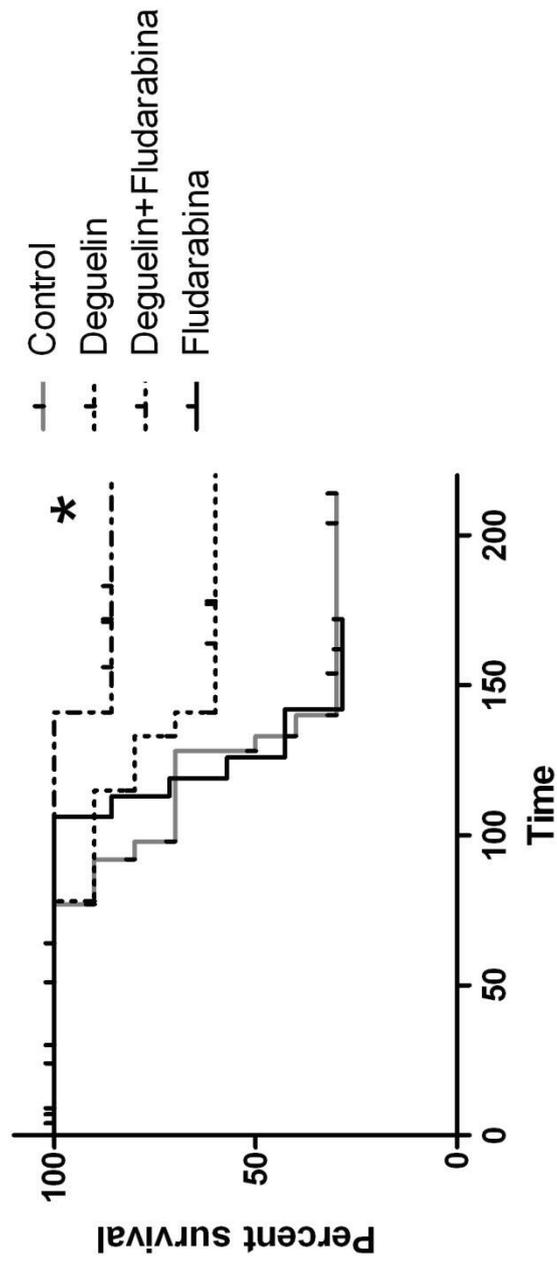


Fig 15



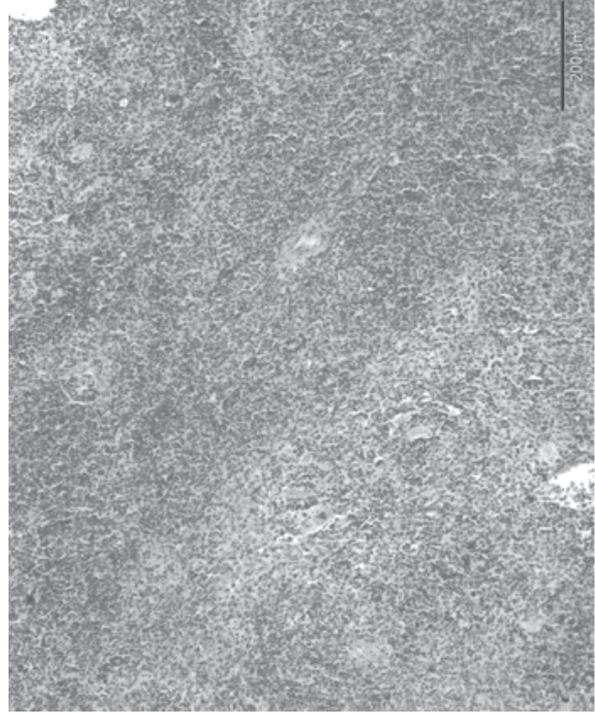
**Fig 16**

Fig 17

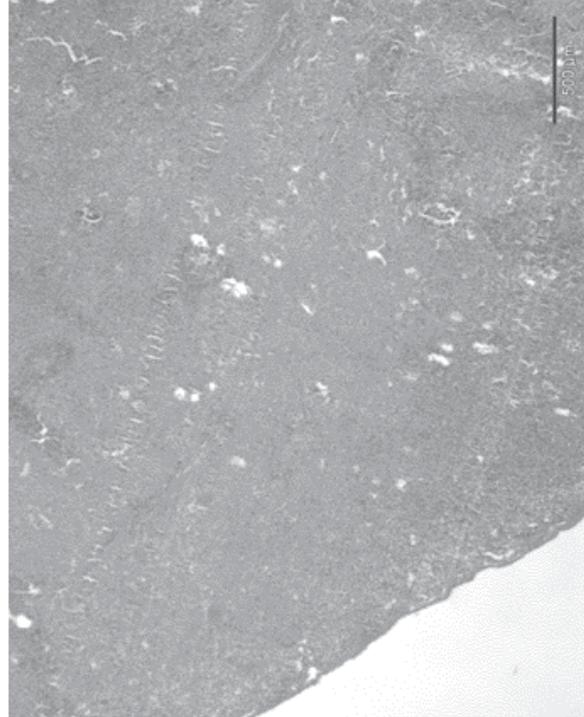
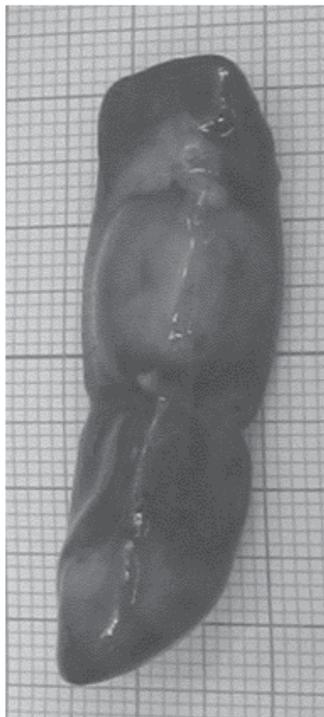


**Fig 18 A**

**+ DEG**



**- DEG**



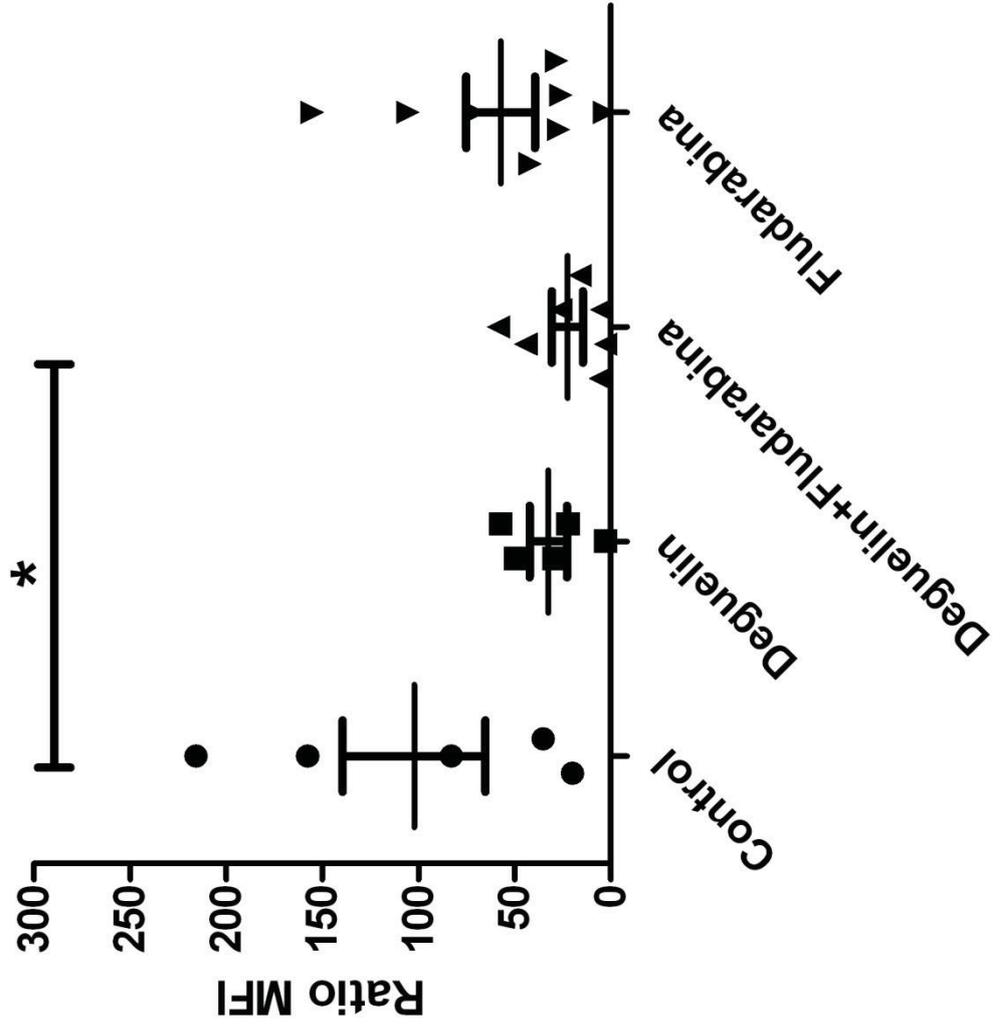


Fig 18 B

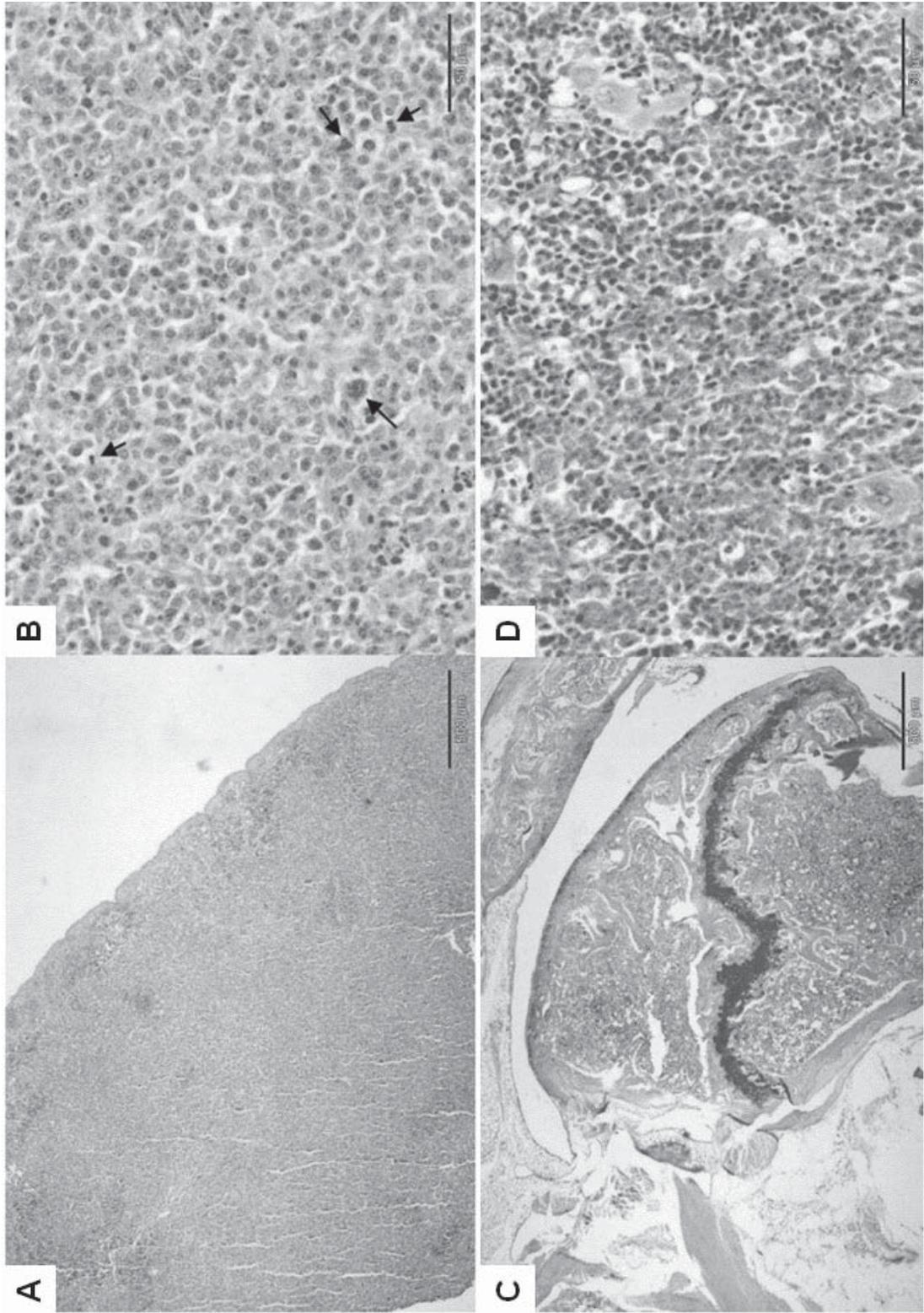


Fig 19

Fig 19

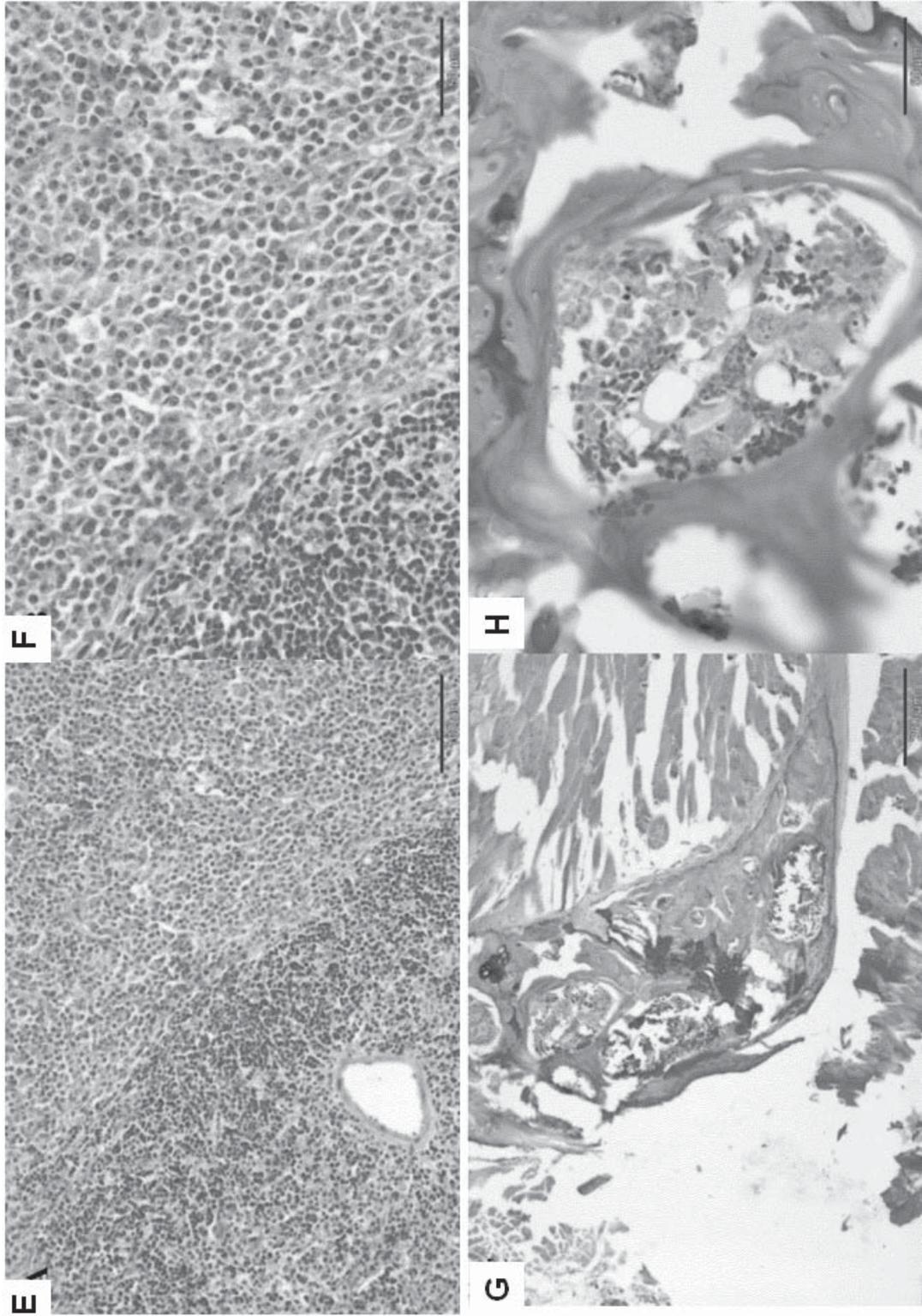
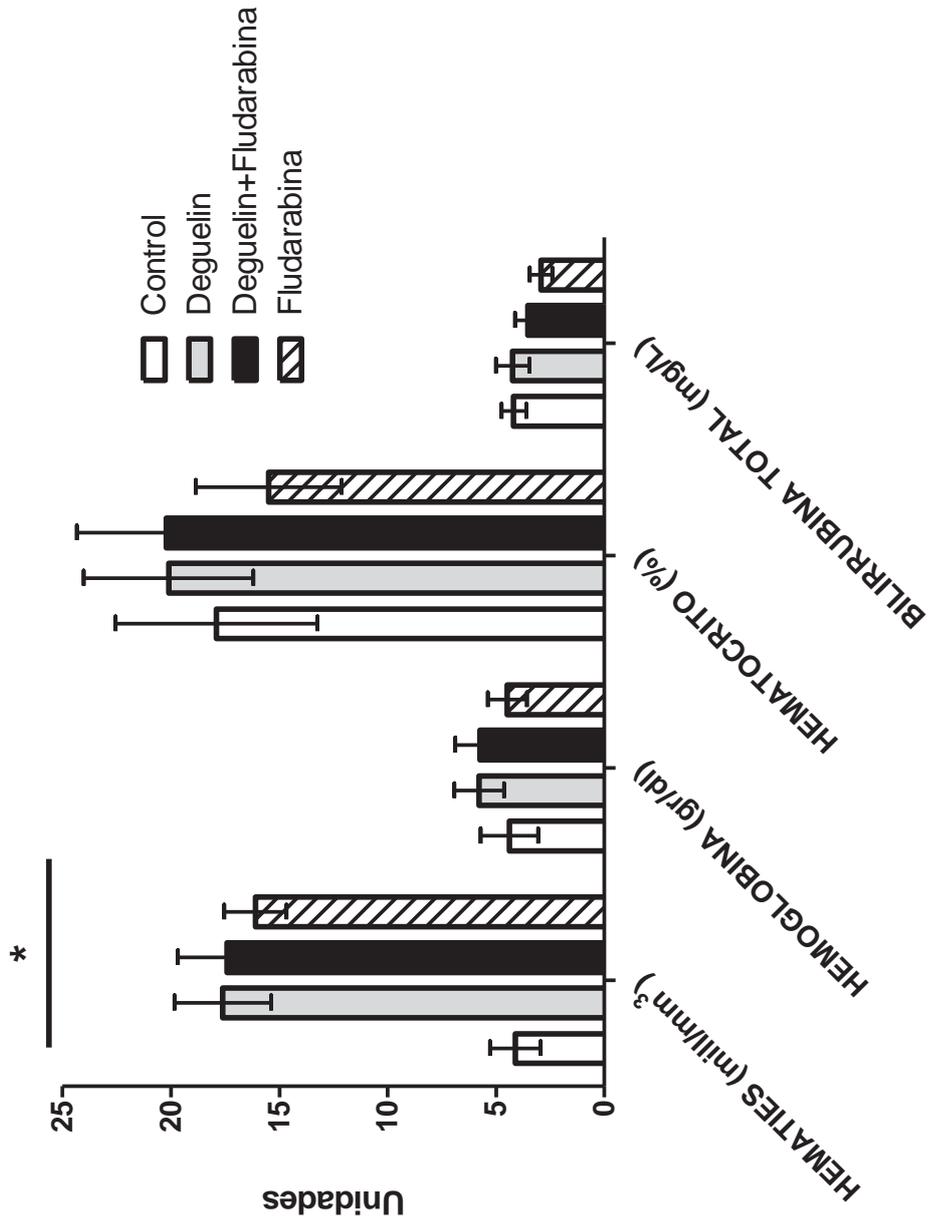


Fig 20 A



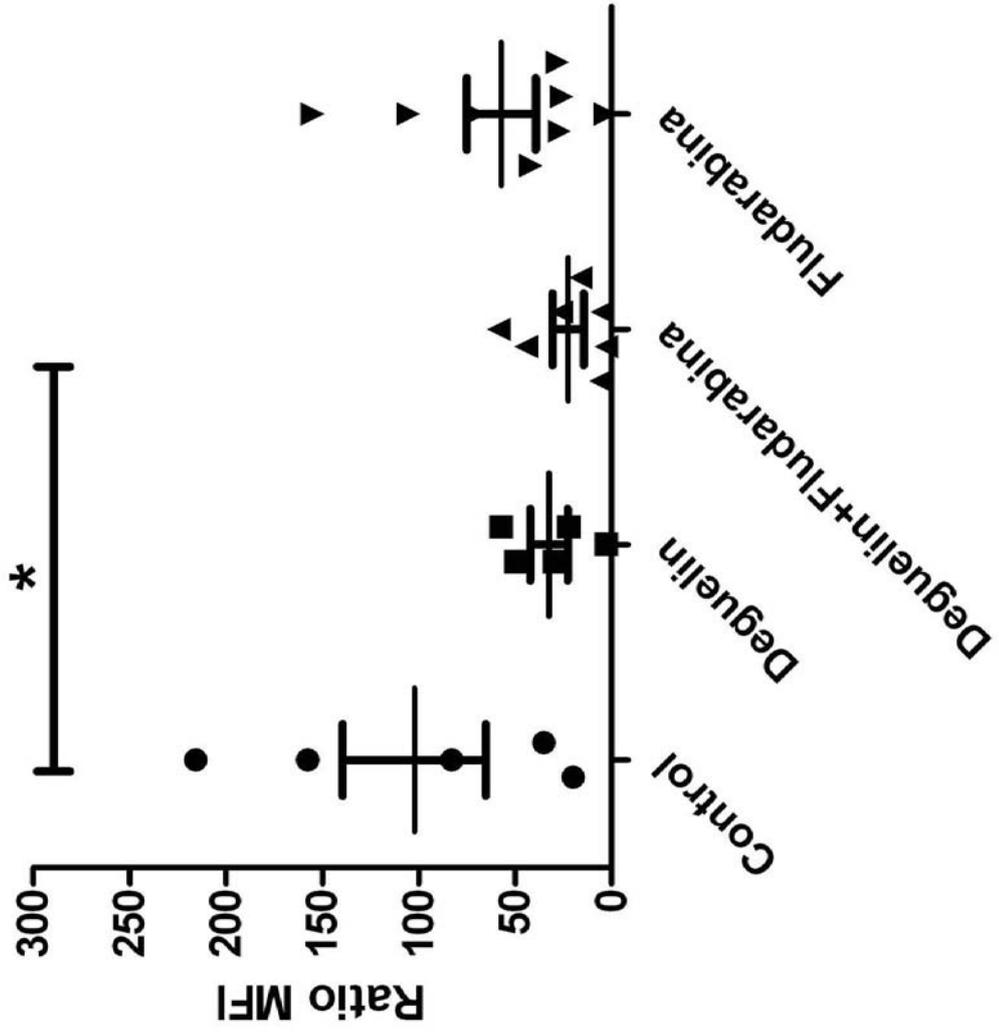
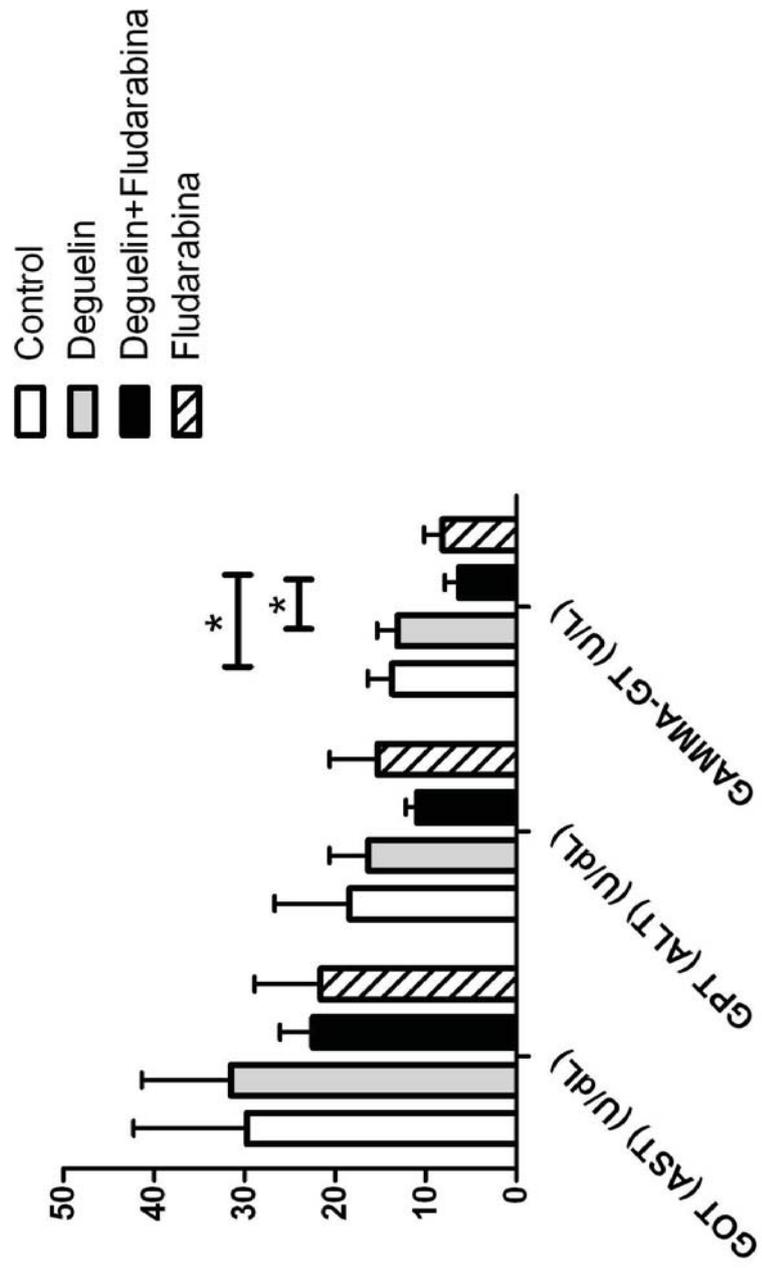


Fig 20 B

Fig 21 A



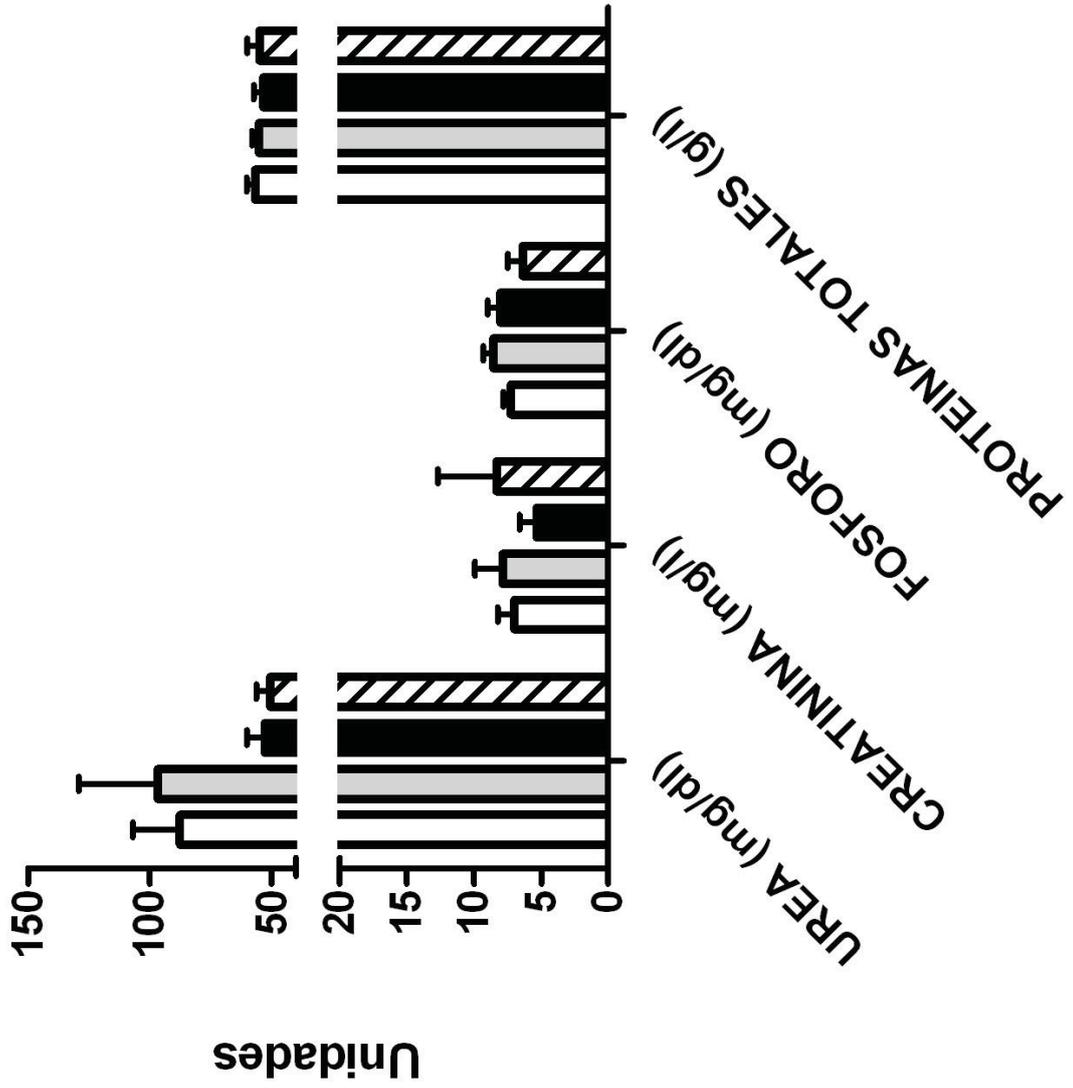


Fig 21 B

Fig 22

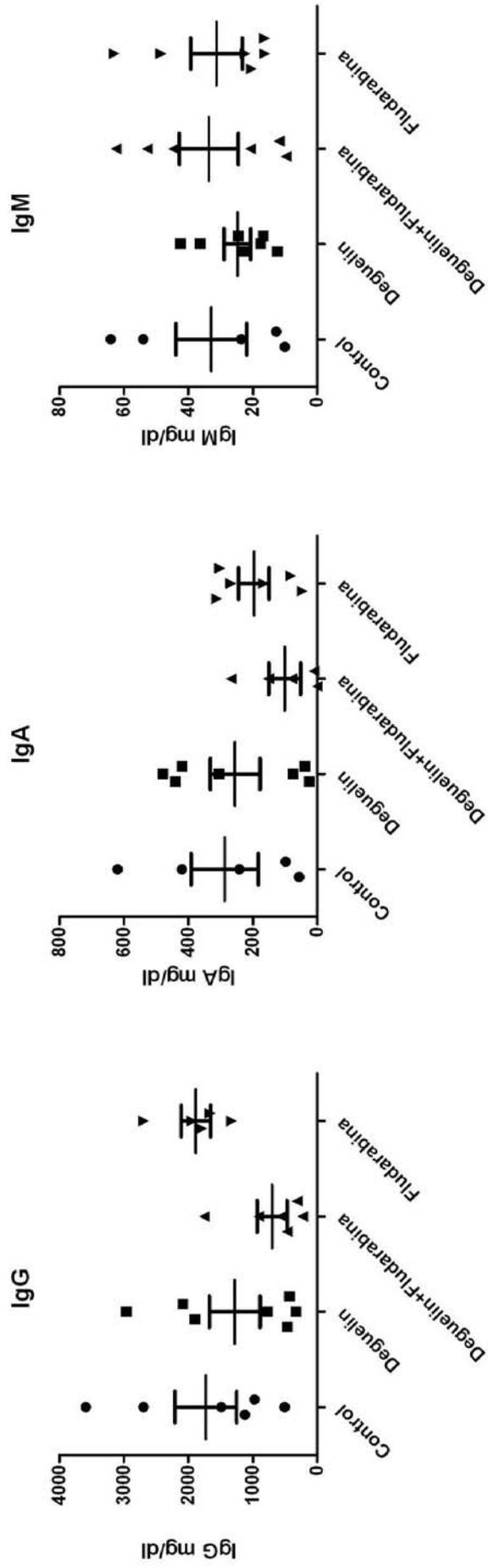
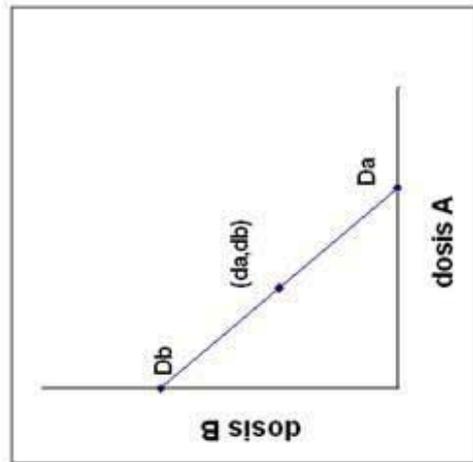


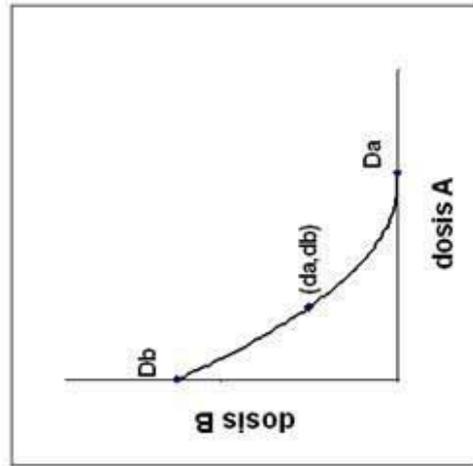
Fig 23

Aditividad



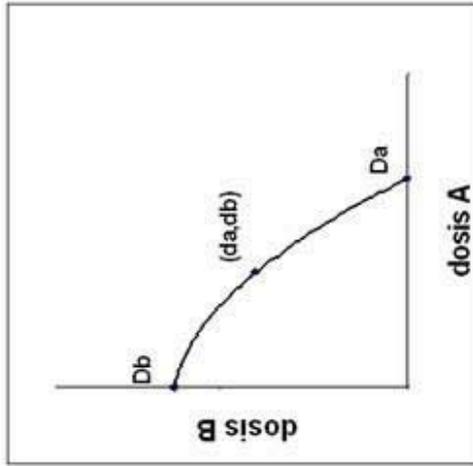
$$da/Da + db/Db = 1$$

Sinergia



$$da/Da + db/Db < 1$$

Antagonismo



$$da/Da + db/Db > 1$$



- ②① N.º solicitud: 201330803  
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.05.2013  
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X         | GEERAERTS B et al. Deguelin inhibits expression of I kappa B alpha protein and induces apoptosis of B-CLL cells in vitro. Leukemia England Agosto 2007 (08.2007) VOL: 21 No: 8 Págs: 1610-1618 ISSN 0887-6924 (Print) Doi: pubmed:17568818. | 1-4                        |
| A         | WO 2013024095 A1 (MORPHOSYS AG et al.) 21.02.2013, página 12, líneas 24-33; ejemplo 1.  | 1-15                       |
| A         | WO 2012045010 A1 (PORTOLA PHARM INC et al.) 05.04.2012, ejemplo 3.  | 1-15                       |
| A         | US 2007232592 A1 (DELAVALT PATRICK et al.) 04.10.2007, párrafos [0001],[0021]-[0024].   | 1-15                       |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

|   |  |                              |
|---|--|------------------------------|
| <p><b>Fecha de realización del informe</b><br/>11.06.2014</p> | <p><b>Examinador</b><br/>N. Vera Gutiérrez</p> | <p><b>Página</b><br/>1/4</p> |
|---|--|------------------------------|

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K31/357** (2006.01)

**A61K31/7076** (2006.01)

**A61P35/02** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, XPESP2

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.06.2014

**Declaración**

|   |                       |           |
|---|-----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 3-15 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1-2  | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 5-15 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1-4  | <b>NO</b> |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación  | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01       | GEERAERTS B et al. Deguelin inhibits expression of I $\kappa$ B protein and induces apoptosis of B-CLL cells in vitro. Leukemia England Agosto 2007 (08.2007) VOL: 21 No: 8 Págs: 1610-1618 ISSN 0887-6924 (Print) Doi: pubmed:17568818. | 31.07.2007        |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención se refiere al uso de una composición que comprende deguelina para la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica humana. Se refiere también al uso de una composición que comprende deguelina para la elaboración de un medicamento para su uso como terapia coadyuvante administrada simultánea, alternativa o sucesivamente a una terapia primaria adecuada para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica humana, así como a un kit que comprende: una primera unidad de dosis con fludarabina y un vehículo farmacéuticamente aceptable; una segunda unidad de dosis con deguelina y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y un medio contenedor de las dos unidades de dosificación.

El documento D01 divulga un estudio en el que se demuestra que la deguelina es capaz de inducir la apoptosis en las células B de la leucemia linfocítica crónica humana (B-CLL), siendo por tanto un agente terapéutico efectivo para el tratamiento de esta enfermedad y pudiendo ser administrado de manera segura vía intravenosa. Sugieren investigaciones posteriores para su aplicación clínica como agente en solitario o en combinación con otros agentes anticancerosos (entre los agentes tradicionalmente empleados en la terapia de B-CLL se cita la fludarabina).

A la vista del documento D01, se considera que la invención tal como se define en las reivindicaciones 1-2 de la solicitud no es nueva (Artículo 6.1 L.P.).

Respecto a las reivindicaciones 3-4, relativas al uso de una composición que comprende deguelina como terapia coadyuvante administrada con fludarabina como terapia principal, se considera que son nuevas pero no implican actividad inventiva según lo divulgado en D01 (Artículo 8.1 L.P.).

No se han encontrado documentos que divulguen el uso de una composición que comprenda deguelina como terapia coadyuvante administrada con fludarabina como terapia principal, en esas cantidades concretas, ni tampoco documentos que divulguen el kit que comprende estos principios activos en dos diferentes unidades de dosis.

Por tanto, se considera que la invención tal como se define en las reivindicaciones 5-15 de la solicitud cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8. 1 L.P.).