

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 145**

51 Int. Cl.:

**A61P 3/10** (2006.01)

**A61P 27/06** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

**A61P 27/12** (2006.01)

**A61K 31/55** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2003 E 03765931 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 1539179**

54 Título: **Inhibición de la angiogénesis mediante alcaloides de cefalotoxina, derivados, composiciones y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**22.07.2002 US 397657 P**

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

**30.05.2016**

73 Titular/es:

**TEVA PHARMACEUTICALS INTERNATIONAL  
GMBH (100.0%)  
Schlüsselstrasse 12  
8645 Jona, CH**

72 Inventor/es:

**BROWN, DENNIS M.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 572 145 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

Inhibición de la angiogénesis mediante alcaloides de cefalotoxina, derivados, composiciones y usos de los mismos

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Número de Serie de los Estados Unidos 60/397.657, presentada el 22 de julio de 2002.

Campo técnico

10 La invención se refiere al uso de una cefalotoxina de acuerdo con la fórmula de la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para la inhibición de la angiogénesis en un hospedador con una enfermedad angiogénica seleccionada de retinopatía diabética, degeneración macular, glaucoma neovascular y/o neovascularización de injertos de córnea o para el tratamiento profiláctico de un hospedador para inhibir la aparición o progresión de una enfermedad angiogénica.

15 Antecedentes de la invención

La angiogénesis se define como la formación y la diferenciación de nuevos vasos sanguíneos. Se ha relacionado con una serie de enfermedades y trastornos, en particular con el cáncer, la inflamación y ciertos trastornos de la retina. Las enfermedades angiogénicas incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos, retinopatía diabética, enfermedades inflamatorias (tales como artritis reumatoide, artrosis, asma y fibrosis pulmonar), la degeneración macular, angiofibroma, glaucoma neovascular, malformaciones arteriovenosas, fracturas sin unión, lupus y otros trastornos del tejido conjuntivo, síndrome de Osler-Weber, placas ateroscleróticas, psoriasis, neovascularización de injertos de córnea, granuloma piógeno, fibroplasia retrolental, escleroderma, granulaciones, hemangioma, tracoma, articulaciones hemofílicas y adherencias vasculares.

Los inhibidores de la angiogénesis recientemente se han convertido en agentes de alto perfil en la lucha contra el cáncer, donde varios compuestos, sobre todo angiostatina, endostatina, combretastatina, SU5416, TNP470, compuestos anti-VEGF y otros, n avanzado a la fase de ensayos clínicos como agentes anticancerígenos.

La angiogénesis, el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos, es esencial para actividades corporales normales, incluyendo la reproducción, el desarrollo y la reparación de heridas. Aunque el proceso no está completamente elucidado, se cree que implica una compleja interacción de moléculas que regulan el crecimiento de células endoteliales (las células primarias de los vasos sanguíneos capilares). En condiciones normales, estas moléculas parecen mantener la microvasculatura en un estado quiescente (es decir, un estado de no crecimiento capilar) durante periodos prolongados que pueden durar hasta semanas o, en algunos casos, décadas. Cuando es necesario (tal como durante la reparación de heridas), estas mismas células pueden sufrir una rápida proliferación y recambio en un período de 5 días (Folkman, J. and Shing, Y.; J. Biol. Chem., 267(16), 10931-10934 y Folkman, J. and Klagsbrun, M. Science, 235, 442-447 (1987).

Aunque la angiogénesis es un proceso altamente regulado en condiciones normales, muchas enfermedades (caracterizadas como enfermedades angiogénicas) están determinadas por una angiogénesis no regulada persistente. O dicho de otro modo, la angiogénesis no regulada puede causar una enfermedad en particular, ya sea directamente o exacerbando un trastorno patológico existente. Por ejemplo, la neovascularización ocular se ha reconocido como la causa más común de ceguera y domina aproximadamente 20 enfermedades oculares. En ciertos trastornos existentes, tales como la artritis, los vasos sanguíneos capilares recién formados invaden las articulaciones y destruyen el cartílago. En la diabetes, los nuevos capilares formados en la retina invaden el humor vítreo, sangran, y causan ceguera. El crecimiento y la metástasis de tumores sólidos también son dependientes de la angiogénesis (Folkman, J., (1986) Cancer Research, 46, 467-473, Folkman, J., (1989) J. National Cancer Institute, 82, 4-6, los cuales se incorporan expresamente por referencia). Se ha demostrado, por ejemplo, que los tumores que aumentan más de 2 mm deben obtener su propio suministro de sangre y lo hacen induciendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos capilares. Una vez que estos vasos sanguíneos se han incrustado en el tumor, proporcionan un medio para que el tumor metastatice a diferentes sitios, como el hígado, el pulmón o el hueso (Weidner, N. et al., (1991) The New England Journal of Medicine, 324(1), 1-8).

Hasta la fecha, se han descrito y caracterizado varios factores angiogénicos de origen natural (Fidler, J., I. and Ellis, L. M., (1994) Cell, 79, 185-189). Recientemente, O'Reilly, et al. han aislado y purificado una proteína de 38 kilodalton (kDa) de suero y orina de ratones portadores de tumores que inhibe la proliferación de células endoteliales (O'Reilly, M et al., (1994) Cell, 79, 315-328 y la solicitud internacional WO 95/29242, publicada el 2 de noviembre de 1995). El análisis de la microsecuencia de este inhibidor endotelial mostró un 98 % de homología de secuencia con un fragmento interno de plasminógeno murino. La angiostatina, como se denominó al fragmento inhibidor murino, era un péptido que incluía las cuatro primeras regiones kringle del plasminógeno murino. Un fragmento peptídico de la misma región de plasminógeno humano (es decir, que contiene los dominios kringles 1-4) también inhibió fuertemente la proliferación de las células endoteliales capilares in vitro e in vivo. El plasminógeno intacto del que se derivó este fragmento de péptido no poseía un efecto inhibidor tan potente. Varios inhibidores de la angiogénesis están actualmente en fase desarrollo para su uso en el tratamiento de enfermedades angiogénicas (Gasparini, G.

and Harris, A. L., (1995) J. Clin. Oncol, 13(3):765-782), aunque existen desventajas asociadas con estos compuestos. La suramina, por ejemplo, es un potente inhibidor de la angiogénesis pero causa toxicidad sistémica grave en las dosis requeridas para la actividad antitumoral. Los compuestos tales como retinoides, interferones y antiestrógenos son seguros para el uso humano pero tienen efectos antiangiogénicos débiles.

5 Por lo tanto, hay una necesidad de compuestos útiles en el tratamiento de enfermedades angiogénicas en mamíferos. Además, hay una necesidad de compuestos útiles en el tratamiento profiláctico de un hospedador para prevenir o inhibir la aparición, progresión o recurrencia de la enfermedad angiogénica.

10 Aunque se han identificado varios inhibidores antiangiogénicos, todavía se siguen buscando mejoras en el uso clínico. La invención descrita en la presente memoria demuestra el nuevo uso de los alcaloides de cefalotaxina y derivados incluyendo la homoharringtonina que puede inhibir la angiogénesis y por lo tanto afectar a enfermedades angiogénicas

#### 15 Sumario de la invención

De acuerdo con los objetos expuestos anteriormente, la presente invención proporciona el uso de una cefalotaxina de acuerdo con la fórmula de la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para la inhibición de la angiogénesis en un hospedador con una enfermedad angiogénica seleccionado de retinopatía diabética, degeneración macular, glaucoma neovascular y/o neovascularización de injertos de córnea.

20 En una realización preferida de la invención, la cefalotaxina utilizada es homoharringtonina (cefalotaxina, 4-metil-2-hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentil) butanodioato éster). En una realización preferida adicional, la cefalotaxina comprende un análogo de homoharringtonina.

25 En una realización preferida de la invención, la cefalotaxina se administra al hospedador por vía oral. En otras realizaciones preferidas de la invención, la cefalotaxina se administra al hospedador por vía intravenosa, por vía tópica, intravesicular, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, subcutánea o intraarterial.

30 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una cefalotaxina acuerdo con la reivindicación 4 para la preparación de un medicamento profiláctico para inhibir la aparición o progresión de una enfermedad angiogénica en un hospedador, en el que la enfermedad angiogénica se selecciona de retinopatía diabética, degeneración macular, glaucoma neovascular y neovascularización de injertos de córnea.

35 En una realización preferida de la invención, la cefalotaxina utilizada es homoharringtonina (cefalotaxina, 4-metil-2-hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentil) butanodioato éster). En una realización preferida adicional, la cefalotaxina comprende un análogo de homoharringtonina.

#### 40 Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 representa la estructura química general de la familia de la cefalotaxina.
- La Figura 2 representa la estructura química de la homoharringtonina.
- La Figura 3 muestra una representación esquemática de los vasos de la membrana corioalantoidea (MCA).
- La Figura 4 representa los efectos de homoharringtonina en la MCA.
- 45 La Figura 5 representa la comparación entre los cambios cualitativos causados por homoharringtonina y taxol.

#### Descripción detallada

50 Se proporcionan usos de una cefalotaxina de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un medicamento para (1) el tratamiento de un hospedador con una enfermedad angiogénica y (2) el tratamiento profiláctico de un hospedador para prevenir la aparición o la progresión de una enfermedad angiogénica. En una realización preferida, la cefalotaxina proporciona un efecto antiangiogénico.

55 Un compuesto o agente químico es un inhibidor angiogénico cuando inhibe la formación de vasos sanguíneos.

Las cefalotaxinas son alcaloides extraídos de pieles, tallos, hojas y semillas de *Cephalotaxus fortunei* Hook y otras especies relacionadas, tales como *Cephalotaxus sinensis* Li, *C. hainanensis* y *C. wilsoniana*, incluyendo *C. oliveri* mast y *C. harringtonia* (Powell, R.G., (1972) J. Pharm Sci., 61(8):1227-1230).

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término cefalotaxina incluye todos los miembros de esa familia química incluyendo alcaloides derivados del aglaonema, *Cephalotaxus fortunei* y análogos de los mismos. La familia de la cefalotaxina se define por la estructura química tal como se expone en la Figura 1.

65 Un análogo de cefalotaxina se define por la estructura representada en la Figura 1, que tiene sustituyentes o grupos sustituyentes en R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>. Los ejemplos de R<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup> incluyen ésteres, incluyendo herringtonina, isoharringtonina, homoharringtonina, desoxiharringtonina, acetilcefalotaxina y similares. La Tabla 1 enumera las estructuras de R<sup>1</sup> y

R<sup>2</sup> para algunos de estos análogos. Las sustituciones R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se emplean generalmente para mejorar la actividad biológica, los atributos farmacéuticos tales como biodisponibilidad o estabilidad, o para disminuir la toxicidad. En una realización, R<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup> incluyen sustituciones alquilo (por ejemplo., metilo, etilo, propilo, etc.). En otra realización, R<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup> incluyen ésteres (por ejemplo, metoxi, etoxi, butoxi, etc.). Sin embargo, en el ámbito de esta invención, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> no se limitan a los ejemplos anteriores.

Tabla 1

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
isoharringtonina	-OCH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{C} - \text{CHCO}_2\text{CH}_3 \\   \\ \text{CO}_2^- \end{array}$
harringtonina	-OCH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C} - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CO}_2^- \end{array}$
acetilcefalotaxina	-OCH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{C} - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CO}_2^- \end{array}$
homoharringtonina	-OCH <sub>3</sub>	

10 Un análogo de cefalotaxina es otro refinamiento químico adicional. Un ejemplo específico de cefalotaxina es la homoharringtonina que es el 4-metil-2-hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentil) butanodioato éster de cefalotaxina (Figura 2).

15 Como se ilustra en los Ejemplos, las cefalotaxinas son inhibidores angiogénicos. Es un aspecto de la invención proporcionar composiciones que comprenden una cefalotaxina para su uso en el tratamiento de un hospedador con una enfermedad angiogénica. Es un aspecto adicional de la invención proporcionar composiciones que comprenden una cefalotaxina para su uso en tratamientos profilácticos para prevenir la aparición o la progresión de una enfermedad angiogénica.

20 Las enfermedades angiogénicas se seleccionan de retinopatía diabética, degeneración macular, glaucoma neovascular y/o neovascularización de injertos de córnea.

25 En una realización de la invención, una cefalotaxina se administra a un hospedador con una enfermedad angiogénica. La cefalotaxina se administra en una cantidad suficiente para inhibir la angiogénesis inhibiendo de ese modo la progresión de la angiogénesis y la enfermedad angiogénica.

30 Otra enfermedad que se caracteriza por un crecimiento excesivo de los vasos sanguíneos es la retinopatía diabética. Estudios recientes indican un papel patogénico para el sistema renina-angiotensina (SRA) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el ojo en respuesta a la hiperglucemia crónica (Wilkinson-Berka J. L., et al., (2001) The Interaction Between the Renin-Angiotensin System and Vascular Endothelial Growth Factor in the Pathogenesis of Retinal Neovascularization in Diabetes, J Vasc Res., 38(6):527-35).

35 En una realización de la invención, una cefalotaxina se administra a un hospedador con diabetes que sufre de, o que tiene riesgo de padecer, retinopatía diabética. La cefalotaxina se administra en una cantidad suficiente para inhibir la angiogénesis y de este modo frenar la progresión de la retinopatía diabética.

40 En una realización adicional de la invención, una cefalotaxina se administra a un hospedador como un tratamiento profiláctico. Por "tratamiento profiláctico" se entiende la administración de una cefalotaxina a un hospedador para prevenir la aparición o la progresión de una enfermedad angiogénica.

En una realización preferida adicional, una cefalotaxina se administra a un hospedador para prevenir la aparición o progresión de un trastorno angiogénico seleccionado de retinopatía diabética, degeneración macular, glaucoma neovascular y/o neovascularización de injertos de córnea.

5 En una realización preferida adicional, una cefalotaxina se administra a un hospedador que es diabético, o en riesgo de desarrollar diabetes, como un tratamiento profiláctico para prevenir o inhibir la aparición de la retinopatía diabética. En otra realización preferida adicional, la cefalotaxina se administra a un hospedador que está en riesgo de exhibir degeneración macular (tal como un ser humano de edad avanzada) como un tratamiento profiláctico para prevenir o inhibir la aparición de la degeneración macular.

Para los tratamientos profilácticos anteriores, la cefalotaxina se administra en cantidad suficiente para inhibir la aparición o progresión de la enfermedad angiogénica.

10 Los compuestos de la invención descritos anteriormente se pueden proporcionar como formulaciones farmacéuticamente aceptables utilizando métodos de formulación conocidos por aquellos con experiencia ordinaria en la técnica. Estas formulaciones pueden administrarse por rutas estándar. En general, los compuestos se pueden administrar por vía oral, intravenosa, tópica, intravesicular, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, subcutánea o intraarterial. Además, las combinaciones pueden incorporarse en polímeros biodegradables que permitan la liberación sostenida del compuesto, implantándose los polímeros en la vecindad de donde se desea la administración de fármacos. Los polímeros biodegradables y su uso se describen, por ejemplo, en detalle en Brem et al., J. Neurosurg.74: 441-446 (1991).

20 La administración del compuesto dependerá del trastorno a tratar, el compuesto particular y otros factores clínicos tales como el peso y el estado del ser humano o animal y la vía de administración del compuesto. Se ha de entender que la presente invención tiene aplicación tanto para uso humano como veterinario.

25 En una realización de la invención, la cefalotaxina se administra a un hospedador en el intervalo de 0,05-5,0 mg/m<sup>2</sup>. En una realización preferida, la cefalotaxina se administra a un hospedador en el intervalo de 0,1 a 3,0 mg/m<sup>2</sup>. En una realización preferida adicional, la cefalotaxina se administra a un hospedador en el intervalo de 0,1 a 1,0 mg/m<sup>2</sup>.

30 La cefalotaxina puede administrarse cada dos semanas, semanalmente, diariamente, dos veces al día, o más frecuentemente según sea necesario para inhibir la angiogénesis o para inhibir la aparición o progresión de una enfermedad angiogénica.

35 Las formulaciones incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratraqueal y epidural). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante técnicas farmacéuticas convencionales. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo y el o los vehículos farmacéuticos o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

40 Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite-en-agua o una emulsión de agua-en-aceite y como un bolo, etc.

45 Un comprimido puede fabricarse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar comprimiendo, en una máquina adecuada, el principio activo en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse por moldeo, en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y pueden formularse de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo en el mismo durante minutos a horas a días.

50 Las formulaciones adecuadas para administración tópica a través de la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden los componentes en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga y enjuagues bucales que comprenden el principio activo a administrar en un vehículo líquido adecuado.

55 Las formulaciones adecuadas para administración tópica a la piel pueden presentarse como pomadas, cremas, geles y pastas que comprenden el principio activo a administrar en un vehículo farmacéutico aceptable. Un sistema de administración tópica preferido es un parche transdérmico que contiene el principio activo a administrar.

60 Las formulaciones para la administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

65

Las formulaciones adecuadas para administración nasal, en las que el vehículo es un sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partículas, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 500 micras que se administra de la manera en que se administra el tabaco molido, es decir, por inhalación rápida a través del paso nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas, en las que el vehículo es un líquido, para administración, como por ejemplo, un spray nasal o gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del principio activo.

Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen además del principio activo, vehículos tales como los conocidos en la técnica como apropiados.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en condiciones de secado por congelación (liofilizadas) que requieren sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente.

Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son las que contienen una dosis o unidad diaria, subdosis diaria, como se ha indicado anteriormente, o una fracción apropiada de la misma, del principio activo administrado.

Se debe entender que además de los componentes, particularmente los mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Adicionalmente, la composición de cefalotaxina de la invención se puede administrar con otros compuestos activos. Ejemplos de compuestos activos que pueden ser co-administrados con la composición de cefalotaxina incluyen, pero no se limitan a, otros agentes antiangiogénicos tales como angiostatinas, inhibidores del VEGF, endostatinas, combretastatinas, 2-metoxi-estradiol, talidomida y Avastatin™, taxanos, antimetabolitos, tales como metotrexato, corticosteroides, colchicina y análogos, anticuerpos contra dianas angiogénicas, interferón, agentes reguladores de la diabetes, tales como insulina e inhibidores del factor de crecimiento de insulina, agentes antiinflamatorios tales como inhibidores de la COX-2, anti-artríticos, aspirina, ibuprofeno, naproxeno y similares, terapia génica, terapia antisentido y terapia con ARN de interferencia contra genes diana y ARNm asociado y dianas de proteínas de la angiogénesis, terapia antisentido y terapia con ARN de interferencia.

El principio activo puede administrarse al hospedador antes, durante o después de la administración de la composición de cefalotaxina. En una realización de la invención, el principio activo se mezcla con la cefalotaxina antes de la administración y la mezcla se administra al hospedador. En una realización adicional, el principio activo y la cefalotaxina se administran por separado pero simultáneamente al hospedador. En otra realización adicional, el principio activo se administra antes de la cefalotaxina. En una realización preferida, el principio activo se administra antes de la cefalotaxina con el principio activo todavía presente sistémicamente en el hospedador. En otra realización adicional, el principio activo se administra después de la cefalotaxina. En una realización preferida, el principio activo se administra después de la cefalotaxina mientras que la cefalotaxina todavía está presente sistémicamente en el hospedador.

Hospedadores adecuados de la invención incluyen los seres humanos u otros animales.

Los siguientes ejemplos sirven para describir más detalladamente la manera de utilizar la invención anteriormente descrita, así como para exponer los mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos se presentan con fines ilustrativos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Efectos de la homoharringtonina en el ensayo de la MCA

#### PROTOCOLO:

Se incubaron huevos de gallina fertilizados (HiChick Breeding Co, Kapunda, Australia del Sur) durante tres días a 38 °C. En el día 3 los embriones se extrajeron del huevo y se pusieron en una taza hecha de tubos de plástico, con una película plástica estirada sobre la parte superior para formar una hamaca para que el huevo quedase suspendido. Se añadieron dos ml de DMEM que contenía penicilina y estreptomina a cada taza antes de ser

añadido el huevo. Una placa de Petri en la parte superior mantenía la esterilidad. La incubación continuó en una incubadora humidificada a 37 °C.

5 En el Día 4 la membrana corioalantoidea (MCA) comienza a crecer y se tomaron imágenes de cada embrión a x 5 para medir el área de la MCA usando el software de análisis de imágenes (Video Pro 32, Leading Edge Pty Ltd, Australia del Sur). Los embriones fueron agrupados de acuerdo con su área de MCA, con un embrión de control en cada uno como comparación. Había cuatro embriones emparejados, tratados con 6,25, 12,5 y 25 ng de homoharringtonina. La agrupación es crítica, ya que en estas etapas tempranas de desarrollo, los cambios en la MCA son dramáticos. Diferencias relativamente pequeñas de tamaño en el día 4 se traducen en grandes diferencias en la MCA el día 5, por lo que es imposible comparar los tratamientos. Las sustancias se aplicaron en discos de metilcelulosa, los cuales se secaron primero en vacío durante la noche. Los discos de metilcelulosa se aplicaron a la parte superior de la MCA y al comienzo de tratamiento eran por lo menos tres a cuatro veces más grandes que el área de la MCA, lo que significa que el tratamiento cubría toda la superficie de la MCA.

15 En el día 5 se inyectó en la MCA leche descremada con medio de contraste. A continuación se tomaron fotografías en varios niveles de aumento hasta 63 x. Las mediciones cuantitativas se hicieron a partir de x 5 fotos. El área de la MCA y las longitudes de la vena y la arteria se midieron mediante análisis de imágenes (Video Pro 32, Leading Edge Pty Ltd, Australia del Sur). Las longitudes relativas de los vasos se calcularon a continuación como la longitud total/MCA. El análisis estadístico se realizó utilizando SigmaStat y ANOVA unidireccional con p <0,05 como nivel de significación.

25 La organización normal de la MCA es uniforme, con la vena principal de drenaje hacia la izquierda y las ramas de la arteria pasando sobre el borde de la parte superior e inferior de la MCA. La Figura 3 ilustra esquemáticamente el trazado de las ramas de la vena y de la arteria, tal como se realizó para la medición de las longitudes de los vasos.

30 El inhibidor angiogénico, homoharringtonina, se obtuvo de ChemGenex Therapeutics, Inc. (Menlo Park, CA) y se preparó a la concentración apropiada en agua estéril. A las dosis iniciales de homoharringtonina utilizadas se produjo la muerte de los embriones, por lo tanto, se redujo la dosis. La homoharringtonina se administró a dosis de 6,25, 12,5 y 25 ng (11,3, 22,5 y 45 nM) y se compararon con los controles tratados con agua. Los resultados se muestran en la Tabla 2. La homoharringtonina redujo el crecimiento de la MCA hasta un 42 % respecto al control en la MCA tratada con 25 ng. Las longitudes de la vena, la arteria y vascular total también se redujeron significativamente en el grupo de 25 ng, no observándose una reducción significativa de las longitudes de los vasos en los grupos tratados con 6,25 y 12,5 ng. Las longitudes de la vena, la arteria y vascular total se redujeron hasta el 15 %, 18 % y 17 % del control, respectivamente. No es sorprendente que también se redujeran las longitudes relativas vasculares, reduciéndose significativamente las longitudes relativas de la arteria en los tres niveles de dosis de la homoharringtonina, siendo las longitudes relativas de la vena y vascular total significativamente diferentes solo con la dosis más alta de homoharringtonina.

TABLA 2

40

Homoharringtonina (6,25,12,5 y 25 ng frente a control con DMSO; media +/- EEM)				
	Agua n = 6	6,25 ng n = 6	12,5 ng n = 6	25 ng n = 6
<b>Área de la MCA (píxeles)</b>				
Día 4	6,1±1,4	6,5±1,6	6,3±1,6	6,2±1,5
Día 5	65,3±18,3	45,3±11,6	53,0±11,6	30,2±9,9
Aumento de la MCA (veces)	10,2±0,8	7,0±0,4 <sup>a</sup>	9,0±1,0 <sup>b</sup>	4,3±0,7 <sup>a</sup>
<b>Longitudes vasculares (píxeles)</b>				
Longitud de la vena	2382±717	1482±499	1564±427	359±143 <sup>a</sup>
Longitud de la arteria	3009±884	1573±516	1787±544	551±265 <sup>a</sup>
Longitud vascular total	5391±1596	3055±1003	3351±953	909±396 <sup>a</sup>
<b>Longitudes relativas vasculares (longitud/área MCA)</b>				
Longitud relativa de la vena	36,2±4,9	31,6±4,6 <sup>b</sup>	28,3±4,4 <sup>b</sup>	11,3±3,5 <sup>a</sup>
Longitud relativa de la arteria	45,1±1,6	31,6±4,5 <sup>ab</sup>	31,8±3,7 <sup>ab</sup>	13,0±4,3 <sup>a</sup>
Longitud relativa vascular total	81,4±6,1	63,2±7,7 <sup>b</sup>	60,1±7,5 <sup>b</sup>	24,3±6,7 <sup>a</sup>

a: p <0,05 frente al control; b: p <0,05 frente a 25 ng

El tratamiento con homoharringtonina de las MCA tuvo como resultado una reducción significativa de los vasos sanguíneos, como se ilustra en la Figura 4.

5 Como se ve en la Figura 4, incluso a la dosis más baja de homoharringtonina, la MCA es menor y la organización vascular normal está alterada. Hay que señalar la superposición de una vena principal y la rama de la arteria en la parte inferior de la MCA. La MCA con 12,5 ng tiene una reducción general de vasos sin gran cantidad de alteración de la organización. La dosis más alta de 25 ng tuvo solo como resultado vestigios de vasos sanguíneos finos y el desarrollo de los vasos sanguíneos casi completamente bloqueado. La dosis de 25 ng destruyó a uno de los embriones más pequeños.

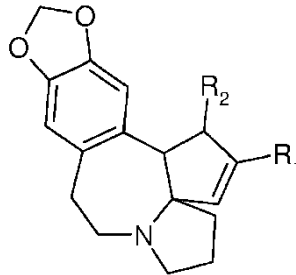
10 Los cambios observados debidos a la homoharringtonina a aumentos mayores eran únicos y distintos a los observados con otras sustancias ensayadas. En la Figura 5 se muestra una MCA normal y una MCA tratada con 25 ng de homoharringtonina. El control tratado con agua está bien vascularizado. El tratamiento con homoharringtonina ha dado como resultado una drástica reducción en el flujo sanguíneo, transportando eritrocitos tan solo unos pocos vasos finos del campo. La característica única son los puntos negros diseminados a través del campo de visión que representan los glóbulos rojos de la sangre que han sido atrapados en los vasos sanguíneos en los que el flujo ha cesado. Compárese esto con los cambios observados con taxol, con fuga difusa de los eritrocitos fuera de los vasos y sin flujo sanguíneo restante en los esqueletos de los vasos más grandes.

20 La actividad antiangiogénica de la homoharringtonina fue ensayada usando la membrana corioalantoidea de pollo (MCA) temprana. El uso de homoharringtonina dio lugar a reducciones significativas en el desarrollo de los vasos sanguíneos de la MCA, con diferencias tanto en la potencia como en los cambios cualitativos observados respecto al taxol. Estas diferencias pueden reflejar diferentes mecanismos de acción, como los que afectan a la proliferación de células endoteliales, la apoptosis y la migración debido a estas sustancias.



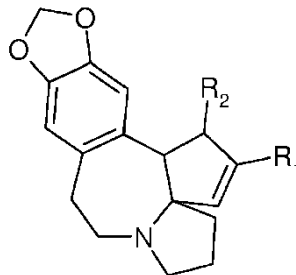
**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una cefalotaxina para la preparación de un medicamento para la inhibición de la angiogénesis en un  
 5 hospedador con una enfermedad angiogénica, en el que la cefalotaxina se emplea en una cantidad suficiente para  
 inhibir la angiogénesis, comprendiendo la cefalotaxina un compuesto de la fórmula



10 en la que R<sub>1</sub> se selecciona de metoxi, etoxi, butoxi y alquilo y R<sub>2</sub> es un éster o alquilo, y  
 en el que la enfermedad angiogénica se selecciona de retinopatía diabética, degeneración macular, glaucoma  
 neovascular y neovascularización de injertos de córnea.

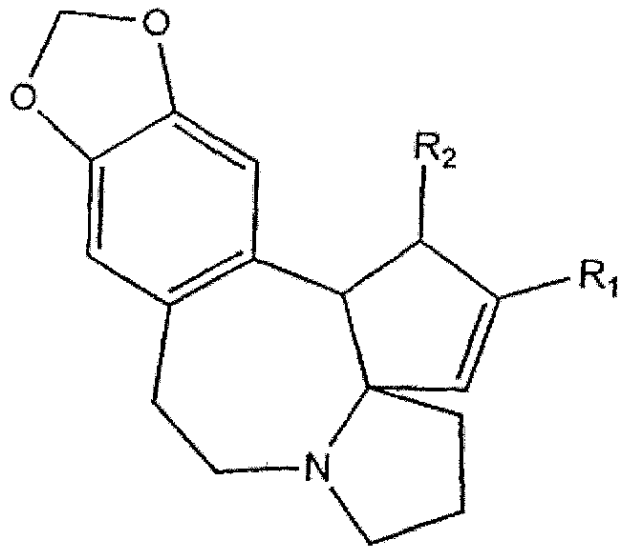
15 2. El uso de una cefalotaxina para la preparación de un medicamento profiláctico para inhibir la aparición o  
 progresión de una enfermedad angiogénica en un hospedador, en el que la enfermedad angiogénica se selecciona  
 de retinopatía diabética, degeneración macular, glaucoma neovascular y neovascularización de injertos de córnea y  
 la cefalotaxina comprende un compuesto de la fórmula



20 en la que R<sub>1</sub> se selecciona de metoxi, etoxi, butoxi y alquilo y R<sub>2</sub> es un éster o alquilo.

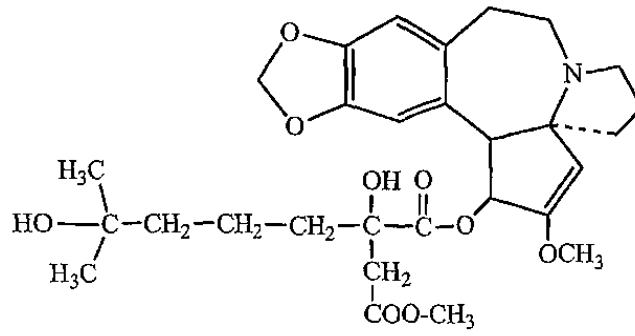
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la cefalotaxina comprende  
 homoharringtonina (cefalotaxina, 4-metil-2-hidroxi-2-(4-hidroxi-4-metilpentil) butanodioato éster).

25 4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cefalotaxina está en una formulación  
 adecuada para administración oral.



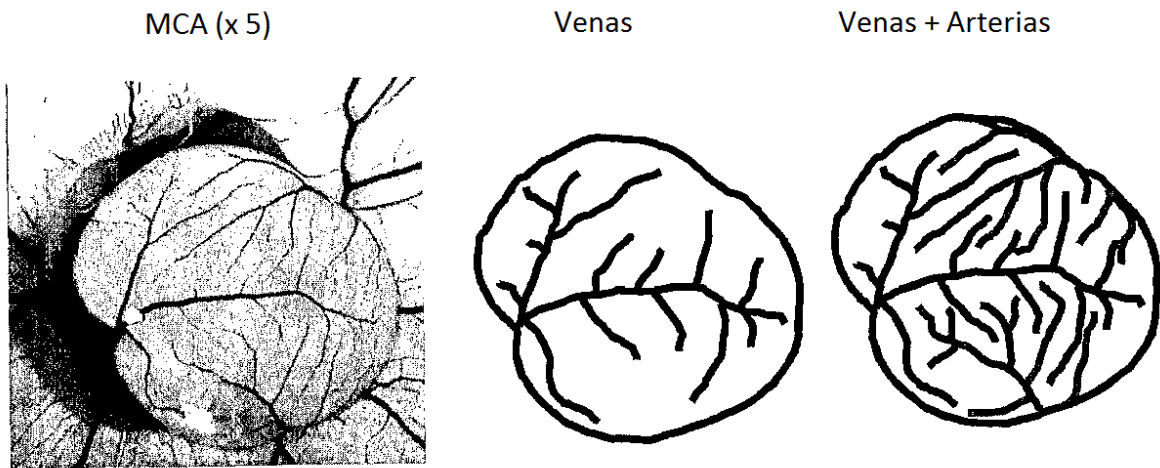
La estructura química general de la familia de la cefalotaxina

FIGURA 1



La estructura química de la homoharringtonina

FIGURA 2



Representación esquemática de los vasos de la MCA

**Figura 3**

(a) Día 4 (x5)

Control tratado con  
agua

6,25 ng

12,5 ng

25 ng



(b) Día 5 (x 5)



Control tratado con  
agua

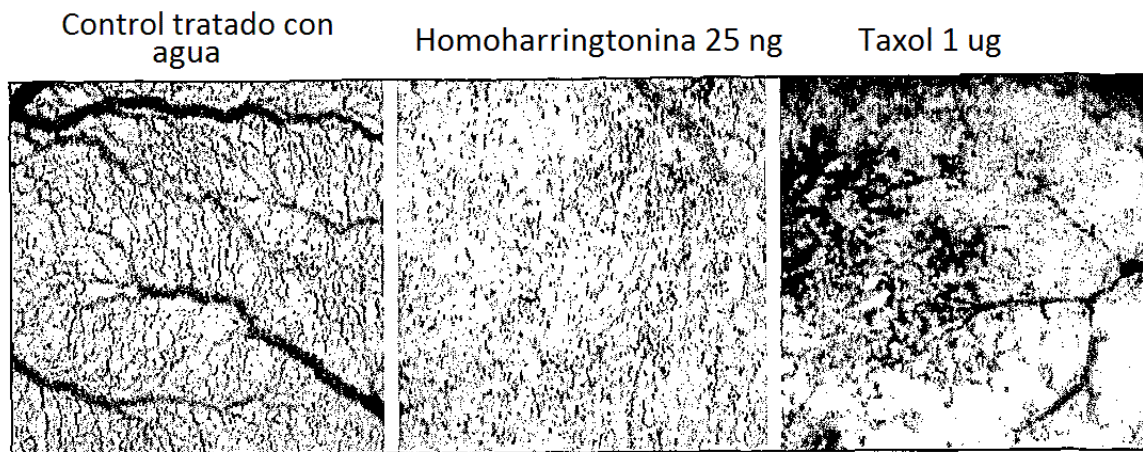
6,25 ng

12,5 ng

25 ng

Efectos de la homoharringtonina en la MCA

**Figura 4**



Comparación entre los cambios cualitativos causados por homoharringtonina y taxol (x 40; Día 5)

**Figura 5**