

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 800**

51 Int. Cl.:

A61K 31/704	(2006.01)	A61K 47/40	(2006.01)
A61K 31/282	(2006.01)	A61K 47/48	(2006.01)
A61K 31/337	(2006.01)	B82Y 5/00	(2011.01)
A61K 31/519	(2006.01)	C07J 17/00	(2006.01)
A61K 31/7072	(2006.01)	C07J 41/00	(2006.01)
A61K 33/24	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 43/00	(2006.01)		
C07J 9/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2009 E 09841052 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2404608**

54 Título: **Derivado de colestanol para uso combinado**

30 Prioridad:

04.03.2009 WO PCT/JP2009/000985

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

29.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 534 800 T3

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

DESCRIPCIÓN**Derivado de colestanol para uso combinado****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un agente quimioterapéutico para el cáncer (en lo sucesivo referido como un "agente quimioterapéutico contra el cáncer") y, más particularmente, a un agente quimioterapéutico contra el cáncer que emplea un derivado de colestanol y un agente anticanceroso combinado.

10

Técnica anterior

Hasta la fecha se han desarrollado y clasificado en función de su estructura, mecanismo de acción, etc. una variedad de agentes anticancerosos utilizados en la quimioterapia para el cáncer, que es un modo de terapia contra el cáncer. Sin embargo, la eficacia de tal agente anticanceroso empleado como agente único es insatisfactoria. En cambio, la terapia con múltiples fármacos que emplea una pluralidad de agentes anticancerosos se ha llevado a cabo principalmente en los últimos años desde el punto de vista de la supresión de los efectos secundarios adversos, y se ha reconocido la eficacia de la terapia multi-fármaco.

15

Bajo tales circunstancias, se desean tanto del desarrollo de la nueva combinación de quimioterapia anticancerosa, que tiene menos efectos secundarios adversos y una mayor eficacia que las quimioterapias convencionales, y el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos para el uso en la quimioterapia.

20

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

25

Sin embargo, no se ha informado sobre casos en los que se empleen los derivados de colestanol anteriormente mencionados y otro agente anticanceroso combinados.

30

La Solicitud de Patente Europea Núm. 09 718 009.5 (publicada como documento WO 2009/110235 y EP 2 251 014 A1 después de la fecha de presentación de la presente patente) describe el uso combinado de un derivado de colestanol y un agente anticanceroso. No se menciona el irinotecan como agente anticanceroso.

35

[Documento de Patente 1]	JP-A-2000-191685
[Documento de Patente 2]	JP-A-1999-60592
[Documento de Patente 3]	WO 2005/007172 (Folleto)
[Documento de Patente 4]	WO 2007/026869 (Folleto)

Descripción de la invención**Problemas a resolver por la invención**

Así, la presente invención está dirigida a la provisión de un agente quimioterapéutico contra el cáncer que tiene menos efectos secundarios y una eficacia excelente.

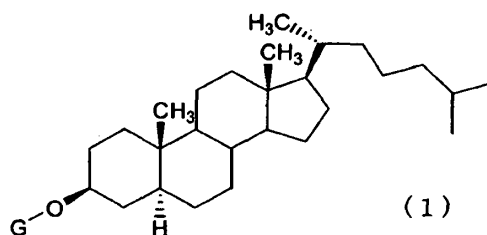
40

Medios para resolver los problemas

En vista de lo anterior, los autores de la presente invención han llevado a cabo estudios exhaustivos, y han encontrado que un se puede lograr efecto anticanceroso notablemente potenciado mediante el empleo, combinado, de un derivado de colestanol representado por la fórmula (1) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo y un agente quimioterapéutico conocido (agente anticanceroso), y por lo tanto el uso combinado de estos agentes farmacéuticos en la quimioterapia del cáncer es muy útil.

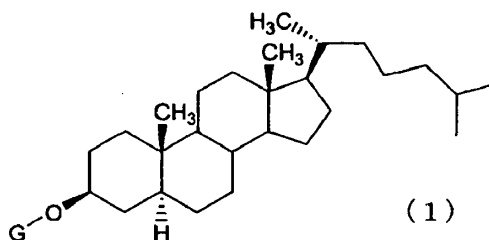
50

Por consiguiente, la presente invención está dirigida a los siguientes apartados (1) a (14). (1) Un agente quimioterapéutico contra el cáncer que comprende, combinado, un derivado de colestanol representado por la fórmula (1):



(en donde G representa GlcNAc-Gal- o GlcNAc-) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo, e irinotecán como un agente anticanceroso.

- 5 (2) Un agente quimioterapéutico contra el cáncer de acuerdo con el apartado (1), que es un agente de composición.
- (3) Un agente quimioterapéutico contra el cáncer de acuerdo con el apartado (1) anterior, que está en la forma de un kit que incluye un fármaco que contiene un derivado de colestanol y un fármaco que contiene un agente anticanceroso.
- 10 (4) Un agente quimioterapéutico contra el cáncer de acuerdo con el apartado (3) anterior, en donde el fármaco que contiene un derivado de colestanol es una formulación liposomal.
- (5) El uso, combinado, de un derivado colestanol representado por la fórmula (1):



(en donde G representa GlcNAc-Gal- o GlcNAc-) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo e irinotecán como agente anticanceroso, para la producción de un agente quimioterapéutico contra cáncer.

Efectos de la invención

A través del empleo del agente quimioterapéutico contra el cáncer y la quimioterapia contra el cáncer de acuerdo con la invención presente, se pueden realizar la prevención y tratamiento del cáncer con seguridad y mayor eficacia.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1-A es un gráfico que muestra los efectos inhibidores la proliferación celular de un agente anticanceroso (CDDP o L-OHP), GC-CD, y un agente anticanceroso + GC-CD sobre células de colon 26;

La Fig. 1-B es un gráfico que muestra los efectos inhibidores de la proliferación celular de un agente anticanceroso (5-FU, PTX, DTX, o CPT), GC-CD, y el agente anticanceroso + GC-CD sobre células de colon 26;

La Fig. 1-C es un gráfico que muestra los efectos inhibidores de la proliferación celular de CPA, GC-CD, y CPA + GC-CD sobre células de colon 26;

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

La Fig. 3 es un gráfico que muestra los efectos inhibidores de la proliferación celular de CDDP, GGC-CD, y CDDP + GGC-CD sobre células de colon 26, células MKN45, células NCIH226, o células colo201;

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

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

La Fig. 6 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral de la administración sola, retardada de CDDP, GC-CD, y CDDP + GC-CD contra la diseminación peritoneal causada por las células de colon26 inoculadas por vía intraperitoneal en ratones, después de la confirmación de la diseminación peritoneal en el mesotelio de ratones;

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

La Fig. 8 es un gráfico que muestra el efecto de suprimir o reducir el crecimiento del tumor al que se inocularon por vía subcutánea en ratones células de colon26, tras la administración única de CDDP, GGC-CD, o CDDP + GGC-CD; y

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

Descripción detallada de realizaciones preferidas

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

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

Entre los derivados de colestanol (1) en los que G es GlcNAc-, G es preferiblemente GlcNAc β -.

De estos, se prefieren las especies en las que G es GlcNAc β 1,4-Gal β - y GlcNAc β -.

Los derivados de colestanol anteriormente mencionados pueden ser producidos a través de un método, por ejemplo, descrito en los Documentos de Patente 1-4 anteriormente mencionados o un método similar.

El derivado de colestanol representada por (1) forma fácilmente un complejo de inclusión con una ciclodextrina o un derivado de la misma. Por lo tanto, el derivado colestanol empleado en la presente invención puede ser un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo. En la formación de tales compuestos de inclusión, se deben tomar en consideración el tamaño de la molécula huésped que vaya a ser incluida, la interacción de Van der Waals entre la molécula huésped y la ciclodextrina, y el enlace de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la ciclodextrina y la molécula huésped. Por lo tanto, los compuestos huésped insolubles no siempre forman los compuestos de inclusión correspondientes. Sin embargo, el derivado colestanol de la presente invención puede formar buenas complejos de inclusión con ciclodextrina.

Los ejemplos de la ciclodextrina que forman el compuesto de inclusión de ciclodextrina de la presente invención incluyen ciclodextrinas tales como α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, y γ -ciclodextrina; y derivados de ciclodextrina tales como metil- β -ciclodextrina, 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, monoacetil- β -ciclodextrina, y 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina. De estos, se prefiere la 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina para la obtención de una mejor solubilidad.

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

No se impone ninguna limitación concreta sobre la concentración de la disolución del derivado de colestanol (1), siempre y cuando el derivado de colestanol pueda formar un compuesto de inclusión con la ciclodextrina. Generalmente, la concentración es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50% en masa, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30% en masa.

El compuesto de inclusión de ciclodextrina producido de este modo es altamente soluble en agua y, por lo tanto, exhibe de manera eficaz el efecto del huésped in vivo. Otra ventaja del compuesto de inclusión de ciclodextrina es asegurar resultados de ensayo in vitro coherentes.

Alternativamente, el derivado colestanol (1) se puede preparar en una formulación liposomal, en donde el derivado de colestanol se puede suministrar de manera más eficaz al sitio de expresión de la acción. Otra ventaja del compuesto de inclusión de ciclodextrina es asegurar resultados de ensayo in vitro consistentes.

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

El contenido de derivado de colestanol en la formulación liposomal es preferiblemente de 0,3 a 2,0 moles, más preferiblemente 0,8 a 1,5 moles, con respecto a 1 mol del componente de membrana.

El componente de membrana puede ser un fosfolípido. Los ejemplos específicos de los fosfolípidos empleados preferiblemente incluyen fosfolípidos naturales y sintéticos tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y ácido fosfatídico; mezclas de los mismos; y fosfolípidos naturales modificados tales como lecitina acuosa. Los ejemplos de la especie más preferida incluyen fosfatidilcolina (1 α -dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)).

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

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

Además de los componentes anteriormente mencionados, si fuera necesario, el liposoma puede contener además un estabilizador de la estructura de la membrana, tal como colesterol, ácidos grasos, fosfato de diacetilo, etc.

La disolución acuosa empleada para dispersar el componente de membrana es preferiblemente agua, solución salina fisiológica, tampón, disolución acuosa de azúcar, o una de sus mezclas. Se puede utilizar cualquiera de un tampón orgánico o inorgánico, siempre que el tampón tenga una acción tamponadora en la proximidad de la concentración de iones de hidrógeno del fluido corporal. Los ejemplos de tales tampones incluyen un tampón de fosfato.

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

En la presente memoria, el agente anticanceroso que se utiliza combinado con el derivado de colestanol representado por la fórmula (1) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo, es el irinotecán (CPT-II). Además, se pueden usar otros agentes quimioterapéuticos contra el cáncer conocidos. Se emplean preferiblemente agentes terapéuticos convencionales que se han establecido con respecto al cáncer de la terapia diana.

Los ejemplos específicos incluyen agentes alquilantes tales como Ciclofosfamida, Ifosfamida, Melfalán (L-PAM), Busulfán y Carboquina; antagonistas del metabolismo, tales como 6-Mercaptopurina (6-MP), Metotrexato (MTX), 5-Fluorouracilo (5-FU), Tegafur, Enocitabina (BHAC), y compuestos de Pemetrexed (pemetrexed, MTA), etc.); antibióticos carcinostáticos tales como Actinomicina D, Daunorrubicina, Bleomicina, Peplomycin, Mitomicina C, Aclarrubicina, y Neocarzinostatina (NCS); alcaloides de plantas, tales como Vincristina, Vindesina, Vinblastina, agentes anticancerosos de taxano (Taxótero (Docetaxel) y Taxol (Paclitaxel, TXL), etc.); y compuestos de platino tales como Cisplatino (CDDP), Carboplatino y Oxaliplatino (L-OHP). Estos agentes anticancerosos se pueden utilizar solos o combinando dos o más especies.

Como se muestra en los Ejemplos descritos más adelante, cuando el derivado colestanol representado por la fórmula (1) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo se utiliza combinado con un agente anticanceroso, la proliferación de las células cancerosas de varios tipos está fuertemente suprimida, en comparación con el caso de la administración de sólo cada agente. Por lo tanto, esta quimioterapia combinada puede mejorar drásticamente la eficacia terapéutica y la mitigación de efectos secundarios adversos, y un producto farmacéutico que contiene estos ingredientes es un agente quimioterapéutico útil contra el cáncer.

No se impone ninguna limitación concreta sobre el cáncer que se puede tratar eficazmente mediante la administración del agente quimioterapéutico contra cáncer de la presente invención. Los ejemplos de cáncer diana incluyen tumores malignos tales como cáncer gástrico, cáncer de intestino grueso, cáncer de páncreas, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vesícula biliar, cáncer de esófago, cáncer de hígado, cáncer de mama, mesotelioma y cáncer de próstata.

La forma del agente quimioterapéutico contra cáncer de la presente invención puede ser un agente de composición en el que los ingredientes anteriormente mencionados se mezclan en una proporción adecuada, cada uno en una cantidad eficaz, para formar una sola forma de dosificación (de tipo de formulación individual), o puede ser un kit que consiste en la forma de dosificación respectiva de los ingredientes anteriormente mencionados, cada uno de los cuales se forma independientemente incluyendo cada cantidad efectiva, y que permite que las formas de dosificación se puedan administrar simultáneamente o por separado a intervalos (tipo de doble formulación).

Se un modo similar a las formulaciones farmacéuticas generales, no se impone ninguna limitación concreta sobre la forma de dosificación de la formulación anteriormente descrita, y la forma puede ser cualquier forma sólida tal como comprimidos, forma líquida tal como la inyectable, disolución de polvo seco antes de su uso, etc.

No se impone ninguna limitación concreta sobre la ruta de administración de la formulación, y la vía apropiada se puede determinar en función de la forma de dosificación de los agentes. Por ejemplo, una disolución inyectable se puede administrar por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, o intraperitoneal, y una forma sólida se puede administrar por vía oral o enteral.

La formulación se puede preparar a través de un método conocido en la técnica. También se pueden emplear todos los vehículos farmacéuticamente aceptables (excipientes o diluyentes tales como una carga, un agente para conferir volumen, y un aglutinante) empleados generalmente en la técnica.

5 Por ejemplo, se puede preparar una forma peroral sólida mezclando los ingredientes farmacológicos de la presente invención con un excipiente, y con un aglutinante, disgregante, lubricante, colorante, agente aromatizante, desodorante, etc. opcional, y formando la mezcla en comprimidos, comprimidos recubiertos, gránulos, polvo, cápsulas, etc. a través de un método conocido en la técnica. Estos aditivos pueden ser los empleados generalmente
10 en la técnica. Los ejemplos del excipiente incluyen lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa microcristalina, y ácido silícico. Los ejemplos del aglutinante incluyen agua, etanol, propanol, jarabe simple, glucosa líquida, almidón líquido, gelatina líquida, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilalmidón, metilcelulosa, etilcelulosa, goma laca, fosfato de calcio, y polivinilpirrolidona. Los ejemplos del disgregante incluyen almidón seco, alginato de sodio, polvo de agar, hidrogenocarbonato de sodio, carbonato de calcio, lauril sulfato de sodio, estearato de monoglicerilo y lactosa. Los ejemplos del lubricante incluyen talco
15 purificado, sales estearato, bórax, y polietilenglicol. Los ejemplos del agente aromatizantes incluyen sacarosa, piel de naranja, ácido cítrico, y ácido tartárico.

Se puede preparar una formulación líquida oral mezclando los ingredientes farmacológicos de la presente invención con un agente aromatizante, tampón, estabilizador, desodorante, etc., y formando la mezcla en un agente líquido interno, jarabe, elixir, etc. a través de un método conocido en la técnica. El agente aromatizante empleado en la preparación puede ser cualquiera de los miembros anteriormente mencionados. Los ejemplos del tampón incluyen citrato de sodio. Los ejemplos del estabilizador incluyen tragacanto, goma arábica, y gelatina.

25 Las disoluciones para inyectables se pueden preparar mezclando los ingredientes farmacológicos de la presente invención con aditivos tales como un regulador de pH, tampón, estabilizador, agente de tonicidad, y el agente anestésico local, etc., y formando la mezcla a través de un método conocido en la técnica, para proporcionar de ese modo líquidos inyectables subcutáneos, intramusculares, e intravenosos. Los ejemplos del regulador del pH y el tampón incluyen citrato de sodio, EDTA, ácido tioglicólico, y ácido tioláctico. Los ejemplos del anestésico local
30 incluyen hidrocloreuro de procaína e hidrocloreuro de lidocaína. Los ejemplos del agente de tonicidad incluyen cloruro sódico y glucosa.

Los supositorios se pueden preparar mezclando los ingredientes farmacológicos de la presente invención con un portador para la formulación conocido en la técnica tal como polietilenglicol, lanolina, manteca de cacao, y triglicérido de ácido graso, y con un tensioactivo opcional tal como Tween (marca registrada), y formando la mezcla en supositorios mediante un método conocido en la técnica.

Las pomadas se pueden preparar mezclando los ingredientes farmacológicos de la presente invención con aditivos opcionales empleados generalmente en la técnica tal como una base, estabilizador, agente hidratante, y conservante, y formando la mezcla en pomadas a través de un método conocido en la técnica. Los ejemplos de la base incluyen parafina líquida, vaselina blanca, cera de abejas blanca, alcohol octildodecílico y parafina. Los ejemplos del conservante incluyen p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de etilo, y p-hidroxibenzoato de propilo.

45 Se pueden preparar cataplasmas mediante la aplicación de la pomada, crema, gel, pasta, etc. anteriormente mencionados a un soporte empleado generalmente a través de un método rutinario.

Ejemplos de soportes apropiados incluyen telas tejidas y no tejidas elaboradas de algodón, fibra corta o fibra química y películas y láminas de espuma elaboradas de cloruro de vinilo suave, polietileno, poliuretano, etc.

50 Generalmente, la formulación se prepara preferiblemente de manera que tenga un contenido de derivado de colestanol y un contenido de agente anticanceroso de 0,0001 a 80 en peso. % (como ingrediente eficaz).

Cuando se proporciona el agente quimioterapéutico contra cáncer de la presente invención en forma de un kit, el kit puede estar diseñado para embalar independientemente la forma de dosificación respectiva incluyendo por separado el derivado de colestanol representado por la fórmula (1) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo y un agente anticanceroso, cada uno de los cuales se han preparado de la manera anterior, y para utilizar cada formulación farmacéutica tomada por separado a partir del correspondiente paquete respectivo antes de su uso. Alternativamente, cada formulación farmacéutica puede ser mantenida en un paquete adecuado para cada momento de la administración combinada.

60 La dosis del agente quimioterapéutico contra cáncer de la presente invención varía dependiendo del peso corporal, la edad, el sexo, los síntomas de un paciente que lo necesite, la ruta y frecuencia de administración a un paciente que lo necesite, etc. Generalmente, por ejemplo, la dosis diaria para un adulto es de aproximadamente 0,1 a 30

mg/kg como derivado colestanol (1), preferiblemente de 3 a 10 mg/kg. La dosis del agente anticanceroso puede encontrarse dentro de un intervalo establecido con respecto al agente, o puede ser menor que ese intervalo.

5 No se impone ninguna limitación concreta sobre la frecuencia de administración, y el agente se puede administrar una o varias veces al día. Se prefiere una única administración al día. Cuando se utiliza el kit, cada una de las formulaciones que incluye los ingredientes farmacológicos separados se puede administrar simultáneamente o de forma intermitente.

10 La presente invención se describirá a continuación con más detalle por medio de ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes de la invención.

Los Ejemplos 2 a 6 son ejemplos de referencia.

15 Ejemplos

Ejemplo 1

Efecto de la adición del fármaco en la inhibición de la proliferación de células cancerosas

20 Se inocularon células de colon26 (derivadas de cáncer de colon de ratón) en una placa de 96 pocillos (1×10^4 células/50 μ l, medio RPMI-FCS al 10%/pocillo), y se incubaron a 37°C durante 16 horas. A cada pocillo, se añadieron un agente anticanceroso conocido (Cisplatino (abreviado como "CDDP"), Oxaliplatino (abreviado como "L-OHP"), Fluorouracilo (5-FU), Paclitaxel (TXL; abreviado como "PTX"), Docetaxel (TXT; abreviado como "DTX"), Irinotecan (CPT-11; abreviado como "CPT"), o Ciclofosfamida (abreviada como "CPA")) y/o un compuesto de inclusión de ciclodextrina (abreviado como "GC-CD") de un derivado de colestanol en donde G en la fórmula (1) es GlcNAc β - (abreviado como "GC") (dilución múltiple en medio FCS (-): concentración final: $\leq 500 \mu$ M, 50 μ l), seguido de incubación a 37°C durante dos días. GC-CD se preparó de acuerdo con un método descrito en el Ejemplo 1(2) del Documento de Patente 4. Específicamente, se preparó una disolución acuosa al 40% de hidroxipropil- β -ciclodextrina, y se añadió GC a la disolución, seguido de la mezcla con agitación (80°C durante 30 minutos), para preparar así GC-CD.

30 Como control, se emplearon pocillos a los que solo se había añadido medio FCS(-). El recuento de viables se realizó por medio de un kit de recuento de células (producto de Dojin).

35 La tasa (%) de inhibición de la proliferación celular (IPC) se calculó mediante la siguiente ecuación. La Fig. 1 (Figs. 1-A, 1-B, y 1-C) muestra los resultados.

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

Ejemplo 2

Efecto de la inhibición de la proliferación de diversas células cancerosas

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

50 En el Ejemplo 2, se utilizó también un compuesto de inclusión de ciclodextrina (abreviado como "GGC-CD") de un derivado de colestanol en donde G en la fórmula (1) es GlcNAc β 1,4-Gal β - (abreviado como "GGC"). GGC-CD fue producido de una manera similar al método de producción de GC-CD anteriormente mencionado, excepto que el compuesto colestanol se cambió a GGC. Se determinó la tasa de IPC con respecto a las células cancerosas. La Fig. 3 muestra los resultados.

55 Ejemplo 3

Efecto de la adición del fármaco en la inhibición de la proliferación de células cancerosas in vivo

60 En los siguientes Ejemplos, se emplearon ratones Balb/c (6 semanas de edad, hembra) como animales de ensayo.
(1) Se inocularon por vía intraperitoneal células de Colon26 (1×10^4 células/ratón) a los ratones (día 0). Al día siguiente después de la inoculación (día 1), CDDP y/o GC-CD se ajustaron con solución salina fisiológica (solución salina normal de Otsuka) a una concentración de interés, y se administraron CDDP, GC-CD, o CDDP + GC-CD (500 μ l) por vía intraperitoneal a los ratones, seguido de cría. El día 19, los

ratones se diseccionaron, y se midió el peso del mesenterio y el epiplón mayor. Al grupo de control, se le administró únicamente solución salina fisiológica (500 l) (n = 10; 10 ratones/grupo).

La Fig. 4 muestra los resultados.

(2) Se inocularon por vía intraperitoneal células de Colon26 (1×10^4 células/ratón) a los ratones (día 0). El día 1, día 2, día 3, día 6, día 7, y día 8, CDDP y/o GC-CD se ajustaron con solución salina fisiológica (solución salina normal de Otsuka) a una concentración de interés, y se administraron CDDP, GC-CD, o CDDP + GC-CD (500 μ l) por vía intraperitoneal a los ratones, seguido de cría. El día 21, los ratones se diseccionaron, y se midió el peso del mesenterio y el epiplón mayor. Al grupo de control, se le administró únicamente solución salina fisiológica (500 μ l) (n = 10; 10 ratones/grupo).

La Fig. 5 muestra los resultados.

(3) Se inocularon por vía intraperitoneal células de Colon26 (1×10^4 células/ratón) a los ratones (día 0). El día 7, se ajustaron CDDP y/o GC-CD con solución salina fisiológica (solución salina normal de Otsuka) a una concentración de interés, y se administraron CDDP, GC-CD, o CDDP + GC-CD (500 μ l) por vía intraperitoneal a los ratones, seguido de cría. El día 18, los ratones se diseccionaron, y se midió el peso del mesenterio y el epiplón mayor. Al grupo de control, se le administró únicamente solución salina fisiológica (500 μ l) (n = 10; 10 ratones/grupo).

La Fig. 6 muestra los resultados.

Ejemplo 4

Efecto antitumoral mediante la adición de fármacos

Se emplearon Ratones Balb/C (6 semanas de edad, hembra) como animales de ensayo. Se inocularon por vía intraperitoneal células de Colon26 (1×10^4 células/ratón) a los ratones (día 0). El día 2 y/o el día 3, CDDP y/o GC-CD se ajustó con solución salina fisiológica (Otsuka solución salina normal) a una concentración de interés, y se administraron CDDP, GC-CD, o CDDP + GC-CD (500 l) por vía intraperitoneal a los ratones (véase la leyenda de la Fig. 7 para el programa de administración), seguido de cría. La duración de la supervivencia (días) se contó hasta el día 43. Al grupo de control, se le administró únicamente solución salina fisiológica (500 μ l) (n = 10; 10 ratones/grupo).

La Fig. 7 muestra los resultados.

Ejemplo 5

Efecto antitumoral mediante la adición de fármacos

Se emplearon ratones Balb/C (6 semanas de edad, hembra) como animales de ensayo. Se inocularon por vía subcutánea células de Colon26 (5×10^4 células/ratón) a los ratones (día 0). Después de la confirmación de que el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 4 mm (7 a 10 días después de la inoculación), CDDP y/o GGC-CD se ajustaron con solución salina fisiológica (solución salina normal de Otsuka) a una concentración de interés, y se administraron CDDP, GGC-CD, o CDDP + GGC-CD (200 μ l) a los ratones a través de la vena de la cola, seguido de cría. El cambio dependiente del tiempo en el tamaño del tumor se controló hasta el 21 días, y se determinó el volumen del tumor correspondiente. Al grupo de control, se le administró únicamente solución salina fisiológica (200 μ l) (n = 7; 7 ratones/grupo).

La Fig. 8 muestra los resultados.

Ejemplo 6

Efecto inhibidor de la metástasis cancerosa mediante la adición de fármacos

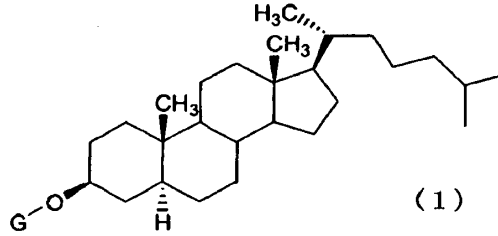
Se emplearon ratones Balb/C (6 semanas de edad, hembra) como animales de ensayo. Se inocularon por vía intraperitoneal células de Colon26 (5×10^4 células/ratón) a los ratones (día 0). Inmediatamente después de la inoculación, CDDP y/o GC-CD o CD-GGC se ajustó con solución salina fisiológica (solución salina normal de Otsuka) a una concentración de interés, y se administraron CDDP, GC-CD (o GGC-CD), o CDDP + GC-CD (o GGC-CD) (200 μ l) a los ratones a través de la vena de la cola, seguido de cría. El día 14, los ratones se diseccionaron y se contaron los nodos tumorales en los pulmones. Al grupo de control, no se le administró ninguna sustancia (n = 10; 10 ratones/grupo).

La Fig. 9 muestra los resultados.

Como se ha descrito anteriormente, mediante el empleo combinado del derivado colestanol de la presente invención o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo y un agente anticanceroso, las proliferación de diversas células cancerosas resulta fuertemente inhibida, y se puede conseguir el efecto sinérgico y/o el efecto de potenciación de la acción antitumoral de un agente anticanceroso conocido.

REIVINDICACIONES

1. Un agente quimioterapéutico contra el cáncer que comprende, combinado, un derivado de colestanol representado por la fórmula (1):



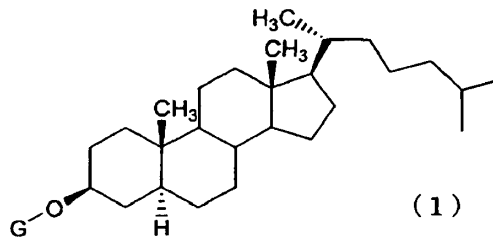
5 (en donde G representa GlcNAc- o GlcNAc-Gal-) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo, e irinotecán como agente anticanceroso.

10 2. Un agente quimioterapéutico contra el cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, que es un agente de composición.

15 3. Un agente quimioterapéutico contra el cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, que está en forma de un kit que incluye un fármaco que contiene un derivado de colestanol y un fármaco que contiene un agente anticanceroso.

4. Un agente quimioterapéutico contra el cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el fármaco que contiene un derivado de colestanol es una formulación liposomal.

20 5. El uso combinado de un derivado colestanol representado por la fórmula (1):



25 (en donde G representa GlcNAc- o GlcNAc-Gal-) o un compuesto de inclusión de ciclodextrina del mismo e irinotecán como agente anticanceroso, para la producción de un agente quimioterapéutico contra cáncer.

Fig. 1-A

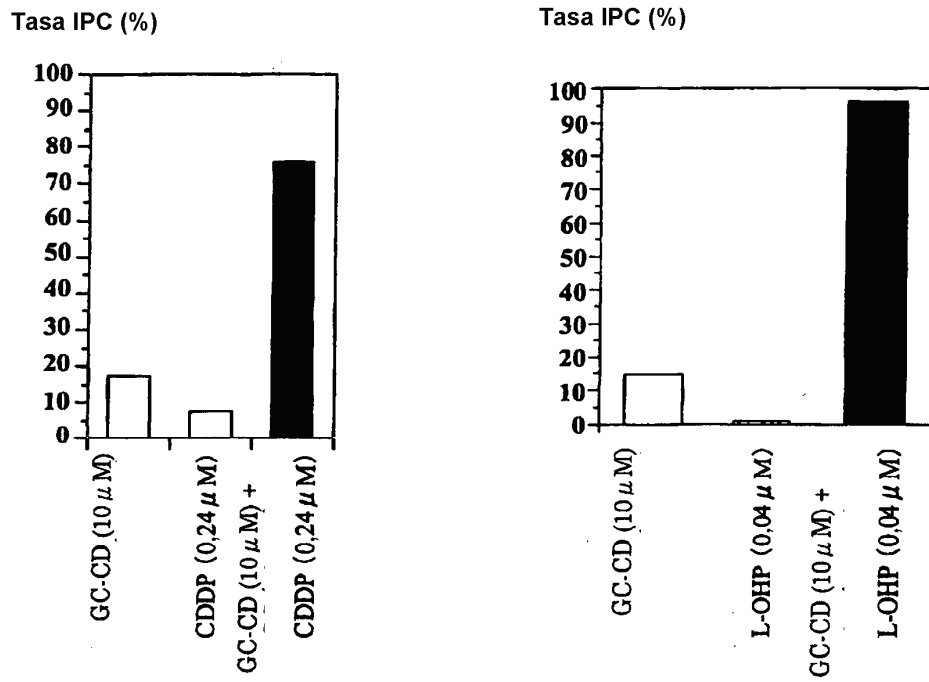


Fig. 1-B

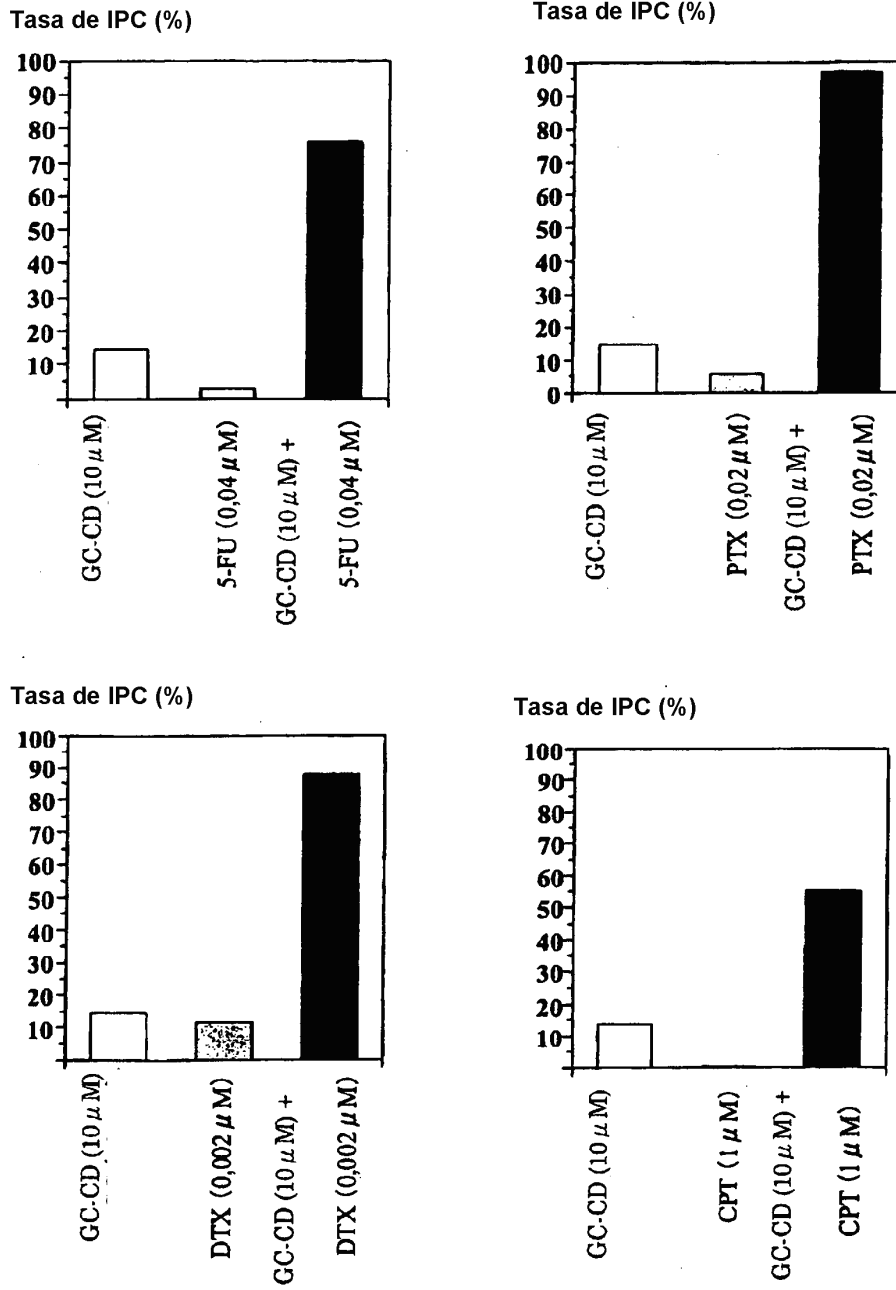


Fig. 1-C

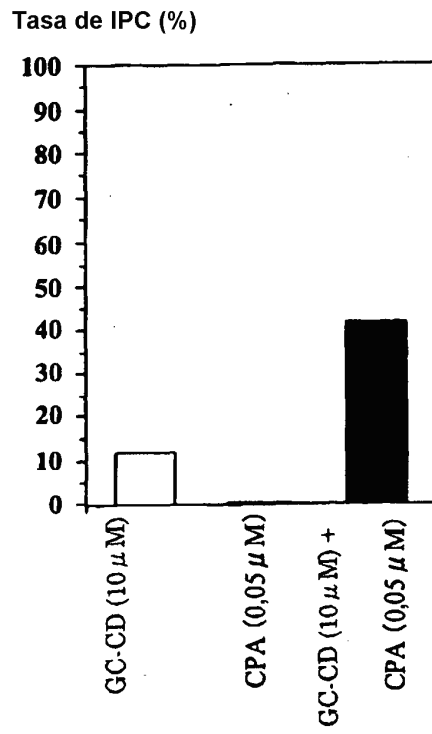


Fig. 2

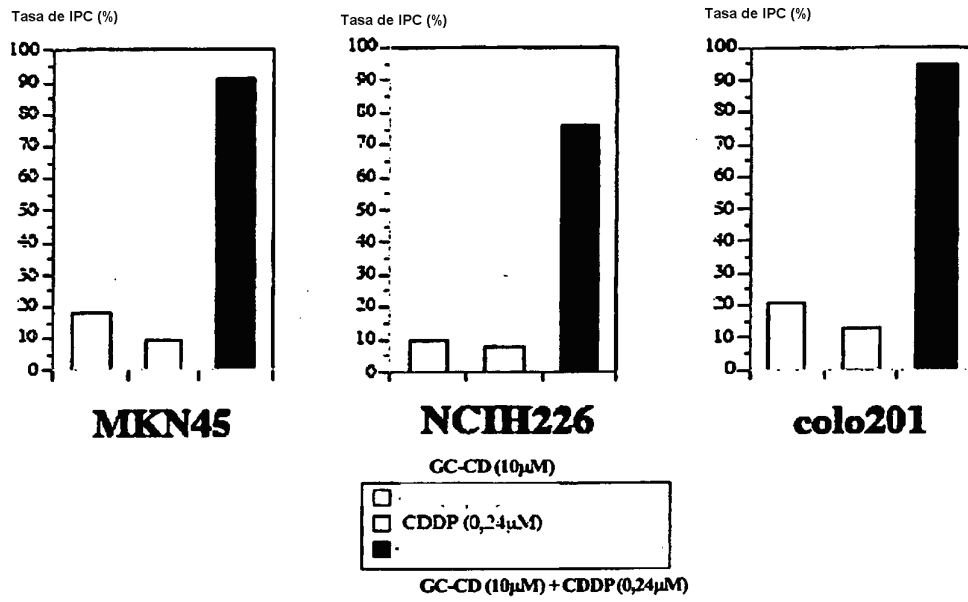


Fig. 3

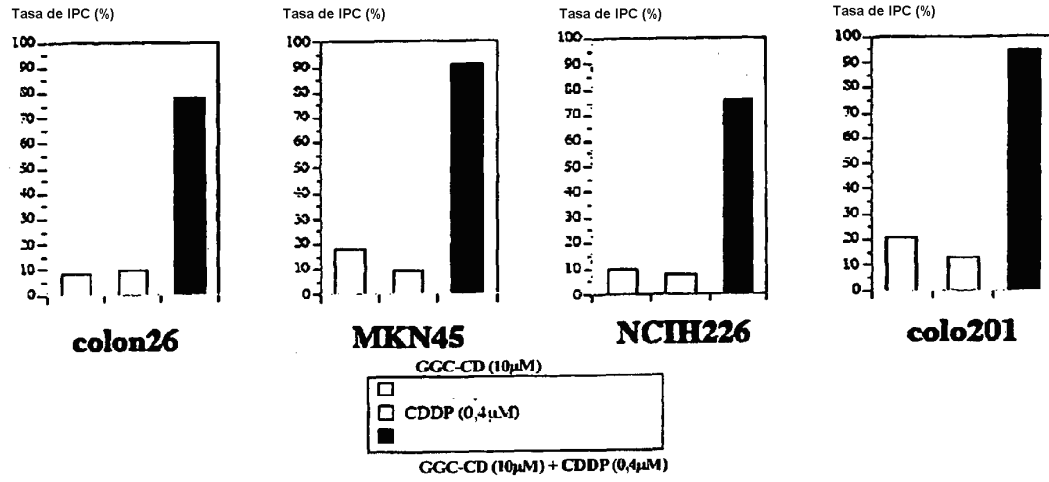


Fig. 4

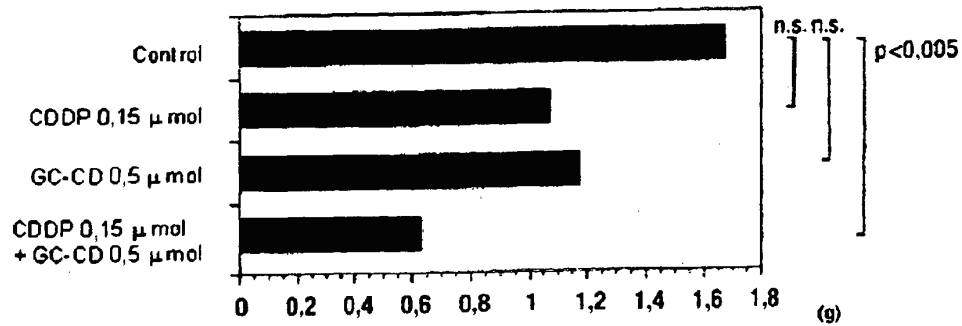


Fig. 5

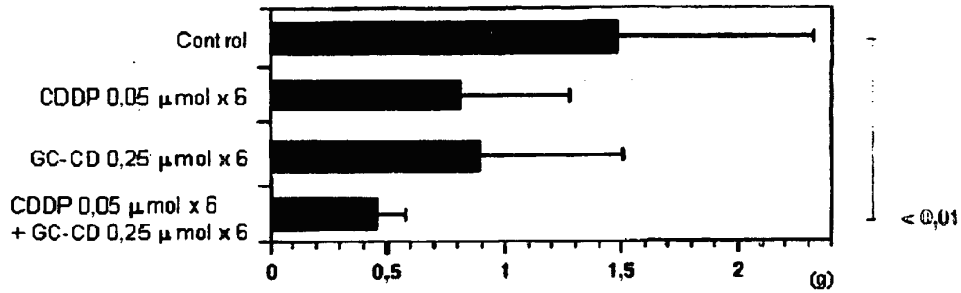


Fig. 6

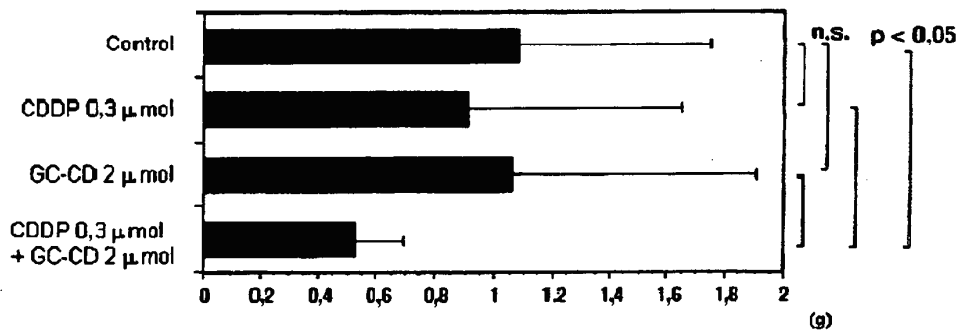


Fig. 7

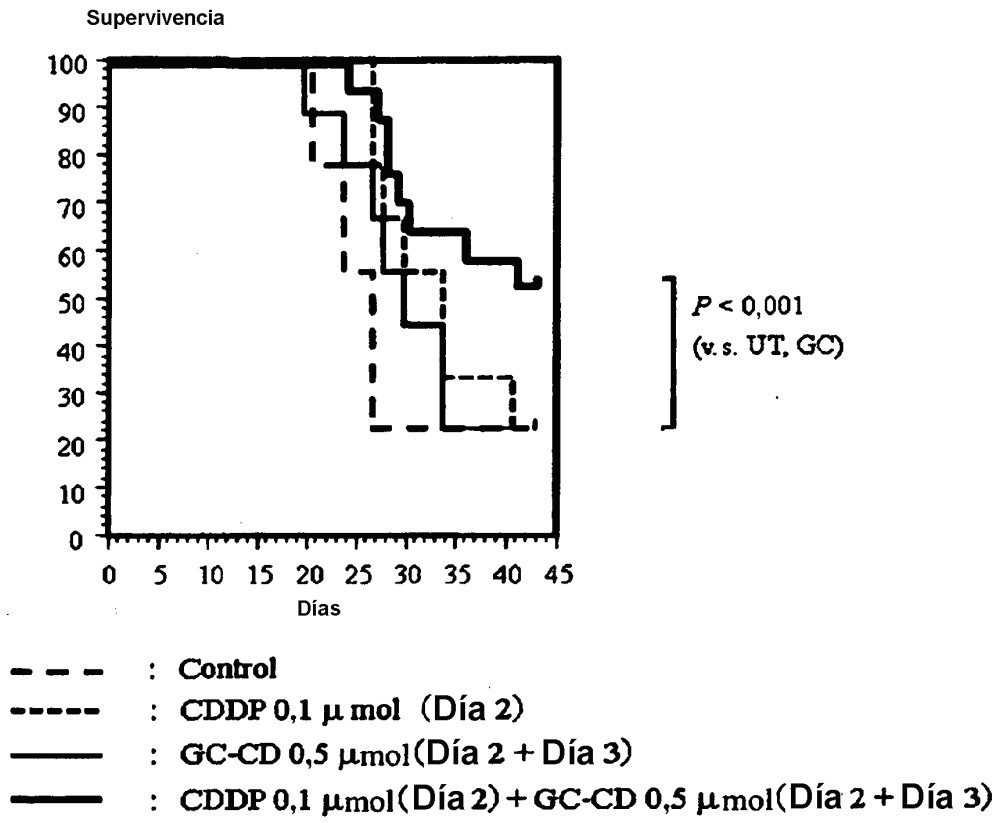


Fig. 8

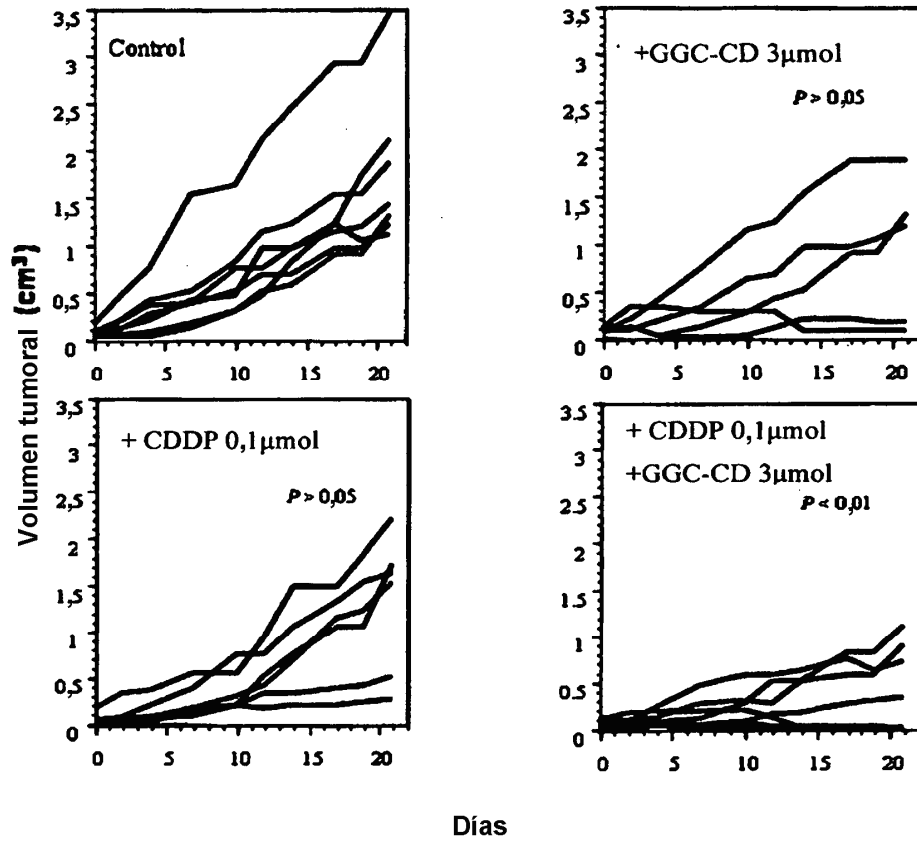


Fig. 9

