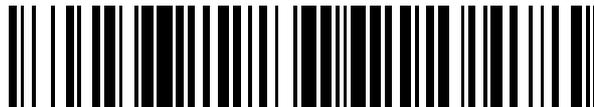


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 776**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2015 PCT/GB2015/054116**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16102952**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2015 E 15817516 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3236967**

54 Título: **Prevención y tratamiento de la enfermedad metastásica en pacientes con cáncer trombocitótico**

30 Prioridad:

22.12.2014 GB 201422978

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

21.05.2020

73 Titular/es:

**SUDA PHARMACEUTICALS LTD (100.0%)
Level 1, Unit 12, 55 Howe Street
Osborne Park, WA 6017, AU**

72 Inventor/es:

**DAMMENT, STEPHEN;
FRANKLIN, RICHARD y
ERUSALIMSKY, JORGE DANIEL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 761 776 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

Prevención y tratamiento de la enfermedad metastásica en pacientes con cáncer trombocitótico

5 Campo de la invención

10 La presente invención se refiere al uso del agente antimegacariocítico anagrelida o un metabolito terapéuticamente activo de este, en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad metastásica en pacientes con cáncer que presentan trombocitosis paraneoplásica. En particular la invención se refiere a la reducción de la formación y progresión de metástasis óseas, pulmonares y otras potencialmente mortales más evidentes en tales pacientes.

15 La presente invención también se refiere al uso del agente antimegacariocítico anagrelida o un metabolito terapéuticamente activo de este, para mejorar la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos convencionales contra el cáncer en pacientes con cáncer trombocitótico.

20 El fármaco puede formularse en una formulación moduladora de efectos secundarios (SEM)/preservadora del corazón adecuada, que minimiza las acciones inhibitorias de PDEIII y por lo tanto la actividad cardioestimulante del fármaco. Las formulaciones adecuadas incluyen aquellas que se establecieron previamente para reducir o evitar el metabolismo de primer paso y por lo tanto, en este caso, la generación del metabolito de anagrelida altamente potente cardioactivo inhibitorio de PDEIII. Dichas preparaciones tienen el potencial de inhibir la proliferación de células cancerosas mediada por plaquetas, el desarrollo de tumores y la formación de metástasis cancerosas sin la cardiotoxicidad no deseada que se asocia generalmente con la anagrelida.

25 Antecedentes de la invención

A pesar de los avances significativos en el tratamiento del cáncer en los últimos 25 años, las tasas de supervivencia en varios tipos de cáncer permanecen terriblemente bajas. Por ejemplo las tasas de supervivencia a cinco años para los cánceres de estómago, cerebro y esofágico son del orden del 15-20 %, mientras que para el cáncer de pulmón y de páncreas son inferiores al 10 % (Cancer Research UK data, 2010 <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/survival>). Incluso entre los cánceres más comunes, por ejemplo cáncer de intestino y vejiga, las tasas de supervivencia son de solo alrededor del 50 %.

35 En los últimos años se observa que varios tipos diversos de cáncer se asocian con una trombocitosis es decir una elevación de las plaquetas sanguíneas. Si bien Reiss y otros notaron por primera vez esta llamada trombocitosis paraneoplásica en 1872, solo recientemente se ha identificado que la trombocitosis es un factor de riesgo independiente para la progresión agresiva del cáncer, la enfermedad metastásica y una supervivencia más pobre. La trombocitosis paraneoplásica se observa en aproximadamente el 10-57 % de los pacientes con cáncer y el número varía según el tipo de célula cancerosa (Sierko y Wojtukiewicz 2004) y el estadio de la enfermedad. Por ejemplo, se informó que la proporción de pacientes con cáncer afectados por trombocitosis es del 33 % en cáncer de ovario (Hale, 2012), 18 % en cáncer de mama (Stravodimou y Voutsadakis, 2013), 21 % en cáncer esofágico (Voutsadakis, 2014), 21 % en cáncer de estómago (Wang y otros, 2012), 27 % en cáncer de pulmón (Maraz y otros, 2013) 14 % en carcinoma colorrectal (Guo y otros, 2014), 12,5 % en cáncer de riñón (O'Keefe y otros, 2002) y 3 % en cáncer de hígado (Hwang y otros, 2004). En estos y otros cánceres sólidos, los pacientes con trombocitosis paraneoplásica muestran una respuesta pobre al tratamiento estándar contra el cáncer y una supervivencia significativamente peor en comparación con los pacientes con un conteo normal de plaquetas. En particular este subgrupo de pacientes con frecuencia es susceptible a metástasis óseas que están asociadas con el peor pronóstico (Zhang y otros 2015). Esto sugiere que estos pacientes son desfavorecidos por los tratamientos disponibles actualmente.

50 La influencia del conteo de plaquetas en el pronóstico del cáncer es claramente evidente en, por ejemplo, pacientes con carcinoma gástrico donde se demostró que la tasa de supervivencia a cinco años es solo del 16 % en pacientes con conteos de plaquetas más altos (> 300.000/uL) en comparación con el 63 % en pacientes con números más bajos (< 300.000/uL) (Lv y otros, 2010). También en pacientes con cáncer de pulmón, la probabilidad de supervivencia global (OS) acumulada a 3 años fue menor (59,2 %) para pacientes con conteos elevados de plaquetas en comparación con pacientes con conteos de plaquetas normales (75,3 %) (Yu y otros, 2013). En pacientes con glioblastoma, los conteos de plaquetas más altos también se correlacionaron con pronósticos clínicos más pobres (Williams, 2012). De manera similar, en extensas investigaciones en cáncer de ovario murino y humano, Stone y otros (2012) concluyeron que la trombocitosis paraneoplásica estimula el crecimiento tumoral agresivo y la supervivencia más pobre. Estudios muy recientes demuestran un papel principal para las plaquetas en la estimulación del crecimiento de células de mieloma múltiple así como del crecimiento tumoral (Takagi y otros 2015). En ratones empobrecidos en plaquetas, fue evidente la disminución del crecimiento tumoral junto con una mejor supervivencia.

65 Si bien hay poca evidencia de que las plaquetas sean anormales en el cáncer, hay evidencia convincente de que las células cancerosas estimulan la sobreproducción y la activación inadecuada de las plaquetas lo que crea un microambiente favorable para el crecimiento tumoral y la metástasis. Más de 30 proteínas reguladoras del crecimiento, que incluye el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de plaquetas 4 (PF4) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) se almacenan dentro de los gránulos

citoplasmáticos de las plaquetas, mientras que los receptores de señalización se empaquetan en la membrana celular lo que normalmente guía la liberación del factor de crecimiento en sus funciones centrales de hemostasia, angiogénesis y cicatrización de tejidos. Las células cancerosas interactúan directa e indirectamente con las plaquetas de múltiples maneras para secuestrar este armamento de factores angiogénicos, linfangiogénicos y mitogénicos generales para aumentar la expansión tumoral y la diseminación metastásica (Davis y otros, 2014; Bambace & Holmes, 2011; Buery y otros, 2012; Labelle & Hynes, 2012; Riedl y otros, 2014).

Varias revisiones y conferencias científicas recientes resaltan las múltiples interacciones que ocurren entre las plaquetas y las células cancerosas (Bambace y Holmes (2011), Stravodimou y Voutsadakis (2013), Labelle y otros (2011), Riedl y otros (2014), 55th ASH meeting Dic 2013. Las células cancerosas parece que estimulan la trombocitosis con un mayor número de plaquetas activadas que actúan sobre las propias células cancerosas para ayudar al desarrollo y la propagación del cáncer.

Esta interacción de células cancerosas y plaquetas conduce a un "círculo vicioso" o ciclo patológico que involucra una relación simbiótica entre los dos. Las células cancerosas estimulan la producción de megacariocitos/plaquetas que a su vez, a través de la liberación de diversos factores de crecimiento, aumenta el crecimiento y la multiplicación de las células cancerosas y finalmente la metástasis. El aumento en el número de células cancerosas impulsa entonces más formación de plaquetas y así sucesivamente en un ciclo de retroalimentación patológica (Lin RJ y otros 2014).

En general se cree que la estimulación inicial de la megacariocitopoyesis se efectúa mediante la liberación de citocinas de las células cancerosas las cuales estimulan al hígado a producir trombopoyetina el impulsor del proceso de producción de plaquetas. El aumento resultante en el número de plaquetas (trombocitosis) y la consecuente mayor disponibilidad de factores de crecimiento de nutrientes derivados de plaquetas TGF β , PF4, VEGF y PDGF, estimulan el crecimiento y la multiplicación de las células cancerosas. Además, el VEGF promueve la angiogénesis y la formación de vasos sanguíneos de anclaje y por lo tanto el establecimiento del tumor primario.

A medida que crece el número de células cancerosas esto a su vez estimula una mayor megacariocitopoyesis y la formación de más plaquetas que son activadas por las células cancerosas. Estas plaquetas una vez activadas se adhieren a las células cancerosas circulantes que se desprendieron del tumor primario y proporcionan protección de las células asesinas naturales del sistema inmunitario. Esta protección permite que las células cancerosas circulantes lleguen a otros órganos diana como el hueso donde pueden desarrollarse tumores secundarios o metástasis.

Ahora hay evidencia sustancial para esta secuencia de eventos propuesta. Por ejemplo Cho y otros (2012) informaron que las plaquetas aumentan el crecimiento de células cancerosas en el cáncer de ovario a través de un mecanismo dependiente del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Las plaquetas son la principal fuente de TGF- β en la circulación y como tal son por lo tanto muy propensas a estimular la proliferación de células cancerosas.

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo y crecimiento tumoral posterior depende de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), que se postuló por primera vez por Folkman en 1971, y las plaquetas son portadoras de una variedad de factores que regulan este proceso. Estos factores se almacenan en los gránulos α de las plaquetas y se liberan después de la activación plaquetaria provocada por las células cancerosas. VEGF es el más prominente e importante de estos factores para la angiogénesis. Las células cancerosas parecen inducir específicamente la liberación de VEGF de los gránulos α lo que promueve después la angiogénesis (Kisucka y otros, 2006) y por lo tanto el establecimiento y crecimiento del tumor.

La evidencia que respalda un efecto promocional de las plaquetas sobre la diseminación tumoral (metástasis) ahora es convincente (Gay y Felding Habermann (2011); Borsig (2008)). Dado que más del 90% de todas las muertes asociadas al cáncer son causadas por metástasis, (Lou y otros, 2015) la comprensión del papel de las plaquetas en este proceso se convierte en clave. Durante la metástasis, las células cancerosas se diseminan a otras partes del cuerpo tras ingresar al torrente sanguíneo desde el tumor primario en un proceso llamado intravasación que ahora se conoce que es mediado por plaquetas (Battinelli y otros, 2014). Una vez que las células cancerosas ingresan a la sangre activan las plaquetas lo que permite que estas últimas se agreguen y formen un escudo alrededor de las células tumorales circulantes lo que brinda protección contra las células asesinas naturales (NK) del sistema inmunitario (Nieswandt y otros, 1999). El mecanismo por el cual se efectúa esta interacción entre las células cancerosas y las plaquetas no se entiende completamente pero se considera que involucra una serie de mecanismos que incluyen las integrinas de la superficie de las plaquetas y sus ligandos de células tumorales correspondientes y mediante la unión de la selectina P plaquetaria con los ligandos de selectina que se expresan en las células tumorales (Amo L y otros, 2014). Esas células cancerosas circulantes que escapan de la destrucción por las células NK finalmente extravasan la vasculatura en los sitios metastásicos tras unirse a las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos y cruzan las paredes de los tejidos u órganos. Este proceso de extravasación se facilita por la liberación plaquetaria de trifosfato de adenosina lo que abre la barrera endotelial y permite que las células tumorales escapen de la vasculatura (Schumacher y otros, 2013). Para facilitar aún más este proceso de extravasación y penetración de las células cancerosas en el tejido adyacente estas se transforman a un fenotipo más maligno, la llamada "transición mesenquimal epitelial" (EMT) la cual recientemente se demostró de nuevo que depende de las interacciones de las plaquetas y las células cancerosas (Labelle y otros, 2011). El TGF β derivado de plaquetas en esta interacción activa sinérgicamente las vías TGF β /Smad y NF- κ B en las células cancerosas, lo que resulta en la transición EMT. Se ha demostrado que la inhibición de la señalización de NF- κ B en las

células cancerosas o la ablación de la expresión de TGFβ1 únicamente en las plaquetas protege contra la metástasis pulmonar *in vivo* (Labelle y otros, 2011). Por lo tanto para una metástasis eficiente las células cancerosas parece que dependen de señales derivadas de plaquetas fuera del tumor primario. De hecho la trombocitosis se observa con mayor frecuencia en pacientes con cánceres metastásicos.

Las metástasis óseas son una complicación frecuente de muchos cánceres (especialmente de mama, próstata, pulmón, tiroides y riñón) y, además de provocar un dolor muy intenso, suelen ser fatales (Weilbaecher y otros 2011). Desde finales del siglo XIX, se pensó que el microambiente del tejido huésped local participa activamente en la propensión de ciertos cánceres a metastatizar a órganos específicos lo que incluye el desarrollo de "nichos premetastásicos", y que el hueso proporciona un "suelo" especialmente fértil (Paget 1889). La migración y retención de las células tumorales en la médula ósea se efectúa mediante múltiples interacciones de unión que incluyen aquellas con integrinas de superficie en las células tumorales y las células estromales anfitrionas de soporte en el hueso (osteoclastos/osteoblastos, nuevos vasos sanguíneos, células inflamatorias, megacariocitos/plaquetas y células estromales de la médula ósea) las cuales desempeñan un papel clave en el aumento de la metástasis ósea.

Además, en pacientes con cáncer trombocitótico, los niveles más altos de megacariocitos - y su posterior desarrollo en plaquetas - son evidentes en el sitio en que se producen en la médula ósea y parece que predisponen a estos pacientes a un mayor riesgo de metástasis óseas. En un artículo reciente de Zhang y otros (2015) se encontró una fuerte correlación entre la trombocitosis en pacientes con adenocarcinoma pulmonar y el desarrollo de metástasis óseas. Se ha informado que los megacariocitos tienen un efecto apoptótico/fagocítico en las células cancerosas y actúan en una capacidad defensiva, ya que son las primeras células que extravasan las células tumorales que alcanzan la médula ósea (Park y otros 2011, Li y otros 2011 y Jackson y otros, 2015). Sin embargo en contra de esto está la producción de los factores de crecimiento secretados por los megacariocitos, que incluyen TGFβ, VEGF y PDGF, etc., los cuales se conoce que estimulan el crecimiento de células cancerosas. Además y evidentemente, el desarrollo mismo de las metástasis óseas habla de las limitaciones de cualquier papel defensivo que puedan desempeñar los megacariocitos. La evidencia crucial sobre el papel crítico de megacariocitos/plaquetas en la promoción de metástasis esqueléticas de cáncer de mama se informó en 2004 por Boucharaba y otros y también por Gupta y Massague en el mismo año. Si bien los megacariocitos pueden exhibir inicialmente un papel defensivo, la orientación de las células cancerosas hacia la médula ósea y el encuentro con megacariocitos, a través de un complejo proceso de múltiples pasos (Mishra y otros 2011), conduce a la alteración de la homeostasis ósea de osteoblastos/osteoclastos (Weilbaecher y otros 2011), un proceso normalmente regulado, en parte, por megacariocitos (Kacena y otros 2006). El número abrumador de células cancerosas que ingresan a la médula ósea como resultado de esta quimiotaxis puede conducir posteriormente al desarrollo de metástasis óseas. En resumen parece que el número excesivo de megacariocitos evidente en pacientes trombocitóticos apoya el desarrollo de metástasis óseas.

Además de la médula ósea, otro reservorio importante para megacariocitos es los pulmones. Aquí también se informó que el número de megacariocitos pulmonares asociados con metástasis pulmonares es mayor que en los pulmones de pacientes con carcinomas localizados e individuos sanos, lo que apunta una vez más a un papel crítico para los megacariocitos en el desarrollo de las metástasis (Soares 1992).

Por lo tanto parecería que la trombocitosis asociada al cáncer juega un papel crítico en el pronóstico de la enfermedad en términos de crecimiento de células tumorales, establecimiento de tumores y de manera importante posteriores metástasis particularmente en hueso y pulmón. Por lo tanto las intervenciones terapéuticas para reducir la función y/o la formación de plaquetas pueden ofrecer un nuevo enfoque valioso para abordar la morbilidad y mortalidad asociadas con el cáncer

Un enfoque para el direccionamiento de los problemas planteados por este número excesivo de plaquetas en pacientes trombocitóticos es el uso de los llamados agentes "antiplaquetarios". Este término es algo confuso ya que dichos agentes no reducen realmente el número de plaquetas sino que simplemente reducen la activación y agregación de plaquetas. Esto tiene el potencial de reducir la protección inmune que ofrecen las plaquetas y la posterior deposición vascular de las células cancerosas. En un estudio observacional retrospectivo, luego de una exposición indeterminada a una variedad de agentes antiagregantes, que incluye cilostazol, clopidogrel, prasugrel, ticlopidina, abciximab, eptifibatida, tirofiban, anagrelida, aspirina y dipiridamol Rachidi y otros (2014) notaron una asociación aparente entre los resultados del tratamiento en cáncer de cabeza y cuello y tal tratamiento en general. Sin embargo la mejora en la supervivencia se asoció más notablemente con aquellos pacientes que exhibieron conteos de plaquetas más bajos los cuales no provocaron estos agentes antiagregantes (con la única excepción de la anagrelida) aunque estos autores describen confusamente su uso como "una intervención farmacológica para disminuir las plaquetas". En un artículo anterior Ambrus y otros (1986) informaron que la terapia antiagregante en ratones con anagrelida, un fármaco que tiene efectos antiagregantes pero no reductores de plaquetas en animales (sus acciones reductoras de plaquetas son específicas para los humanos), se asoció con un aumento en el tiempo de circulación de las células cancerosas, un indicador del potencial reducido para el desarrollo de metástasis. Si bien recientemente se demostró que dicha terapia antiplaquetaria desempeña un papel útil en la prevención del cáncer (Bosetti y otros, 2012, Leader y otros 2015) por ejemplo con aspirina en el cáncer de intestino, no se investiga sistemáticamente el valor potencial de agentes selectivos *reductores* de plaquetas para detener la progresión del cáncer. Dicho esto, el agente antiagregante/reductor de plaquetas humano anagrelida se empleó en un estudio de caso clínico que informaron Voglova y otros (2006) en el que se intentó reducir las plaquetas en un hombre de 51 años que se trató con imatinib y anagrelida. Aquí sin embargo, el objetivo principal era minimizar las complicaciones trombohemorrágicas graves asociadas con su leucemia mieloide crónica en lugar de la progresión del cáncer. Otro estudio

de caso clínico (Chen YG y otros 2012) en un paciente masculino de 57 años usó la actividad reductora de plaquetas de la anagrelida para mitigar el riesgo trombótico en la trombocitosis neoplásica pulmonar primaria. El éxito se midió mediante una reducción de la inflamación de las piernas inducida por trombosis y no de la progresión del cáncer.

5 La disminución de plaquetas, como una alternativa a la simple modificación de la agregación plaquetaria, ofrece una estrategia atractiva para ralentizar la progresión del cáncer. Es probable que la preocupación por los posibles riesgos de hemorragia potencialmente asociados con una modesta reducción de plaquetas sea errónea ya que la hemostasia no se afecta esencialmente incluso cuando el número de plaquetas se reduce a 100.000/ μ l. De hecho los cirujanos operarán frecuentemente, sin transfusión de plaquetas, con conteos de plaquetas superiores a 75.000/ μ l. La transfusión profiláctica de plaquetas antes de la cirugía solo se recomienda en pacientes con trombocitopenia severa para aumentar el conteo de plaquetas a entre 50.000 y 100.000/ μ l si es posible. Se realizan cirugías y otros procedimientos invasivos con conteos plaquetarios más bajos sin sangrado mayor, consulte: <http://www.transfusionsguidelines.org/?Publication=HTM&Section=9&pageid=1120>. Por lo tanto existe un margen considerable para reducir el número de plaquetas sin incurrir en un riesgo de sangrado.

15 En animales la reducción de plaquetas en ratones portadores de tumores se demostró que provoca hemorragia intratumoral y la consiguiente necrosis tumoral (Ho-Tin-Noe y otros, 2009). Además se demostró que la reducción de las plaquetas aumenta los efectos terapéuticos antitumorales de una vacuna de ADN para el cáncer (Lee y otros, 2013). El apoyo adicional para el valor potencial del agotamiento de las plaquetas en el tratamiento del cáncer proviene de otros estudios en animales donde se demostró que la reducción experimental en el número de plaquetas tiene profundos efectos antimetastásicos (Gay y Felding-Habermann, 2011). También Stone y otros (2012) mostraron que tras eliminar la trombocitosis en ratones con cáncer de ovario se inhibía el crecimiento tumoral y aumentaba la necrosis tumoral. Si bien hay varios estudios publicados que destacan la importancia del conteo de plaquetas en la progresión del cáncer [Demers y otros (2011), Li y otros (2014) y Cho y otros (2012)] ninguno especifica cómo se podría lograr esto con, por ejemplo, el agente antimegacariocítico anagrelida, ni cómo se podría evitar la estimulación cardíaca profunda inducida por anagrelida.

Un enfoque para reducir las plaquetas se obtiene de la comprensión del mecanismo por el cual las células cancerosas inducen la trombocitosis. Aunque Buergy y otros especularon sobre la posible estimulación directa de megacariocitos por las células cancerosas, otra evidencia sugiere un mecanismo indirecto. Se cree que esto se afecta por el aumento de los niveles circulantes de citocinas como la interleucina IL-1, IL-6, IL-8 y/o el factor estimulante de colonias de granulocitos (Sierko y Wojtukiewicz 2004, Johnson y otros 2015) que inducen la producción de trombopoyetina en el hígado, y que a su vez estimula la generación de plaquetas en la médula ósea. En un estudio reciente en modelos de cáncer de ovario en ratón, la administración del anticuerpo IL-6, siltuximab, redujo significativamente el conteo de plaquetas y el crecimiento tumoral (Stone y otros, 2012). No obstante el uso de tales preparaciones puede limitarse por su costo, el requisito de administración intravenosa, y en particular su marcado efecto inmunosupresor así como otros efectos secundarios no deseados. Los efectos secundarios más prominentes asociados con el siltuximab y de hecho tocilizumab, otra preparación de anticuerpos contra IL-6, son las infecciones de las vías respiratorias superiores (> 20 % de los pacientes con siltuximab). En pacientes con cáncer con sistemas inmunes comprometidos estos son efectos secundarios particularmente indeseables. De hecho se informan infecciones graves y a veces fatales en pacientes que reciben dichos agentes inmunosupresores. Ver: <http://www.medicines.org.uk/emc/ingredient/2423/tocilizumab/>

Un enfoque alternativo para la reducción de las plaquetas podría ser el empleo de uno o más de los fármacos que generalmente se usan para tratar la trombocitemia esencial (ET), una afección mieloproliferativa rara marcada por un número excesivo de plaquetas sanguíneas y el riesgo trombótico importante. Aquí el conteo de plaquetas puede ser muy superior a 10^6 plaquetas/ μ l de sangre en comparación con el rango normal de 150,000-350,000 plaquetas/ μ l. El tratamiento de esta afección usa históricamente uno o más de los siguientes agentes:-

50 Hidroxicarbamida (hidroxiurea). Este es un agente citotóxico no específico que afecta a varias líneas celulares hematopoyéticas que incluye los linajes de granulocitos, leucocitos y eritrocitos. La leucopenia, una consecuencia potencial de la administración de hidroxicarbamida, sería indeseable en pacientes con cáncer que ya pueden tener un sistema inmunitario comprometido.

Ver: <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/18928/SPC>

55 Busulfano Este es un agente quimioterapéutico alquilante. Las toxicidades incluyen emesis severa, síndrome de emaciación, convulsiones y toxicidad hepática (enfermedad venooclusiva, VOD). Las convulsiones y el VOD son preocupaciones serias con la terapia con busulfano y esto último da como resultado toxicidad limitante de la dosis. Por lo tanto en vista de tales efectos secundarios graves el busulfano puede que no sea un fármaco de elección para disminuir las plaquetas sanguíneas en pacientes con cáncer.

60 Ver: <http://www.medicines.org.uk/EMC/medicine/24686/SPC/Busulfan+2+mg+tablets/>

65 Interferón alfa Si bien este fármaco reducirá el número de plaquetas sanguíneas es costoso, solo está disponible como preparación inyectable, y tiene efectos secundarios significativos que incluyen leucopenia, mialgia, artralgia y anorexia, de nuevo todos altamente indeseables en pacientes con cáncer. Ver: [http://www.medicines.org.uk/emcsearchresults.aspx?term=Interferon%20alfa2b%20\(Intron-A\)s](http://www.medicines.org.uk/emcsearchresults.aspx?term=Interferon%20alfa2b%20(Intron-A)s).

Anagrelida Este fármaco es el único agente reductor de plaquetas citoselectivo disponible actualmente es decir no inhibe la formación de otras líneas de células sanguíneas aparte de las plaquetas (Hong y otros 2006). Esta selectividad única sería particularmente valiosa al tratar pacientes con cáncer que pueden ya estar comprometidos hematológicamente por ser potencialmente anémicos y leucopénicos. La anagrelida se comercializa actualmente como Agrylin®, Xagrid® y Thromboreductin® así como diversas formulaciones genéricas para el tratamiento de la trombocitemia esencial. Los efectos farmacológicos primarios de este fármaco es decir la disminución de plaquetas, se producen por sus efectos sobre la maduración de los megacariocitos, los progenitores de las plaquetas. Como se indicó anteriormente, sus acciones citoselectivas lo hacen excepcionalmente valioso. Sin embargo el fármaco también demuestra actividad antiagregante (antiplaquetaria), como resultado de la inhibición de la fosfodiesterasa (PDE) III, que es una actividad farmacológica secundaria pero separada. Esta propiedad, llamada inhibición de PDEIII, es la que lamentablemente también produce sus efectos secundarios cardiovasculares altamente indeseables.

Ahora parece que los efectos cardiovasculares no deseados de la anagrelida se deben en gran medida a un metabolito del fármaco extremadamente potente inhibitorio de PDEIII, a saber 3-hidroxi anagrelida (anteriormente se conoció como BCH 24426). Como un inótropro positivo este compuesto tiene un marcado efecto estimulante en el corazón (Wang y otros, 2005). Si bien la anagrelida tiene cierta actividad inhibitoria de PDEIII en sí misma, su actividad en comparación con este metabolito es comparativamente baja al ser esta última casi 40 veces más potente pero tiene una actividad reductora de plaquetas algo menor que la anagrelida en sí (Wang y otros, 2005). La formación de este metabolito es el resultado de un amplio metabolismo de primer paso después de la dosificación oral. En la práctica clínica las concentraciones plasmáticas de este metabolito típicamente exceden las del fármaco original en 2-3 veces (Martínez-Selles y otros, 2013).

Estos efectos cardiovasculares adversos que se manifiestan como taquicardia, palpitaciones y dolor de cabeza intenso pueden limitar la dosis y son la causa principal de que los pacientes interrumpan la terapia. Conservadoramente se estima que alrededor del 25 % de los pacientes que reciben anagrelida interrumpen el tratamiento farmacológico como resultado de tales efectos secundarios cardiovasculares (Birgegard y otros, 2004). El etiquetado que se aprobó para la anagrelida deja claro que después de dosis terapéuticas del fármaco, pueden ocurrir efectos cardiovasculares, tales como palpitaciones y taquicardia, especialmente si se administra a pacientes con enfermedades cardíacas preexistentes. En consecuencia el etiquetado advierte contra la administración del fármaco a dichos pacientes y recomienda un examen cardiovascular antes de comenzar la terapia ver:-
<http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/15737/SPC/Xagrid+0.5mg+hard+capsule>

Estos efectos secundarios cardiovasculares relegan actualmente el uso de anagrelida a la terapia de segunda línea en el tratamiento de la trombocitemia esencial (ver Birgegard y otros, 2004).

Varios informes de la literatura destacan aún más las complicaciones cardíacas que pueden estar asociadas con el uso crónico de la anagrelida (Mlot y Rzepecki 2012). En un estudio de caso, la cardiotoxicidad de la anagrelida se manifestó como insuficiencia cardíaca congestiva en una mujer de 48 años con policitemia vera (James CW 2000). La frecuencia de tales efectos secundarios cardiovasculares durante el tratamiento de rutina se informó de la siguiente manera:-

Común: palpitaciones y taquicardia,

Menos común: insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, arritmia, fibrilación auricular

Ocasionalmente: angina, infarto del miocardio, cardiomegalia, cardiomiopatía, derrame pericárdico, e hipotensión ortostática.

En un estudio que informaron Jurgens y otros (2004), se encontró que la anagrelida causa cardiomiopatía en varios pacientes. En los datos recogidos de unos 434 pacientes con trombocitemia esencial y policitemia vera, la miocardiopatía idiopática fue evidente en 11. Wong y otros (2008) informaron posteriormente sobre otro caso de miocardiopatía inducida por anagrelida. Además una comunicación reciente (Shire, 2013) enviada por Shire Pharmaceuticals, creador del fármaco, a todos los profesionales de la salud resaltó el hecho de que pueden ocurrir eventos adversos cardiovasculares graves incluso en pacientes *sin* sospecha de enfermedad cardíaca y con función cardiovascular previa normal.

Los efectos secundarios cardiovasculares serían problemáticos en pacientes con cáncer que están potencialmente en riesgo de toxicidad cardiovascular inducida por la quimioterapia, particularmente aquellos pacientes de edad avanzada con enfermedad cardiovascular preexistente (Yeh y otros 2004). En una revisión profunda de la cardiotoxicidad de los fármacos oncológicos, Fuiza M (2012) destacó que se trata de un problema común con la mayoría, si no todos, los agentes quimioterapéuticos. De hecho ahora se reconoce ampliamente que la quimioterapia se asocia con muchos aspectos diferentes de la cardiotoxicidad, desde arritmias, pericarditis, isquemia miocárdica hasta cardiomiopatía (Saidi y Althrethi, 2011), Mlot y Rzepecki 2012). Se demostró que muchos de los agentes quimioterapéuticos de uso común como el cisplatino, la doxarrubicina y el trastuzumab tienen un marcado efecto adverso sobre la función ventricular izquierda (Saidi y Althrethi, 2011).

Por lo tanto a pesar de la considerable utilidad potencial de la anagrelida para disminuir selectivamente las plaquetas en pacientes con cáncer trombocitótico, su uso parece que se pasó por alto lo que posiblemente se deba a la preocupación por la exacerbación de alguna cardiotoxicidad inducida por la quimioterapia.

A pesar de estas preocupaciones recientemente aparecieron tres patentes que sugieren que la anagrelida podría usarse potencialmente como un agente antitumoral en pacientes con cáncer a través de sus supuestos efectos apoptóticos a dosis muy altas o, sorprendentemente, su inhibición de PDEIII. En WO2014/183673 A1 Quiang Yu y otros reivindican "el uso antitumoral de la anagrelida y sus derivados" basado en la aparente apoptosis observada *in vitro* en varias líneas celulares de cáncer (valor IC50 100 nM) y *estudios in vivo* muestran dicha actividad en ratas después de dosis de 10-30 mg/kg. Estas concentraciones/dosis son > 10 veces y > 1000 veces más altas de lo que podría lograrse de manera segura en el hombre y darían como resultado un trastorno cardiovascular profundo. Además otros estudios publicados no encontraron efectos apoptóticos de la anagrelida incluso hasta una concentración de 1 µM (Hong y otros 2006). En otras dos patentes, WO2015/055898 y WO2014/164794, se reivindica la explotación de la acción inhibitoria de PDEIII de la anagrelida como útil al tratar el cáncer. A la luz de las preocupaciones clínicas sobre los problemas cardiovasculares ya evidentes en pacientes con cáncer tales propuestas parecerían particularmente inadecuadas.

En resumen la eficacia limitada de los tratamientos contra el cáncer disponibles actualmente destaca la necesidad de un nuevo enfoque para abordar esta enfermedad. Los datos clínicos recientes llaman la atención sobre el papel de las plaquetas en la promoción del crecimiento de células cancerosas, el establecimiento de tumores y la metástasis particularmente en los huesos ofrecen un enfoque potencialmente nuevo para la intervención terapéutica. En su forma más simple esto podría implicar una reducción en el número de plaquetas. Sin embargo el bloqueo de la estimulación de la producción de plaquetas que inducen las células cancerosas y por lo tanto la interrupción del ciclo patogénico entre las células cancerosas y las plaquetas ofrecería un enfoque intrigantemente diferente para el tratamiento del cáncer. Además la inhibición de la migración de las células cancerosas a la médula ósea ofrecería un objetivo potencial para minimizar el riesgo de metástasis óseas casi inevitablemente fatales.

El único agente reductor de plaquetas citoselectivo disponible actualmente es la anagrelida que, en su forma actual, sería un fármaco candidato inadecuado debido a sus efectos secundarios cardiovasculares altamente indeseables que podrían poner en mayor riesgo a los pacientes con cáncer cardiocomprometido.

R. T. Silver, y otros, LEUKEMIA., 19 (1), 39-43, 2005; OM Trapp, y otros, BLOOD CELLS, MOLECULES AND DISEASES, 24(1), 9-13, 1998; y L. Voglová, y otros, VNITRNI LEKARSTVI, AMBIT MEDIA, 52 (9), 819-822, 2006; describen el uso de la anagrelida en el tratamiento de trombocitosis en pacientes con leucemia mieloide crónica.

Y.-G. Chen, y otros, JAPANESE JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 42 (8), 761-763, 2012 describe el uso de la anagrelida para tratar la trombocitosis asociada a la neoplasia pulmonar.

G. J. Gasic, y otros, Proceedings of the National Academy of Sciences, 61 (1), 46-52, 1968; R. Saleh, y otros, JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD, LONDRES Reino Unido, 7 (1), 65, 2014; R. Li, y otros, BMC CANCER, 14 (1), 167, 2014; US 2014/037629 A1; H. C. Hasselbach, LEUKEMIA RESEARCH, 38 (10), 1230-1236, 2014; M. S. Cho, y otros, Blood, 120 (24), 4869-4872, 2012; M. Labelle, y otros, CANCER CELL, CELL, 20(5), 576-590, 2011; L. J. Gay, y otros, NATURE REVIEWS. CANCER, 11(2), 123-134, 2011; S. Karpatkin, y otros, JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 81 (4), 1012-1019, 1988; M. Labelle, y otros, Proceedings of the National Academy of Sciences, 111 (30), E3053-E3061, 2014; y E. Pearlstein, y otros, Cancer Research, 44, 3884-3887, 1984 se refieren al uso de agentes antiplaquetarios o agentes reductores de plaquetas.

WO 2014/183673 y J. L. Ambrus, y otros, JOURNAL OF MEDICINE (WESTBURY), 17 (3-4), 219-226, 1986 describen el uso de la anagrelida para tratar el cáncer y/o la metástasis del cáncer.

Resumen de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones.

Ahora existe una amplia evidencia clínica que destaca la presencia de trombocitosis en muchos cánceres diferentes y el papel que desempeña un número excesivo de plaquetas en la promoción del crecimiento de células cancerosas, el establecimiento del tumor, que incluye la angiogénesis y la subsiguiente metástasis, particularmente las metástasis óseas potencialmente mortales. Dado que las células cancerosas estimulan la megacariocitopoyesis/producción de plaquetas lo que a su vez impulsa el crecimiento de las células cancerosas, esto lleva a que se establezca un círculo vicioso o un ciclo patogénico.

La trombocitosis paraneoplásica presenta por lo tanto un nuevo objetivo potencialmente valioso para la intervención terapéutica y ofrece la oportunidad de romper este círculo vicioso. A pesar de esto, actualmente no se emplean fármacos para este propósito en el tratamiento del cáncer lo que posiblemente se debe a la falta de agentes antimegacariocíticos citoselectivos seguros. De los pocos agentes reductores de plaquetas disponibles actualmente, la anagrelida, que inhibe solo la formación de plaquetas y ninguna otra línea celular hematopoyética, es excepcionalmente valiosa.

De acuerdo con un aspecto de esta invención se proporciona un compuesto, en donde el compuesto es la anagrelida, una sal, solvato o metabolito activo farmacéuticamente aceptable de esta, para usarse en tratar o prevenir la enfermedad metastásica en un paciente con cáncer trombocitótico.

De acuerdo con un aspecto de esta invención se proporciona un método de tratar o prevenir la enfermedad metastásica en un paciente con cáncer trombocitótico, el método incluye la administración al paciente de un compuesto, en donde el compuesto es la anagrelida, una sal, solvato o metabolito activo farmacéuticamente aceptable de esta.

5 Un paciente trombocitótico es un individuo que tiene un conteo alto de plaquetas sanguíneas, por ejemplo, un paciente que tiene un conteo de plaquetas sanguíneas > 450.000/ μ l de sangre (Harrison y otros, 2010). Sin embargo, para los individuos cuyo conteo basal de plaquetas se encuentra en el rango más bajo de lo normal, puede considerarse trombocitótico un conteo de plaquetas por encima de 400.000/ μ l, 350.000/ μ l, 300.000/ μ l, o incluso 250.000/ μ l.

10 En otro aspecto de esta invención se proporciona un compuesto, en donde el compuesto es la anagrelida, una sal, solvato o metabolito activo farmacéuticamente aceptable de esta, para usarse en la inhibición del efecto estimulante de las células cancerosas en el proceso de megacariocitopoyesis.

15 En otro aspecto de esta invención se proporciona un método para inhibir en un paciente el efecto estimulante de las células cancerosas en el proceso de megacariocitopoyesis, el método incluye la administración al paciente de un compuesto, en donde el compuesto es la anagrelida, una sal, solvato o metabolito activo farmacéuticamente aceptable de esta. En una modalidad, el paciente es un paciente con cáncer trombocitótico.

20 La ruptura de este círculo vicioso o ciclo patogénico que estimula el crecimiento y desarrollo del cáncer, ofrece un enfoque radicalmente nuevo para el tratamiento de la enfermedad.

25 En otro aspecto de esta invención se proporciona un compuesto, en donde el compuesto es la anagrelida, una sal, solvato o metabolito activo farmacéuticamente aceptable de esta, para usarse en la inhibición de la atracción migratoria de las células cancerosas circulantes hacia los megacariocitos.

30 En otro aspecto de esta invención se proporciona un método para inhibir la atracción migratoria de las células cancerosas circulantes hacia los megacariocitos en el paciente, el método incluye la administración al paciente de un compuesto, en donde el compuesto es la anagrelida, una sal, solvato o metabolito activo farmacéuticamente aceptable de esta. En una modalidad, el paciente es un paciente con cáncer trombocitótico.

La inhibición de la atracción migratoria de las células cancerosas circulantes hacia los megacariocitos limita la posibilidad de metástasis, por ejemplo, en hueso y pulmón, los principales depósitos de megacariocitos en el cuerpo. El bloqueo de esta 'atracción fatal' ofrece una vez más un enfoque radicalmente diferente para el tratamiento del cáncer.

35 En una modalidad de la invención, el cáncer a tratar se selecciona del grupo que consiste en cerebro, cavidad oral, cabeza y cuello que incluye la región nasofaríngea, carcinoma de tiroides, cánceres gastrointestinales que incluyen el cáncer esofágico o gástrico, el cáncer pancreático, hepatocelular o colorrectal así como el cáncer de los pulmones y bronquios, y el cáncer de los ovarios, endometrio, cuello uterino, mama, próstata, riñones, mesotelioma cutáneo, melanoma, vesícula biliar o mieloma múltiple.

40 En una modalidad el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario y mama.

45 En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cerebro, cavidad oral, cabeza y cuello, que incluye la región nasofaríngea y el carcinoma de tiroides.

En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer esofágico, gástrico y colorrectal.

50 En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer del tracto gastrointestinal que incluye cáncer esofágico, gástrico, pancreático, hepatocelular o colorrectal.

En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer esofágico, cáncer gástrico.

55 En otra modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmones y bronquios.

En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer pancreático, cáncer colorrectal y cáncer renal.

60 En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular.

En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovarios, endometrio, cuello uterino o mama.

65 En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en la próstata.

- En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de cerebro, cavidad oral, cáncer de bronquio, endometrio, mama, próstata, mesotelioma de piel y melanoma.
- 5 En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de riñones o vesícula biliar.
- En una modalidad, el cáncer es mieloma múltiple.
- En una modalidad, el paciente que se trata es un individuo trombocitótico que está en riesgo de desarrollar cáncer.
- 10 En una modalidad, el paciente que se trata es un paciente con cáncer trombocitótico.
- En otra modalidad, el paciente que se trata es un paciente con cáncer trombocitótico y cardiocomprometido.
- 15 En una modalidad, la paciente que se trata tiene un riesgo genético particular de cánceres específicos, por ejemplo que porta los genes BRCA1/2 de cáncer de mama y de ovario.
- En una modalidad de esta invención, la anagrelida, una sal, solvato o metabolito activo farmacéuticamente aceptable de esta se formula para minimizar cualquier efecto secundario cardiovascular en una preparación preservadora cardíaca adecuada. Dicha formulación puede lograrse tras controlar la velocidad y el grado de formación del metabolito cardioactivo
- 20 altamente potente que se genera en el primer paso, 3-hidroxi anagrelida, tras minimizar la proporción del fármaco que se absorbe a través del hígado, para reducir así el riesgo de efectos inotrópicos y vasodilatadores indeseables. Tras hacerlo esto permite el uso más seguro del fármaco al prevenir o tratar el cáncer en pacientes trombocitóticos (véase la definición).
- 25 Los expertos en la técnica apreciarán que existen numerosas estrategias y métodos bien establecidos disponibles para reducir o evitar el metabolismo de primer paso y por lo tanto, en el caso de la anagrelida, la generación de su metabolito cardioactivo altamente potente.
- Las formulaciones de dosificación entérica que aprovechan la absorción en los extremos proximal y distal del tracto GI reducen la proporción de fármaco que pasa a través del hígado y por lo tanto el efecto de primer paso. Por ejemplo las
- 30 pastillas orales -formulaciones de azúcar dura que se disuelven lentamente en la boca- facilitan la absorción oral y sublingual y en consecuencia el paso del fármaco directamente a la circulación sistémica. Dichas formulaciones reducirían la cantidad de fármaco que llega al tracto GI inferior donde normalmente se absorbería y pasaría por el hígado con la generación de primer paso importante del metabolito cardioactivo de anagrelida.
- 35 Las formulaciones orales alternativas incluyen películas y tabletas orales mucoadhesivas, tabletas sublinguales, atomizadores oromucosales etc, muchas de las cuales se emplearon con éxito con varios fármacos para reducir el metabolismo de primer paso por ejemplo testosterona http://www.actientpharma.com/filebin/pdf/products/5881610_Striant_full_PI_4pager. y buprenorfina (Krotscheck y otros, 2010).
- 40 El suministro de fármacos al extremo distal del tracto GI (recto) da como resultado una absorción parcial por las venas hemorroidales inferiores y medias que drenan directamente en la vena cava y, por lo tanto en la circulación sistémica lo que reduce el suministro a través del hígado y la marcada generación de primer paso importante del metabolito cardioactivo de anagrelida. Dicha ubicación de suministro de fármacos específicos se puede lograr fácilmente con geles o supositorios rectales.
- 45 Administración parental - Evitar por completo el tracto GI proporciona los medios más directos para eludir la generación de primer paso del metabolito altamente cardioactivo de la anagrelida. Las descripciones genéricas de las diversas formulaciones parenterales posibles se cubren exhaustivamente en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22ª edición, 2012.
- 50 Una vía de administración no entérica atractiva que reduce el riesgo de formación de este metabolito de primer paso es el uso de un atomizador intranasal. Aquí el fármaco se absorbe a través de la mucosa nasal directamente en la circulación sistémica de nuevo lo que minimiza el metabolismo hepático de primer paso. Esta estrategia bien establecida se utiliza exitosamente para el suministro sistémico de varios fármacos, que incluyen el midazolam y la desmopresina.
- 55 Otro medio de minimizar la formación de este metabolito cardioactivo es utilizar la vía de administración pulmonar. La administración de aerosol al epitelio pulmonar para la acción sistémica superaría de nuevo el problema del metabolismo de primer paso en el hígado.
- 60 Una vía no entérica adicional se proporciona por aplicación tópica/dérmica. Aquí el fármaco se absorbe directamente a través de la piel hacia la circulación sistémica por lo que, una vez más, se evita la formación de primer paso del metabolito cardioactivo de anagrelida.
- 65 Las formulaciones de la presente invención pueden administrarse idealmente una o dos veces al día, pero otras pueden beneficiarse de una administración menos o más frecuente. En todas estas formas de dosificación, la esencia es reducir

la formación del metabolito cardioactivo de la anagrelida, la 3-hidroxi anagrelida, mediante el uso de enfoques bien establecidos. También se prevé la administración conjunta con otros fármacos contra el cáncer y la terapia adyuvante.

Descripción de las figuras:

5

Fig 1. Las células cancerosas de ovario mejoran el desarrollo de megacariocitos: Acción inhibitoria de anagrelida. Las células CD34+ expandidas se cultivaron conjuntamente durante 7 días en medio MK que contenía 10 ng/ml de TPO con o sin anagrelida (1 μ M) y en ausencia o presencia de células COV362 que se cultivaron a las densidades indicadas. El cultivo conjunto se realizó en una cámara Boyden con células COV362 que se cultivaron en el compartimento inferior 4 días antes del comienzo del período de diferenciación. El desarrollo de MK se analizó como se describe en Procedimientos experimentales. Los resultados (media \pm SEM de 2 cultivos replicados) se expresan en relación con el número de megacariocitos desarrollados en ausencia de células COV362.

10

15

Fig 2. Los megacariocitos aumentan la migración de las células de cáncer de ovario. Las células COV362 se cargaron en una cámara Boyden y se determinó su trans migración hacia cultivos MK de siete días o hacia una cantidad equivalente de medio MK (control) en los tiempos indicados como se describe en Procedimientos experimentales. Los resultados representan el número de células COV362 que migraron por campo microfotográfico (media \pm SEM de 5-10 campos por condición).

20

Fig 3. La anagrelida inhibe el aumento de megacariocitos de la migración de células de cáncer de ovario. Las células COV362 se cargaron en una cámara Boyden y se determinó su trans migración hacia cultivos MK de siete días en ausencia o presencia de anagrelida (1 μ M) o hacia una cantidad equivalente de medio MK (control) después de una incubación durante la noche, como se describe en Procedimientos Experimentales. Los resultados (media \pm SEM de 4 experimentos) se expresan en relación con el número de células COV362 que migraron hacia el medio de crecimiento solo. **, P < 0.01 por ANOVA con la prueba post hoc de Bonferroni; ns, no significativo.

25

30

Fig 4. La anagrelida inhibe el aumento de megacariocitos de la migración de células de cáncer de ovario a concentraciones clínicamente relevantes. Las células COV362 se cargaron en una cámara Boyden y se determinó su trans migración hacia cultivos MK de siete días cultivados en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de anagrelida o hacia una cantidad equivalente de medio MK (control) después de 16 h, como se describe en Procedimientos Experimentales. Los resultados (media \pm SEM de 2 pocillos replicados) se expresan en relación con el número de células COV362 que migraron hacia el medio de crecimiento solo.

35

Descripción detallada de la invención

Definiciones como se usan en la presente descripción:-

40

Antimegacariocítico se refiere a la actividad reductora de plaquetas en humanos que interfiere con el desarrollo y maduración de megacariocitos en las plaquetas sanguíneas. Dichos agentes pueden ser particularmente valiosos en la profilaxis y el tratamiento del cáncer.

45

La Organización Mundial de la Salud define la "trombocitosis" como un conteo de plaquetas superior a 450.000/ μ l de sangre (Harrison y otros, 2010). Sin embargo un número menor puede ser relevante en el entorno terapéutico descrito en la presente descripción. En tales sujetos los conteos de plaquetas de 350.000/ μ l o incluso 300.000/ μ l pueden considerarse trombocitóticos. En otros sujetos, un conteo de plaquetas de 250.000/ μ l puede considerarse trombocitótico para los propósitos de esta invención.

50

"Cardiocomprometido" es un término general para cualquier problema cardíaco, como enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis, arteriosclerosis, aneurisma, disritmia, insuficiencia cardíaca, isquemia/infarto de miocardio, hipertensión y tromboembolismo. Más específicamente puede referirse a la reducción de la función ventricular izquierda que se observa con frecuencia en pacientes con cáncer tratados con agentes de quimioterapia.

55

El término "efecto secundario modulado" o "preservador cardíaco" se refiere a aquellas formulaciones (y sus vías de administración) de anagrelida o un metabolito activo del fármaco que están específicamente diseñados para minimizar la generación del primer paso y la exposición sistémica subsiguiente al potente agente cardioactivo 3-hidroxi anagrelida u otras entidades similares.

La trombocitopenia generalmente se define como un conteo de plaquetas de menos de 75.000/ μ l.

60

El término "vehículo" se refiere a un disolvente, excipiente y/o vehículo con el que se administra la anagrelida (o el metabolito activo adecuado de esta). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener combinaciones de más de un vehículo. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua, disoluciones salinas, disoluciones acuosas de dextrosa, disoluciones acuosas de glicerina, y aceites, que incluyen aquellos de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua o disoluciones acuosas, las disoluciones salinas y las disoluciones acuosas de dextrosa y glicerina se

65

emplean preferentemente como vehículos, particularmente para disoluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" editado por Loyd V Allen, 22ª Edición, 2012).

5 La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que generalmente se consideran seguras. En particular, los vehículos farmacéuticamente aceptables que se usan en la práctica de esta invención son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción adversa alérgica o similar (por ejemplo, malestar gástrico, mareos y similares) cuando se administran a un paciente. Preferentemente, como se usa en la presente descripción, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia regulatoria de la agencia gubernamental adecuada o que se enumeró en la U.S. Pharmacopoeia u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en humanos.

10 Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que generalmente es seguro, no tóxico ni indeseable biológicamente ni de otra forma, e incluye un excipiente que es aceptable para uso farmacéutico humano. Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente solicitud incluye tanto uno como más de uno de tales excipientes.

15 El término "tratar" incluye: (1) prevenir o retrasar la aparición de síntomas clínicos del estado, trastorno o afección que se desarrolla en una persona que puede estar aquejada con o predispuesta al estado, trastorno o afección pero que aún no experimenta o manifiesta síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o afección; (2) inhibir el estado, trastorno o afección (es decir, detener, disminuir o retrasar el desarrollo de la enfermedad, o una recaída de ésta en caso de tratamiento de mantenimiento, de al menos un síntoma clínico o subclínico de ésta); y/o (3) aliviar la afección (es decir, provocar la regresión del estado, trastorno o afección o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos). Para un paciente el beneficio de que lo traten es estadísticamente significativo o al menos perceptible para el paciente o para el médico. En una modalidad, el término "tratar" incluye reducir el potencial para cualquiera o la totalidad de lo siguiente: proliferación de células cancerosas, establecimiento y desarrollo de tumores y la formación de metástasis.

20 El término "sujeto" se refiere a seres humanos.

30 "Cantidad eficaz" significa una cantidad de anagrelida (o metabolito activo adecuado de esta) o composición de la presente invención suficiente para dar como resultado la respuesta terapéutica deseada. La respuesta terapéutica puede ser cualquier respuesta que un usuario (por ejemplo, un médico) reconocerá como una respuesta eficaz a la terapia. La respuesta terapéutica generalmente será la mejora de una o más de las afecciones tratables con el fármaco activo. Por ejemplo, ralentización del desarrollo tumoral y metástasis en un paciente. Además está dentro de la habilidad de un experto en la técnica determinar la duración adecuada del tratamiento, las dosis adecuadas, y cualquier combinación posible de tratamientos, sobre la base de una evaluación de la respuesta terapéutica.

35 El término "ingrediente activo," a menos que se indique específicamente, debe entenderse que se refiere a la anagrelida o cualquier metabolito activo adecuado de esta. El término "metabolito activo" se refiere a la anagrelida que se hidroxiló en las posiciones 5, 8 o 9 individualmente o en combinación. Alternativamente se prevé la oxidación en la posición de nitrógeno terciario que forma un N-óxido con o sin hidroxilación como las posiciones 5, 8 o 9.

40 El término "sales" puede incluir sales de adición de ácido o sales de adición de bases libres. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales metálicas tales como sales de sodio, potasio y cesio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio; sales de aminas orgánicas tales como trietilamina, guanidina y sales de guanidina N-sustituidas, acetamidina y *acetamidina N-sustituida*, piridina, picolina, etanolamina, trietanolamina, dicitclohexilamina, y sales de N, N'-dibenciletilendiamina. Las sales farmacéuticamente aceptables (de los centros básicos de nitrógeno) incluyen, pero no se limitan a sales de ácido inorgánico tales como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, fosfato; sales de ácidos orgánicos tales como sales de trifluoroacetato y maleato; sulfonatos tales como metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, alcanfor sulfonato y naftalenosulfonato; y sales de aminoácidos tales como sales de arginato, gluconato, galacturonato, alaninato, asparginato y glutamato (véase, por ejemplo, Berge, y otros. (1977)).

45 El término "metabolismo o efecto de primer paso" se refiere a la cantidad de fármaco que se eliminó por el hígado (y se convirtió en uno o más metabolitos) durante el paso inicial del fármaco a través de ese órgano después de la dosificación oral.

50 Ventajas de los compuestos de la invención

60 Los estudios *in vitro* que se proporcionan en la presente descripción demostraron un efecto directo de las células cancerosas en la estimulación de la megacariocitopoyesis y además que la anagrelida puede, a pesar de este efecto estimulante, inhibir notablemente la megacariocitopoyesis. De este modo, se rompe el "círculo vicioso" de la interacción células cancerosas-plaquetas lo que ofrece un enfoque completamente nuevo para el tratamiento del cáncer.

65 Una ventaja de la invención es que por primera vez se demuestra que la anagrelida, a concentraciones plasmáticas clínicamente relevantes, inhibe una atracción migratoria observada de las células cancerosas circulantes hacia los megacariocitos. Los megacariocitos normalmente se localizan principalmente en la médula ósea, y los pulmones por lo

que la reducción de cualquier respuesta quimiotáctica de las células cancerosas hacia estos sitios debería limitar dicha localización y por lo tanto el potencial de metástasis allí. Esto nuevamente ofrece un enfoque radicalmente nuevo para el tratamiento del cáncer.

5 La presente invención tiene el beneficio de ser ampliamente aplicable a tratar una variedad de cánceres de origen muy diferente ya que el mismo mecanismo de crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis por medio de plaquetas parecen prevalecer entre la mayoría de los tipos de cáncer (ver la lista más adelante). De hecho la trombocitosis paraneoplásica es evidente en muchos tipos de cáncer y ahora se aprecia que es inducida por ella. Además la evidencia de que la magnitud del conteo de plaquetas determina la supervivencia es ahora convincente en muchos tipos de cáncer
10 diferentes. Hasta ahora, se demuestra que las tasas de supervivencia se relacionan con el número de plaquetas para los siguientes tipos de cáncer:-

Cerebro, - Brockmann MS y otros (2007) Williams M y otros (2012)

15 Cavidad oral (que incluye cabeza y cuello, nasofaríngea, esofágica) - Rachidi S y otros (2014), Furlan C y otros (2015) Chen Y-P y otros (2015). Verma GR y otros (2015)

Cáncer de tiroides - Sun y otros (2013)

20 Cáncer de mama Lal I y otros (2013), Stravodimou A y Voutsadakis IA (2013), Rajkumar A y Szallasi A (2013),

Cáncer de pulmón - Yu D, y otros (2013), Zhang X y Ran Y (2015)

Cáncer de estómago - Lv X y otros (2010), Li F-X y otros (2014), Voutsadakis IA (2014)

25

Cáncer de hígado - Lee C-H y otros (2015), Pang Q y otros (2015)

Cáncer de vesícula biliar - Wang RT y otros (2015),

30 Cáncer pancreático - Shimada H y otros (2004), Suzuki K y otros (2004), Chadha AS y otros (2015), Wang H y otros (2014)

Cáncer de ovario, cuello uterino y endometrio - Lee y otros (2011), Yuan L y Liu X (2015) Bottsford-Miller KJ y otros (2015), Kawano M y otros (2015)

35

Cáncer de riñón - Gu L y otros (2015)

Cáncer de próstata - Li F y otros (2015)

40 Cáncer colorrectal - Josa V y otros (2015)

Mieloma múltiple - Takagi S y otros (2015)

45 Otra ventaja importante de la presente invención es que permite el uso más seguro del agente citoselectivo, antimegacariocítico anagrelida para tratar el cáncer en pacientes trombocitóticos mediante el uso de una de las diversas formulaciones de preservación cardíaca descritas en la presente descripción. Estas formulaciones minimizan la generación de primer paso normal del metabolito altamente cardioestimulante, 3-hidroxi anagrelida, un compuesto 40 veces más potente en este respecto que el fármaco original pero con menos actividad como entidad reductora de plaquetas.

50

La potencia inherente de la anagrelida y la consiguiente baja dosis diaria oral de solo 1-2 mg, facilita el desarrollo de formulaciones de baja carga de este tipo, a saber, tabletas orales/sublinguales, atomizadores oromucosales, atomizadores nasales, administración pulmonar, inyecciones rectales o iv/im/sc.

55 Una ventaja adicional de estas formulaciones de preservación cardíaca es que en virtud de sus vías de administración a saber oral/sublingual, atomizador oromucosal, atomizador nasal, suministro pulmonar, inyección iv/im/sc o rectal ellas minimizan el riesgo de pérdida de fármaco del estómago que puede resultar de la emesis inducida por la quimioterapia en pacientes con cáncer.

60 Una ventaja adicional de la invención es que cuando la anagrelida, una sal, solvato o un metabolito activo farmacéuticamente aceptable de la misma se combina con otro quimioterapéutico este potencialmente actúa sinérgicamente con otros agentes quimioterapéuticos administrados para aumentar la eficacia de dicho tratamiento contra el cáncer. Tal aumento puede resultar en la necesidad de dosis más bajas de dichas quimioterapias y una reducción en los efectos secundarios adversos observados con dichos agentes, tales como náuseas, vómitos, diarrea así como reducciones no deseadas en varios componentes celulares de la sangre total. Por tanto se puede mejorar la conformidad del paciente.

65

Esta invención también permite utilizar cambios potencialmente beneficiosos en las dosis de anagrelida. Tras aumentar la biodisponibilidad sistémica del fármaco y minimizar la exposición al metabolito altamente cardioestimulante y al riesgo cardiovascular, se pueden usar dosis más bajas que las empleadas actualmente. La biodisponibilidad oral de la anagrelida normalmente baja se debe a un extenso metabolismo de primer paso que no solo produce el 3-hidroxi-anagrelida cardioestimulante sino también otros metabolitos no farmacológicamente activos como 2-amino-5,6-dicloro-3,4,-dihidroquinazolina (RL603). Los estimados de la biodisponibilidad oral de la anagrelida indican que es inferior al 50 %. Ver: <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/dailys/04/aug04/081604/04p-0365-cp00001-09-Tab-H-vol1.pdf>. Por lo tanto se prevé que las dosis diarias de estas formulaciones de preservación cardíaca podrían ser significativamente más bajas que las empleadas actualmente.

Además la reducción esperada en los efectos secundarios cardiovasculares limitantes de la dosis de la anagrelida que se ven a menudo podría permitir el uso de *dosis* mayores, cuando se requiera en casos refractarios. La reducción en los efectos secundarios también debería ofrecer el beneficio de una mejor conformidad del paciente con menos pacientes con probabilidad de suspender el tratamiento.

Así en resumen esta invención busca usar la anagrelida, una sal, solvato o metabolito activo farmacéuticamente aceptable de esta en cualquiera de una variedad de formulaciones preservadoras cardíacas en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades metastásicas en cánceres de etiología ampliamente variable en pacientes con un pronóstico significativamente peor que se debe a la trombocitosis paraneoplásica. Esto se vería afectado por la reducción en el número de plaquetas tras romper el círculo vicioso de la interacción plaquetas-células cancerosas así como a través de la inhibición de la migración de las células cancerosas hacia la médula ósea, y los megacariocitos localizados en los pulmones lo que reduce la probabilidad de metástasis potencialmente fatales en estos sitios.

Se emplean preparaciones entéricas y no entéricas seleccionadas para evitar la formación de primer paso oral del metabolito altamente cardioactivo, 3-hidroxi anagrelida, y ofrece un enfoque seguro y radicalmente nuevo para el tratamiento del cáncer de origen muy diferente.

A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta especificación, las palabras "comprende" y "contiene" y las variaciones de las palabras, por ejemplo "que comprende" y "comprende", significan "que incluyen pero no se limitan a", y no se pretende excluir (y no se excluyen) otras porciones, aditivos, componentes, enteros o etapas.

A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta especificación, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera otra cosa. En particular, donde se use el artículo indefinido, la descripción se entiende que contempla pluralidad así como singularidad, a menos que el contexto requiera otra cosa.

Los rasgos, enteros, características, compuestos, porciones químicas o grupos descritos en conjunto con un aspecto particular, modalidad o ejemplo de la invención se entiende que son aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente descripción a menos que sea incompatible con éste.

40 Composiciones farmacéuticas de la invención

La alta potencia inherente a la anagrelida como agente reductor de plaquetas - reflejada por los fármacos *in vitro* la IC50 antimegacariocítica de solo 26 nM = 7 ng/ml y una dosificación baja de la formulación empleada actualmente (dosis unitaria de 0,5 mg) se presta idealmente a vías de administración "de baja carga" que permiten minimizar la generación de primer paso hepática del metabolito altamente cardioactivo 3 -hidroxi anagrelida (IC50 0,7 nM). Los métodos de suministro de fármacos establecidos y las formulaciones están disponibles para facilitar esto.

Formulaciones entéricas

50 Suministro oral/sublingual - La mucosa oral que comprende la mejilla interna, el área sublingual (debajo de la lengua), el área gingival (las encías) y finalmente el área palatina (techo de la boca) ofrece el potencial de suministrar algo si no toda la medicación directamente en la circulación sistémica para minimizar así la generación de primer paso hepática del metabolito cardioactivo de anagrelida.

55 Tabletas orales - sublinguales. Las tabletas sublinguales de anagrelida pueden ser de varios diseños diferentes. Una de tales formulaciones puede ser similar a la usada con las tabletas sublinguales Prefibin®/Subutex® (buprenorfina). Los excipientes típicos en tales tabletas incluyen ácido cítrico, monohidrato de lactosa anhidra, manitol, citrato de sodio, estearil fumarato de sodio, almidón pregelatinizado (maíz). La tableta se coloca debajo de la lengua hasta que se disuelva.

60 Atomizador oral Se puede preparar una formulación de atomización oral para cualquiera de varios diseños. Uno de estos diseños puede ser similar a Subsys®, un atomizador oral de fentanilo. La droga se disuelve en alcohol deshidratado 63,6 %, agua purificada, propilenglicol, xilitol y L-mentol. Una sola activación administra una atomización de 100 µl que contiene una dosis adecuada del fármaco. Otro atomizador oromucosal es el que se usa en Sativex®, un producto de tetrahidocannabinol/cannabidiol. Aquí el dispositivo atomizador usa un propulsor gaseoso que es dióxido de carbono líquido que contiene 40 mg de etanol/100 µl de atomización.

- 5 Comprimidos orales mucoadhesivos. Las tabletas orales de anagrelida pueden hacerse de varias maneras. Un ejemplo de este tipo de formulación se encuentra en las tabletas orales de proclorperazina (Buccastem®). Aquí la tableta se coloca en la encía debajo del labio superior de cada lado de la boca. El mucoadhesivo asegura que la tableta permanezca *in situ* y se disuelva durante un período de las siguientes 1-2 h. Los excipientes típicos incluyen azúcar comprimible, povidona K30, goma de xantano, goma de algarrobbilla, talco, estearato de magnesio y riboflavina fosfato de sodio.
- 10 Películas orales mucoadhesivas Las películas finas de anagrelida que se disuelven por sí mismas las cuales se adhieren al interior de la mejilla pueden hacerse de acuerdo con varios diseños diferentes. Uno de estos diseños puede parecerse al que se usó para Breakyl® (fentanilo). Breakyl® es una película oral soluble rectangular, plana, flexible con un lado que se adhiere al interior de la mejilla y el otro se diseñó para minimizar la liberación del fármaco en la saliva y la pérdida del fármaco al tragar. Se prevén parches de diferente intensidad del fármaco y varían en tamaño desde 0,8 cm² a 2,4 cm².
- 15 Pastillas orales/piruleta Una vez más estos pueden ser de varios diseños pero en esencia son preparaciones de terrones de azúcar dura que contienen la droga idealmente en este caso a un pH de ~3 en el que el fármaco es significativamente más soluble en agua que a pH 7 (250 µg/ml frente a ~1,0 µg/ml). Dichas pastillas se pueden montar en un palito de plástico corto análogo al de la formulación de fentanilo piruleta Actiq®. Los excipientes típicos incluyen dextratos hidratados, ácido cítrico, fosfato de sodio dibásico, aromatizantes de bayas artificiales, estearato de magnesio y pegamento comestible (almidón modificado para alimentos y azúcar glas).
- 20 Formulación rectal. La administración rectal reduce la extensión del metabolismo de primer paso al permitir que el fármaco se absorba por las venas hemorroidales inferiores y medias que drenan directamente en el riego sanguíneo sistémico.
- 25 Supositorios rectales. Las formulaciones de supositorios utilizan frecuentemente cera fundible por ejemplo Witepsol H14 o 45 o manteca de cacao y cera blanca. Un diseño alternativo de formulación rectal implica encapsular una solución del fármaco en una cápsula de gelatina blanda con forma de supositorio. Una vez insertada en el recto, la cubierta de gelatina se disuelve y libera la disolución del fármaco para su absorción. Una formulación de supositorio prototípico de anagrelida puede basarse en la de los supositorios de prometazina que contienen 12,5 mg o 25 mg de prometazina HCl con palmitato de ascorbilo, dióxido de silicio, cera blanca y manteca de cacao.
- 30 Los geles rectales de anagrelida pueden hacerse a varios diseños diferentes. Un gel rectal de anagrelida puede, por ejemplo, parecerse al que se usó para el diazepam como Diastat Acudial®, un gel de diazepam no estéril provisto en una dosis unitaria, precargada, con un aplicador para la instilación rectal directa. El gel rectal de diazepam contiene el fármaco junto con propilenglicol, alcohol etílico (10 %), hidroxipropilmetilcelulosa, benzoato de sodio, alcohol bencílico (1,5 %), ácido benzoico y agua.
- 35 Formulaciones no entéricas (parenterales) Estas vías de administración volverían a minimizar o incluso evitar por completo la generación hepática del metabolito cardioactivo altamente potente de la anagrelida. Las descripciones genéricas de las diversas formulaciones se encuentran fácilmente en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22^a Edición, 2012.
- 40 Atomizador nasal Un atomizador nasal de anagrelida puede formularse de manera comparable a la utilizada para la desmopresina (atomizador nasal Stimat^(R)). Una disolución/suspensión acuosa del fármaco está contenida dentro de un depósito de plástico de 10 ml debajo de una bomba accionada por teclas. Cada activación suministra 100 µl de atomización en cada orificio nasal, lo que proporciona la dosis requerida del fármaco. Alternativamente se puede preparar anagrelida para suministro nasal de una manera similar a la del midazolam. Típicamente este usa una disolución del fármaco en agua/propilenglicol concentrada de pH 4.0 extraído en una jeringuilla a la que luego se une un dispositivo de atomización de la mucosa intranasal por ejemplo LMA® MAD NASAL™. Cada atomizador suministra ~100 µl de disolución y en este caso dos activaciones en cada orificio nasal dan la cantidad necesaria del fármaco. El uso de este medio de administración aumentó la biodisponibilidad de midazolam a esta dosis de ~30 % cuando se administra oralmente al 87 % (Bjorkman y otros 1997).
- 45 Suministro pulmonar Si bien tradicionalmente se asocia con la terapia local en el tratamiento de afecciones como el asma bronquial, la administración intrapulmonar de fármacos ofrece una vía potencialmente valiosa de suministro sistémico. De hecho la inhalación de humo de cigarrillo o más recientemente el uso de varios productos de nicotina llamados "vapeo" presentan una forma novedosa de suministro sistémico. El uso de un dispositivo de vapeo ofrece un método fácil de formular un fármaco para dicho suministro. Para más detalles, consulte "Dispositivo de vapeo electrónico y sus componentes" en WO 2015131058 A1. Alternativamente el propulsor o inhalador de polvo seco tradicional ofrece un medio de suministro directo a la circulación sistémica y evita el metabolismo de primer paso. Los detalles del diseño del inhalador de dosis fija tradicional pueden encontrarse en "Inhalador de dosis fija para albuterol" US 6131566 A.
- 50 Suministro tópico También se contempla dentro del alcance de esta invención una formulación tópica de anagrelida que se absorbería a través de la piel y de nuevo evitaría el metabolismo de primer paso. Dichas formulaciones pueden incluir parches transdérmicos autoadhesivos de tipos reservorio o matriz. Una formulación de parche transdérmico de anagrelida puede prepararse de manera similar a la de la buprenorfina (BUTRANS®) o rotigotina (Neupro®).
- 55
- 60
- 65

- inyección - Las formulaciones alternativas cardiopreservadoras serían aquellas que usan las vías de administración intravenosa, intramuscular o subcutánea donde el fármaco puede administrarse como preparaciones de liberación inmediata y sostenida. En el último caso estos abarcarían formas de dosificación que liberan el fármaco durante un período de tiempo predeterminado una vez administrado. Estos incluirían el uso de implantes intradérmicos o la inyección intramuscular de formulaciones de depósito. Para formulaciones de depósito intramuscular estas podrían incluir cualquiera de los diversos enfoques para dicho suministro tales como control de disolución, control de absorción, control de encapsulación, disolución en un vehículo adecuadamente viscoso u oleoso. Los implantes incluirían cualquier cantidad de tipos de dispositivos basados en el uso de varillas Silastic® (elastómeros de silicona) así como aquellos que usan otros materiales poliméricos.
- Facilitar la solubilidad acuosa mejorada. Entre pH 4-8 la solubilidad acuosa de la anagrelida es solo ~1,0 µg/ml. Por lo tanto la anagrelida se clasificaría como un fármaco de baja solubilidad/alta permeabilidad bajo el Sistema de Clasificación de Biofarmacéutica de la FDA.
- La solubilidad y por lo tanto la absorción pueden facilitarse de nuevo mediante el uso de diversos potenciadores de penetración que son bien conocidos en la técnica. Estos incluirían tensoactivos, tanto aniónicos y catiónicos como no iónicos, ácidos grasos y derivados que incluyen ácido oleico y ácido caprílico, sales biliares, polioles como propilenglicol (véase Dodla y Velmurugan, 2013).
- Todas las formulaciones mencionadas pueden beneficiarse del uso de un fármaco micronizado (< 100 (micras) µm o más idealmente < 10 µm) o material nanoparticulado (generalmente < 0.1 µm) para aumentar el área de superficie y por lo tanto la velocidad de disolución y así facilitar la absorción. La preparación de dicho material de tamaño reducido de partículas es bien conocida por aquellos familiarizados con la técnica pero es ampliamente descrita por Joshi JT (2011) en "A review of micronization techniques" y también en "Drug delivery nanoparticles; formulation and characterization" por Pathak y Thassu (2009).
- Un medio adicional para aumentar la solubilidad acuosa de la anagrelida (y compuestos relacionados) sería mediante el uso de complejos reversibles con ciclodextrinas β. (Ver Rasheed y otros, 2008).
- Para aquellas formulaciones de anagrelida donde es posible ajustar el pH, es deseable el uso de pH ligeramente ácido < 4 ya que esto aumenta notablemente la solubilidad acuosa del fármaco. Por ejemplo la solubilidad acuosa de la anagrelida a pH 1 es 236 µg/ml. (ver http://www.shirecanada.com/en/documents/AGRYLIN_PM_EN.pdf)
- La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un ingrediente farmacéutico activo, o un derivado farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, una sal o un solvato) de este, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En particular, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de anagrelida (o un metabolito activo adecuado) con eficacia terapéutica y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- El fármaco que se emplea en la presente invención puede usarse en combinación con otras terapias y/o agentes activos. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto útil en la práctica de la presente invención, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de esta, un segundo agente activo, y, opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Cuando se combinan en la misma formulación se apreciará que los dos compuestos son preferentemente estables en presencia de, y compatibles entre sí y con los otros componentes de la formulación. Cuando se formulan por separado se pueden proporcionar en cualquier formulación conveniente, de la manera que se conoce en la técnica para tales compuestos.
- Las formulaciones pueden presentarse para su uso con la ayuda de uno o más vehículos adecuados. Los vehículos aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 22ª edición 2012. La elección del vehículo farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, además de, el vehículo cualquier aglutinante(s) adecuado, lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento y/o agente(s) solubilizante(s).
- En la composición farmacéutica pueden proporcionarse conservantes, estabilizadores, tintes e incluso agentes saborizantes. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También pueden usarse antioxidantes y agentes de suspensión.
- Los compuestos usados en la invención pueden molerse mediante el uso de procedimientos de molienda conocidos tales como la molienda húmeda para obtener un tamaño de partícula adecuado para la formación de tabletas y para otros tipos de formulación. Las preparaciones finamente divididas de los compuestos pueden prepararse mediante otros procesos conocidos en la técnica, por ejemplo véase la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 02/00196 (SmithKline Beecham) e incluiría la micronización, así como el uso de material nanoparticulado.

Los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente invención están destinados a administrarse entéricamente (pero solo mediante el uso de los extremos proximal (mucosa oral) y distal [recto] del tracto GI) o parenteralmente. Para uso entérico la preparación puede comprender una tableta sublingual, tableta oral mucoadhesiva, atomizador oromucosal, pastilla dura, pastilla de piruleta en un palito, supositorio o un gel o suspensión rectal. Para el suministro no entérico, un
 5 atomizador nasal, un dispositivo de suministro pulmonar, un dispositivo de vapeo o una preparación de premezcla para inyección, óvulo, disolución, suspensión, dispersión, gel, o formulaciones de implantes/depósitos. Las composiciones sólidas y líquidas pueden prepararse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Dichas composiciones también pueden contener uno o más vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden estar en forma sólida o líquida.

10 Las dispersiones pueden prepararse en un vehículo líquido o intermediario, como glicerina, polietilenglicoles líquidos, aceites de triacetina, y mezclas de estos. El vehículo líquido o intermediario puede ser un disolvente o medio dispersivo líquido que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerina, propilenglicol o similares), aceites vegetales, ésteres de glicerina y mezclas adecuadas de estos. Debe mantenerse la fluidez adecuada mediante la administración de un tamaño de partícula adecuado en el caso de dispersiones, o mediante la adición de tensoactivos.

15 Las formulaciones oromucosales pueden contener excipientes como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, desintegrantes como almidón (preferentemente almidón de maíz, papa o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y acacia.

20 Además, se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, gliceril behenato y talco.

25 Los ejemplos de desintegrantes farmacéuticamente aceptables para composiciones oromucosales útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, almidón, almidón pregelatinizado, glicolato sódico de almidón, carboximetilcelulosa de sodio, croscarmelosa de sodio, celulosa microcristalina, alginatos, resinas, tensoactivos, composiciones efervescentes, silicatos de aluminio acuosos y polivinilpirrolidona reticulada.

30 Los ejemplos de aglutinantes farmacéuticamente aceptables para composiciones oromucosales útiles en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, acacia; derivados de celulosa, tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxietilcelulosa; gelatina, glucosa, dextrosa, xilitol, polimetacrilatos, polivinilpirrolidona, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, tragacanto, resina de xantano, alginatos, silicato de aluminio y magnesio, polietilenglicol o bentonita.

35 Los ejemplos de rellenos farmacéuticamente aceptables para composiciones oromucosales útiles en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, lactosa, anhidrolactosa, monohidrato de lactosa, sacarosa, dextrosa, manitol, sorbitol, almidón, celulosa (particularmente celulosa microcristalina), fosfato dihidro o anhidrocálcico, carbonato de calcio y sulfato de calcio.

40 Los ejemplos de lubricantes farmacéuticamente aceptables útiles en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol, polímeros de óxido de etileno, laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de magnesio, oleato de sodio, estearilfumarato de sodio, y dióxido de silicio coloidal.

45 Los ejemplos de odorantes farmacéuticamente aceptables adecuados para las composiciones oromucosales incluyen, pero no se limitan a, aromas sintéticos y aceites aromáticos naturales tales como extractos de aceites, flores, frutas (por ejemplo, plátano, manzana, cereza agria, melocotón) y combinaciones de estas, y aromas similares. Su uso depende de muchos factores, el más importante es la aceptabilidad organoléptica para la población que tomará las composiciones farmacéuticas.

50 Los ejemplos de colorantes farmacéuticamente aceptables adecuados para las composiciones oromucosales incluyen, pero no se limitan a, colorantes sintéticos y naturales tales como dióxido de titanio, beta caroteno y extractos de cáscara de pomelo.

55 Los ejemplos de recubrimientos farmacéuticamente aceptables útiles para composiciones oromucosales, para modificar las propiedades de liberación, mejorar la apariencia y/o enmascarar el sabor de las composiciones incluyen, pero no se limitan a, copolímeros de hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y acrilato-metacrilato.

60 Los ejemplos adecuados de edulcorantes farmacéuticamente aceptables para composiciones oromucosales incluyen, pero no se limitan a, aspartamo, sacarina, sacarina de sodio, ciclamato de sodio, xilitol, manitol, sorbitol, lactosa y sacarosa.

65 Los ejemplos adecuados de tampones farmacéuticamente aceptables útiles en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, ácido cítrico, citrato de sodio, bicarbonato de sodio, fosfato de sodio dibásico, óxido de magnesio, carbonato de calcio e hidróxido de magnesio.

Los ejemplos adecuados de tensoactivos farmacéuticamente aceptables útiles en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, laurilsulfato de sodio y polisorbatos.

5 Los ejemplos adecuados de conservantes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, diversos agentes antibacterianos y antifúngicos tales como disolventes, por ejemplo etanol, propilenglicol, alcohol bencílico, clorobutanol, sales de amonio cuaternario y parabenos (como metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, etc.).

10 Los ejemplos adecuados de estabilizantes y antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), tiourea, tocoferol y butilhidroxianisol.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener del 0,01 al 99 % en peso por volumen de los fármacos que abarca la presente invención.

Dosificaciones

15 Las dosis que se refieren en toda la especificación se refieren a la cantidad de equivalentes de base libre de la anagrelida o un metabolito activo adecuado, a menos que se especifique lo contrario.

20 Los pacientes adecuados para ser tratados de acuerdo con la invención incluyen cualquier ser humano que necesite tratamiento pero particularmente aquellos pacientes con cáncer que presentan trombocitosis. Se conocen bien en la técnica los métodos para el diagnóstico y evaluación clínica de varios cánceres, que incluyen la gravedad de tales afecciones experimentadas por seres humanos. Por lo tanto, dentro de la habilidad del profesional ordinario en la técnica (por ejemplo, un médico/oncólogo) está determinar si un paciente necesita tratamiento.

25 Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual con respecto a la reducción en el número de plaquetas. El nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier individuo en particular pueden variar y dependerán de una variedad de factores tales como la vía de administración, la edad, el peso corporal, la salud general del individuo que se somete a la terapia, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular (y críticamente el conteo inicial de plaquetas y la tasa de cambio del conteo de plaquetas en ese individuo).

El conteo final de plaquetas deseado debe estar en el rango de $150-400 \times 10^3/\mu\text{l}$ de sangre.

35 Idealmente, el conteo de plaquetas se reducirá a un límite superior de $350 \times 10^3/\mu\text{l}$ pero por encima de un límite inferior de $150 \times 10^3/\mu\text{l}$.

Más idealmente el conteo de plaquetas se reducirá a un límite superior de $300 \times 10^3/\mu\text{l}$ pero por encima de un límite inferior de $150 \times 10^3/\mu\text{l}$.

40 Lo más ideal es que el conteo de plaquetas se reduzca a un límite superior de $250 \times 10^3/\mu\text{l}$ pero por encima de un límite inferior de $150 \times 10^3/\mu\text{l}$.

45 Las formulaciones de dosis cardiopreservadoras que se proponen en la presente descripción son diferentes de las formulaciones comerciales actuales de anagrelida y están diseñadas para reducir la generación de primer paso del metabolito cardioactivo y como consecuencia los efectos cardiovasculares adversos. Si bien es probable que las dosis sean más bajas lo que se debe a las mejoras potenciales en la disponibilidad sistémica del fármaco, la reducción de los efectos secundarios cardiovasculares, que hasta ahora pueden ser limitantes de la dosis, puede permitir el uso de dosis más altas cuando se requiera.

50 Sin embargo típicamente en el contexto clínico generalmente se espera que dosis de menos de la mitad de la dosis típica actual de 2-3 mg diarios orales de anagrelida sea efectiva para reducir el conteo de plaquetas y como consecuencia, sea eficaz para minimizar el riesgo de progresión del cáncer en pacientes con cáncer trombocitótico. Las dosis pueden ajustarse diariamente, semanalmente o mensualmente en dependencia del grado de trombocitosis, como se definió por el conteo de plaquetas, observado.

55 Típicamente, es probable que la anagrelida se administre dos veces al día. De manera que puede ser necesario administrar el fármaco con menos frecuencia o de forma discontinua en dependencia del conteo de plaquetas observado y el tipo de formulación usada. Será necesario considerar la frecuencia de dosificación y la posible necesidad de dosificación discontinua en dependencia de la gravedad de la trombocitosis observada. Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual.

60 Las formulaciones de anagrelida previstas en esta invención pueden administrarse junto con otras terapias y/o en combinación con otros agentes activos. Por ejemplo, los productos farmacológicos que abarca la presente invención pueden administrarse a un paciente en conjunto con otros agentes activos usados en el manejo de la afección. Esto puede incluir fármacos modificadores de la enfermedad, como inhibidores de factores de crecimiento o citocinas, agentes quimioterapéuticos y/o remedios paliativos para el dolor. Un agente activo que se administrará en conjunto con los

fármacos que abarca la presente invención puede incluir pero no exclusivamente, un fármaco que se seleccionó del grupo que comprende agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, antiandrógenos, antiestrógenos, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores mitóticos, agentes antiangiogénicos, inhibidores de tirosina cinasa, inmunoterapias que incluyen inhibidores de "punto de control" corticosteroides y diversos agentes quimioterapéuticos. Además los pacientes pueden recibir fármacos antiagregantes (agentes antiplaquetarios) como aspirina, clopidogrel, prasugrel, dipiridamol, etc. Para aliviar el dolor los pacientes también pueden recibir analgésicos, tanto opioides como no opioides, para controlar el dolor. En tales terapias conjuntas los fármacos que abarca la presente invención pueden administrarse antes de, concurrentemente con, o después de la otra terapia y/o agente activo. Las dosis adecuadas de estas medicaciones conjuntas se determinarán según su potencia y la gravedad de la enfermedad.

Cuando los productos farmacológicos que abarca la presente invención se administran junto con otro agente activo, los componentes individuales de tales combinaciones pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente en formulaciones farmacéuticas separadas o conjuntas por cualquier vía conveniente. Cuando la administración es secuencial, los productos farmacológicos que abarcan la presente invención o el segundo agente activo pueden administrarse primero. Por ejemplo, en el caso de una terapia conjunta con otro agente activo, los productos farmacológicos que abarca la presente invención pueden administrarse de manera secuencial en un régimen que proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos. Cuando la administración es simultánea, la combinación puede administrarse en la misma o diferente composición farmacéutica. Por ejemplo, un fármaco que abarca la presente invención y otro agente activo pueden administrarse de manera sustancialmente simultánea, en una proporción fija de estos agentes, o en múltiples formas de dosificación separadas para cada agente.

Cuando los fármacos de la presente invención se usan en conjunto con otro agente activo en los métodos para tratar diferentes cánceres, la dosis de cada compuesto puede diferir de la que se usa cuando el compuesto se usa solo. Las dosis adecuadas se comprenderán fácilmente por aquellos con experiencia en la técnica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Demostración de los efectos inhibitorios de la anagrelida sobre la expansión de megacariocitos mediada por células cancerosas.

Procedimientos experimentales:

Fármacos - El clorhidrato de anagrelida se adquirió de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido). Se preparó una disolución madre en DMSO, se almacenó en alícuotas a -20 °C y cuando se requirió se diluyó en medio de cultivo inmediatamente antes de los experimentos.

Células y tratamiento farmacológico - Los megacariocitos (MK) se generaron esencialmente ex vivo como se describió anteriormente (Ahluwalia M y otros 2010). En resumen, para promover la diferenciación megacariocítica terminal se cultivaron la CD34 derivada de la sangre de cordón umbilical humano preexpandida + células hematopoyéticas durante 7 días en medio Stemspan™ SFEM II (Stem Cell Technologies) que se suplementó con plasma sanguíneo de cordón umbilical humano al 1 % y trombopoyetina (TPO) 40 ng/ml a menos que se indique lo contrario (medio MK). Cuando se requirió, se añadió anagrelida (1 µM) o una cantidad equivalente de vehículo al comienzo del período de diferenciación.

La línea celular de cáncer de ovario humano COV362 se cultivó en medio Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) suplementado con glutamina 2 mM y suero fetal bovino al 10% (FBS). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO2 5 %/aire 95 %.

Experimentos de cultivo conjunto - El cultivo conjunto de células COV362 (COV) y MK en desarrollo se llevó a cabo en una cámara Boyden modificada (BD Falcon, BD Biosciences, Oxford, Reino Unido) que consiste en un inserto de cultivo celular en forma de copa que descansa dentro del pocillo de una placa complementaria de 24 pocillos, con la parte inferior del inserto hecha de una membrana permeable microporosa de tereftalato de polietileno (PET) que tiene un tamaño de poro de 0,4 µm.

En experimentos que examinaron los efectos de los COV sobre el desarrollo de MK, los COV se sembraron en la placa complementaria a varias densidades de células y se cultivaron durante 4 días antes de montar los insertos. Después, el medio en la placa complementaria se retiró y se reemplazó con medio MK nuevo. Inmediatamente después las células hematopoyéticas preexpandidas se sembraron en el inserto. Después de siete días de cultivo conjunto las células que crecían en los insertos se recogieron para analizar el desarrollo de MK.

Análisis del desarrollo de megacariocitos - Se determinó la densidad celular mediante el uso de un contador Casy TT Cell (Innovatis, Alemania) y se configuró con un límite de corte inferior de ~7,5 µm. La expresión del antígeno específico de MK se controló por citometría de flujo mediante el uso de un anticuerpo anti-CD61 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (clon YY2/51, Dako, Ely, Reino Unido) como se describió previamente (Wang G y otros 2005). El número de MK se calculó tras multiplicar el número total de células en el cultivo por la fracción de células CD61 positivas.

Resultados (Ver Figura 1) - En ausencia de COV, se demostró claramente la expansión de MK promovida por trombopoyetina que en presencia de anagrelida (1 μ M), como se esperaba de los datos que se informaron previamente, se inhibió por ~50 %. En presencia de COV (cultivados a 1,000 células/ml) los números de MK aumentaron en un notable 148 % y en casi 160 % con un mayor número de COV (cultivados a 3000 células/ml). La adición de anagrelida (1 μ M) redujo sustancialmente el aumento en la expansión de MK visto en presencia de COV. En el caso de 1,000 células/ml los efectos estimulantes de los COV se abolieron por completo mientras que con 3,000 células/ml el aumento que se espera sea más que la mitad.

Discusión - Estos resultados demuestran inequívocamente un efecto directo de las células cancerosas en la estimulación de la expansión de megacariocitos y por lo tanto en la producción de plaquetas. En el presente estudio el tamaño de poro de la membrana que separa los OVC y MK impidió el movimiento físico de los primeros y por lo tanto el efecto que se observa se debe a un liberador de quimiocinas COV de algún tipo. Se conoce que las plaquetas juegan un papel clave en el desarrollo y progresión del cáncer a través de sus factores de crecimiento. Antes se consideraba generalmente el papel de las células cancerosas en la expansión de los megacariocitos como un proceso indirecto a través de la liberación de citocinas (interleucinas, particularmente IL-6, véase Davis y otros 2014) de las células cancerosas y la posterior estimulación del hígado para producir trombopoyetina que a su vez acelera la producción de megacariocitos/plaquetas, lo que estimula aún más el crecimiento de las células cancerosas en lo que se ha descrito como un círculo vicioso o ciclo patogénico. El estudio actual demuestra que las secreciones de las células cancerosas son capaces de estimular directamente la expansión de megacariocitos. Importantemente este estudio demuestra que incluso en presencia de tales efectos estimulantes de las células cancerosas, la anagrelida aún puede inhibir profundamente este efecto. Esta propiedad recién descubierta de la anagrelida brinda la oportunidad de reducir la expansión de MK en respuesta a las células cancerosas y por lo tanto la progresión y el desarrollo de la enfermedad.

Ejemplo 2: Demostración de los efectos inhibitorios de la anagrelida en la migración de células cancerosas a megacariocitos

Ensayo de transmigración - La transmigración de células de cáncer de ovario humano, células COV362 (COV), se examinó en un modelo bien establecido de migración de células cancerosas (Hart y otros 2005 y Kramer y otros 2013) que empleó la cámara Boyden modificada descrita anteriormente pero que usó insertos con una membrana de PET más grande con poro de 8 μ m. Este tamaño de poro permitió a las células cancerosas moverse a través de la sección inferior de la cámara en respuesta a las propiedades de atracción que muestran los megacariocitos por debajo. En este caso se cultivaron células hematopoyéticas preexpandidas durante 7 días en medio MK en los pocillos de la placa complementaria antes de la colocación de los insertos. Después se colocaron los insertos dentro de estos pocillos que contienen MK o en pocillos paralelos que se rellenaron con un volumen equivalente de medio MK solo. Una suspensión de 0,35 ml de células COV producidas en medio MK sin plasma a una densidad de $2,86 \times 10^5$ células/ml se cargó después en los insertos y se dejó transmigrar a través de la membrana de PET hasta 24 h a 37 °C en una incubadora de cultivo de tejidos. En varios momentos se terminó el ensayo de transmigración tras retirar el inserto del pocillo de la placa complementaria y aspirar su contenido. Después de lavar los insertos con tampón fosfato salino (PBS) las células que no migraron unidas al lado superior de la membrana de PET se rasparon con hisopos de algodón empapados en PBS. Las células que migraron en la parte inferior de la membrana de PET se tiñeron con violeta cristal al 0,5 % en metanol al 25 %. Se tomaron fotomicrografías digitales de campo brillante en cinco campos aleatorios con un aumento de 100 x y se determinó el número promedio de células por campo mediante conteo manual.

Resultados (Véanse las Figuras 2, 3 y 4) - En el estudio actual se mostró una migración extensa de COV hacia los cultivos de MK contenidos en la sección inferior de la cámara Boyden modificada lo que demuestra una característica quimioatrayente de MK para COV en este modelo. En ausencia de MK, la migración de COV fue mucho más lenta lo que refleja propiedades atrayentes muy modestas del medio que contiene plasma que se adicionó a la sección inferior de la cámara en las incubadoras de control. Este comportamiento atrayente de los MK con respecto a los COV se demostró claramente que dependía del tiempo (Figura 2). Sorprendentemente se encontró que la adición de cultivos MK que se cultivaron en presencia de anagrelida (1 μ M) no tenía propiedades atrayentes para los COV (Figura 3). La pérdida de propiedades atrayentes también se manifestó cuando las MK se cultivaron a concentraciones clínicamente relevantes del fármaco (Figura 4).

Discusión - Como modelo para el comportamiento de las células cancerosas que migran a los depósitos de megacariocitos en hueso, y pulmón - y por lo tanto el potencial para establecer metástasis en estos lugares - los datos que se generan en este estudio proporcionan información invaluable sobre los posibles efectos beneficiosos de la anagrelida en la inhibición de este proceso. Las primeras células encontradas al ingresar las células cancerosas en la médula ósea son los megacariocitos y los datos del estudio actual demuestran inequívocamente- y sorprendentemente - un comportamiento atrayente positivo de MK para las células de cáncer de ovario. La naturaleza de esta interacción de unión es probablemente compleja e involucra múltiples procesos que pueden ser similares a los que se informaron para las interacciones entre células tumorales y plaquetas (Erpenbeck y Schon 2010). Además, esta propiedad atrayente de los megacariocitos para las células cancerosas es la que probablemente desempeñe un papel clave en el establecimiento de la enfermedad metastásica. En este contexto, la anagrelida ofrece el gran potencial de alterar profundamente el curso de la enfermedad metastásica.

Ejemplo 3: Demostración de la capacidad de la anagrelida para reducir los factores de crecimiento de células cancerosas derivados de plaquetas factor 4 de plaquetas y factor de crecimiento endotelial vascular (después de Cacciola y otros 2004)

5 En este estudio se reclutaron trece pacientes (ocho hombres y cinco mujeres con una edad promedio de 53 años) con trombocitemia esencial -ET (duración promedio de la enfermedad 4 años). Cuatro pacientes recibieron hidroxiurea (HU) 1,25 g/día, tres pacientes interferón alfa (IFN- α) 1,5 x 10⁶ unidades/día, y seis anagrelida (A) 1,5 mg/día. Diez sujetos sanos sirvieron como controles.

10 Se midieron PF4 y VEGF mediante un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (Boehringer-Mannheim, Alemania). Las plaquetas se determinaron en un Sysmex XE-213000 (Dasit, Italia).

15 Antes del tratamiento todos los pacientes tenían un conteo de plaquetas alto 1045 +/- 207 x 10³/ μ l y mayores PF4 y VEGF (niveles (137 +/- 63 UI/ml y 1,5 +/- 0,7 pg/ml que los controles 2,1 +/- 1,5 IU/ml y 0,2 +/- 0,08 pg/ml).

Después del tratamiento los pacientes tenían un conteo medio de plaquetas de 400 +/- 62 x 10³/ μ l. Ni HU ni IF α redujeron PF4 y VEGF y curiosamente solo el tratamiento con anagrelida redujo los niveles de PF4 y VEGF a la normalidad lo que sugiere que solo la anagrelida induce la normalización de la función plaquetaria.

20 Si bien este estudio se realizó con respecto a la investigación de los efectos de estos fármacos en pacientes con ET, el papel que se comprende ahora de estos dos factores de crecimiento en el crecimiento de células cancerosas y la angiogénesis tumoral coloca en un nuevo contexto el significado de estos datos. De los tratamientos más utilizados para la disminución de las plaquetas (en ET) es probable que solo la anagrelida disminuya los niveles plasmáticos circulantes de estos dos factores de crecimiento importantes y por lo tanto tenga un efecto terapéutico positivo en el desarrollo de células cancerosas y tumores.

Ejemplo 4: Estimación de las dosis de anagrelida requeridas para efectuar la reducción de las plaquetas y minimizar el riesgo cardiovascular

30 La dosificación propuesta de las formulaciones cardiopreservadoras descritas en la presente descripción puede ser diferente de las formulaciones comerciales actuales como resultado de la mejora en la disponibilidad sistémica y la reducción de los efectos cardiovasculares adversos. Si bien es probable que las dosis sean más bajas lo que se debe a mejoras potenciales en la disponibilidad sistémica del fármaco, la reducción de los efectos secundarios cardiovasculares, que hasta ahora puede tener una limitación de la dosis, puede permitir el uso de dosis más altas en casos refractarios. La siguiente determinación ofrece información útil.

40 Los efectos cardiovasculares altamente inconvenientes de la anagrelida se deben a la formación de primer paso de 3-hidroxi anagrelida y a la profunda diferencia en los respectivos valores de IC₅₀ de este metabolito en comparación con el fármaco con respecto a la inhibición de la PDE III - (el mecanismo por el cual se provocan estos efectos). Para el metabolito esto es solo 0,7 nM (0,2 ng/ml) pero para el fármaco 32 nM (8,2ng/ml).

45 Después de una dosis clínica típica de 1 mg los niveles plasmáticos máximos del metabolito son 29 nM (~8 ng/ml) unas 40 veces mayor que su IC₅₀ inhibitorio de PDE III *in vitro*. Incluso si se permite cualquier unión tisular no específica *in vivo* es probable que esto supere en gran medida el IC₅₀. Por el contrario los niveles plasmáticos máximos de anagrelida son solo de 16 nM (~4 ng/ml) solo el 50% de su IC₅₀ inhibitorio de PDE III *in vitro*. Dada la probable unión tisular no específica *in vivo* es poco probable que esto tenga un gran efecto *in vivo*. Por lo tanto como es evidente, es probable que este metabolito sea el contribuyente abrumador a los efectos cardiovasculares del fármaco.

50 Es probable que el uso de cualquiera de las formulaciones de preservación cardíaca propuestas aumente sustancialmente la disponibilidad sistémica de anagrelida y por lo tanto reduzca drásticamente el metabolito cardiotoxico que se genera mediante primer paso. En el mejor de los casos la biodisponibilidad de anagrelida después de la dosificación intravenosa es, por definición 100 % sin generación de primer paso de este metabolito. Con las otras estrategias de formulación propuestas en la presente descripción, el precedente histórico predice aumentos probables en las biodisponibilidades de anagrelida a > 75 % y por lo tanto una reducción drástica en el metabolito que se genera en el primer paso. Cuando se tiene en cuenta la magnitud de la diferencia de potencia cardiovascular entre este metabolito y el fármaco original dicha reducción en la generación del primer metabolito se vuelve mucho más profunda y la carga de los efectos CV es mucho menor.

60 Este cálculo ilustra el valor potencial de reducir la exposición al metabolito para minimizar los efectos cardiovasculares no deseados.

Ejemplo 5: Preparación de tabletas orales de anagrelida

65 Las tabletas orales de anagrelida se pueden preparar de varias maneras diferentes. Un enfoque sería similar al que se utiliza para el suministro transmucosal de glibenclamida, otro compuesto BCS clase II, de solubilidad en agua similar que se administra a un nivel de dosis similar (Sarfarez y otros 2011). Las tabletas orales mucoadhesivas de anagrelida pueden

5 prepararse por el método de compresión directa mediante el uso de polímeros bioadhesivos como Carbopol 934P, HPMC K4M y NaCMC. Un diseño preferido de tableta oral de anagrelida tiene la siguiente composición:- anagrelida micronizada (< 10 µm) que carga 0,25-2,5 mg, Carbopol-934P 46 mg, HPMC 46 mg, manitol 94 mg, estearato de magnesio 2 mg, talco 2 mg. Se espera que esta preparación tenga una resistencia bioadhesiva del orden de ~3,5 g. El pH superficial probable general de ~7 presenta un riesgo mínimo de daño mucosal mientras que dicho valor de resistencia bioadhesiva indica buena adhesividad a la mucosa oral.

Ejemplo 6: Preparación de la formulación de liberación lenta de película delgada oral de anagrelida

10 Las formulaciones de película delgada oral de anagrelida se pueden preparar de varias maneras diferentes. Una estrategia de formulación puede ser similar a las utilizadas para el suministro transmucosal de glibenclámda, otro compuesto de BCS clase II que se administra a un nivel de dosis similar (Bahri-Najafi R y otros 2014). Las formulaciones orales de película delgada autodisolvibles tienen la ventaja de una mejor conformidad del paciente que se debe a la facilidad de administración. Las películas orales mucoadhesivas de anagrelida micronizada pueden prepararse mediante el uso de polímeros de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) K4M, K15M o Eudragit RL100 y propilenglicol como plastificante y disolvente conjunto. Las películas se preparan mediante el uso del método de fundición con disolvente. Aquellos que usan Eudragit RL100 son los más preferidos ya que tienden a ser transparentes, uniformes, flexibles y evitar recintos de burbujas. La composición óptima de tal formulación contendría 0,25-2,5 mg del fármaco y ~100 mg del polímero Eudragit con un espesor de película típico de ~250 µm. Es probable que el pH de la superficie esté en el rango 6,2-6,6 y la fuerza de bioadhesión del orden de ~5 N. Es probable que el perfil de liberación del fármaco muestre que > 90 % se libera durante 6 h

Ejemplo 7: Preparación de película delgada oral de anagrelida alternativa preparación de liberación lenta

25 Se podría hacer un diseño alternativo para una película delgada mucoadhesiva oral de anagrelida de manera similar a la de BUNAVAIL^(R). Esta película oral de buprenorfina y naloxona es una forma transmucosal oral con sabor a cítricos, destinada a la aplicación en la mucosa oral. Cada unidad de dosis es una película rectangular amarilla, con marcas de tinta en el lado mucoadhesivo. La película se adhiere al contacto con la mucosa oral húmeda y se disuelve gradualmente para liberar el fármaco para la absorción local. Cada película también contiene carboximetilcelulosa de sodio, ácido cítrico, aroma de mezcla de cítricos, fosfato de sodio dibásico, tinta azul, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilparabeno, fosfato de sodio monobásico, policarbofilo, propilenglicol, propilparabeno, óxido de hierro amarillo, benzoato de sodio, hidróxido de sodio, sacarina de sodio, acetato de vitamina E y agua purificada. La tinta azul contiene FD&C azul # 1, etanol, goma laca purificada, acetona, hidróxido de amonio y agua. Se podría preparar una formulación comparable de anagrelida disponible en varias concentraciones, por ejemplo, 0,1 mg de anagrelida en 2,2 cm² de película y 0,25 mg en 30 4,4 cm² de película. Los detalles íntimos de este método de preparación pueden encontrarse en el número de patente US 8475832 B2 "Composiciones de películas sublinguales y orales".

Ejemplo 8: Preparación de una pastilla/piruleta oral de anagrelida

40 La pastilla/piruleta oral de anagrelida puede formularse de varias maneras diferentes. Un enfoque sería comparable al que se usa para las pastillas/piruleta de fentanilo (Actiq), una formulación sólida de terrones de azúcar de citrato de fentanilo soportada en un palito corto de plástico. Cuando se succiona esta se disuelve lentamente en la boca durante un período de 15 minutos lo que da como resultado una absorción transmucosal eficiente del fármaco. En esencia tales formulaciones de pastillas comprenden azúcar (dextrosa como Cerelose 2043), un agente aglutinante de almidón de maíz (almidón pregelatinizado de calidad alimentaria) y el fármaco micronizado (tamaño de partícula 1-5 µM). Las concentraciones del fármaco en la pastilla pueden variar de 0,25-2,5 mg. Además se pueden agregar colorantes y saborizantes como el limón, la piña o la frambuesa junto con sales tampón de hidrógeno fosfato disódico y ácido cítrico para ajustar el pH. Para maximizar la solubilidad acuosa de la anagrelida, se prefieren los pH ácidos, idealmente pH 3. Finalmente un palito de plástico se asegura en una ranura creada durante el proceso de moldeo de las pastillas. Los detalles del proceso para la preparación de piruletas de pastillas de fentanilo pueden encontrarse en el número de patente 50 US20070104763 A1. "Composición de citrato de fentanilo forma de dosificación sólida oral excipiente y material de unión y métodos de fabricación".

Ejemplo 9: Preparación de un atomizador oromucosal de anagrelida.

55 Un atomizador oromucosal es otro método de suministro que se diseñó para explotar la absorción del fármaco dentro de la cavidad oral. La formulación de anagrelida puede realizarse de manera similar a la de Sativex. Esta comprende un recipiente de atomización de vidrio recubierto de plástico ámbar Tipo I (Ph.Eur.) (10 ml) que se adapta a una bomba dosificadora que posee un tubo de inmersión de polipropileno y un cuello de elastómero cubierto con una tapa de polietileno. La bomba dosificadora suministra 100 microlitros por atomización desde el depósito con un volumen de 5,5 ml. La anagrelida micronizada puede disolverse/suspenderse en una mezcla disolvente conjunta de tampón de ácido cítrico, propilenglicol y etanol a la concentración requerida. El atomizador de bombeo puede diseñarse para administrar cantidades de fármaco entre 100-500 µg/100 µl de atomización. Los detalles del método que se usa para la preparación de Sativex pueden encontrarse en la Patente núm. EP 1542657 "Formulaciones líquidas de cannabinoides para la 65 administración mucosal".

Ejemplo 10: Preparación de un atomizador nasal de anagrelida

Un atomizador nasal de anagrelida puede formularse de varias maneras diferentes. Uno de estas sería de una manera análoga a la que se utiliza para la desmopresina (Stimate[®]) atomizador nasal). Para anagrelida, una disolución/suspensión acuosa del fármaco estaría contenida dentro de un depósito de plástico de 10 ml que se une a una bomba accionada por el dedo. Esto contendría una disolución/suspensión de anagrelida micronizada (tamaño de partícula 1-5 µM) en disolución salina ajustada a pH 3,5 con ácido clorhídrico. Alternativamente el ácido cítrico y el dihidrato de fosfato disódico pueden usarse como un tampón. El clorobutanol al 0,5 % v/v o el cloruro de benzalconio al 0,01 % p/v pueden usarse como conservantes. Cuando se inserta en la fosa nasal y se acciona cada pulverización (100 µl) suministraría entre 100-500 µg de fármaco. Los detalles del proceso para la preparación del atomizador nasal de desmopresina pueden encontrarse en la Patente núm. US 5498598 "Una composición para la administración nasal de desmopresina" Un enfoque alternativo para la formulación de un atomizador nasal de anagrelida es el que se administra para sumitriptán en WO20111036521 A2 "Formulaciones que comprenden compuestos de triptano".

Ejemplo 11: Preparación de inhalador pulmonar de anagrelida

Puede emplearse un inhalador de anagrelida en polvo seco de diseño similar al que se usa para el suministro de salbutamol en el que cada activación suministra de 100-500 µg del fármaco micronizado a los pulmones tras la inhalación oral. El dispositivo consta de un pequeño recipiente presurizado de aluminio adaptado con una válvula dosificadora. El propelente puede ser un carbono de clorofluoro o el reemplazo más nuevo, por ejemplo, 1, 1, 1, 2-tetrafluoroetano. Cuando se inserta en un activador de plástico estándar que tiene una boquilla de plástico cada depresión de la válvula proporciona una dosis de entre 100-500 µg del fármaco como una "suspensión" en lactosa. Los detalles de la formulación y preparación de salbutamol que usa el propelente más nuevo se pueden encontrar en US 20140286877 A1 "Composiciones que comprenden sulfato de salbutamol".

Ejemplo 12: Preparación de una formulación de supositorio rectal de anagrelida

La anagrelida puede formularse como un supositorio por un método análogo al que se usa para el suministro de diazepam. Esto comprende preparar supositorios de 1,3 ml que contienen 100-1000 µg de anagrelida disuelto/suspendido en una base que comprende 5 mg de propilenglicol, 2,5 g de gel de sílice y una base de supositorio de Medusca polypeg. Pueden encontrarse más detalles en: <http://www.medisca.net/pdf/sample/F%20001%20603v2%20Diazepam%205%20mg%20Rectal%20Suppositories%201.3%20mL.pdf>.

Ejemplo 13: Preparación de una formulación de anagrelida en gel rectal

Puede prepararse un gel rectal de anagrelida de manera similar a la que se usa para la preparación del gel rectal de diazepam (Dabbagh MA y otros 2007). En esencia este es un producto de hidrogel rectal que comprende una sustancia farmacológica con disolventes conjuntos y conservantes adecuados. La preparación del gel base (HPMC) puede hacerse tras calentar dos tercios del volumen de agua que se requiere a 80 °C y después agregar una cantidad de HPMC para dar una formulación final de concentración de ~6 %. Después se agrega la cantidad restante de agua fría. La cantidad que se requiere de la sustancia farmacológica anagrelida se mezcla después con tampón de ácido cítrico pH 3,5 (que forma una mezcla final al 5 % v/v) y propilenglicol (que forma una mezcla final al 50 % v/v) + etanol (que forma una mezcla final al 2 % v/v) como disolvente conjunto. A esto se agrega el conservante alcohol bencílico (2% v/v de la mezcla final) y finalmente se agrega la cantidad requerida de base de gel que comprende el 23 % de la mezcla final). La formulación preparada se puede dividir en alícuotas en jeringuillas de 3 ml listas para su suministro. Las cantidades a suministrar estarían en el rango de 100-1000 µg de anagrelida por instilación.

Ejemplo 14: Preparación de la formulación de microesferas poliméricas de liberación prolongada de depósito intramuscular de anagrelida

Para formulaciones de depósito de anagrelida, pueden usarse, preparaciones similares a las de risperidona, (RISPERDAL[®] CONSTA[®]), otro compuesto BCS Clase II con una muy similar baja solubilidad en agua. Dichas formulaciones en inyección de acción prolongada comprenden microesferas poliméricas de liberación extendida y disolvente asociado. En el caso de RISPERDAL[®], el fármaco está microencapsulado en 7525 polilactida-co-glicólido (PLG). El disolvente para uso parenteral es una disolución clara, incolora e incluye polisorbato 20, carboximetilcelulosa sódica, dihidrato de hidrógeno fosfato disódico, ácido cítrico anhidro, cloruro de sodio, hidróxido de sodio y agua para inyección. Las microesferas se suspenden en el disolvente antes de la inyección. Las formulaciones de anagrelida pueden prepararse de manera comparable para lograr una liberación intramuscular sostenida. Las dosis para tales formulaciones de depósito de drogas pueden variar de 1-10 mg.

Ejemplo 15: Preparación de una formulación alternativa de depósito de liberación extendida intramuscular de anagrelida.

Alternativamente, una formulación de anagrelida para inyección intramuscular puede prepararse de manera similar a la formulación de depósito de liberación sostenida de otro fármaco BCS Clase II, paliperidona, INVEGA[®] SUSTENNA[®]. Este se presenta como una suspensión acuosa estéril de liberación extendida en un vehículo que comprende polisorbato

20, polietilenglicol 4000, monohidrato de ácido cítrico, hidrógeno fosfato disódico anhidro, monohidrato dihidrógeno fosfato sódico, hidróxido de sodio, y agua para inyección. Nuevamente puede prepararse una formulación de anagrelida de manera comparable para lograr una liberación intramuscular sostenida. Las dosis para tales formulaciones de depósito de fármacos de anagrelida pueden variar de 1-10 mg.

5

Ejemplo 16: Preparación de un implante dérmico de anagrelida

10

15

La anagrelida puede prepararse como un implante de manera similar a la ivermectina, otro fármaco BCS de clase II. La preparación de este último fármaco fue descrita por Maeda y otros (2003). Dichos implantes comprenden una construcción cilíndrica de silicona con un núcleo interno que contiene el activo y aditivos tales como desoxicolato de sodio y sacarosa en una matriz de silicona. Ya que el agua no puede penetrar la cubierta externa de silicona esta logra entrar a través del extremo de la sección transversal y causa la disolución del ingrediente activo. El activo disuelto es libre de difundirse y se libera a través de canales formados en el núcleo interno que se creó como resultado de la disolución del activo. Dicha liberación del fármaco proporciona un perfil de orden pseudo cero. La ventaja de tales sistemas de suministro de fármacos implantados es que se insertan fácilmente quirúrgicamente y pueden extraerse fácilmente cuando se requiera. Las dosis para tales formulaciones de depósito de fármacos de anagrelida pueden variar de 1-10 mg.

Referencias

20

ASH - 55th Annual Meeting New Orleans Dic 2013. "Platelets & Cancer".

Ahluwalia M, Donovan H, Singh N, Butcher L, Erusalimsky JD (2010) Anagrelide represses GATA-1 and FOG-1 expression without interfering with thrombopoietin receptor signal transduction. *J Thromb Haemost*, 8, 2252-61.

25

Ambrus JL, Ambrus CM, Gastpar H. (1986) Effect of imidazoquinazolinones on tumor cells in the circulation. *J Med*. 17, 219-25.

30

Amo L, Tamayo-Orbegozo E, Maruri N, Eguizabal C, Zenarruzabeitia O, Riñón M, Arrieta A, Santos S, Monge J, Vesga MA, Borrego F, Larrucea S (2014) Involvement of platelet-tumor cell interaction in immune evasion. Potential role of podocalyxin-like protein 1. *Front Oncol*. 4, 1-7.

35

Andersen, CL, Siersna V, Hasselbalch HC, Bjerrum OW, Felding P, Lind B, Palmblad J, Olivarius NDF. Prediagnostic thrombocytosis increases the risk of advanced gynecological cancer and increase mortality independently of cancer stage - a population-based study. *ASH, 56th Annual Meeting, San Francisco, Dec 2014, Abstract 2791.*

Bahri-Najafi R, Tavakoli N, Senemar M, Peikanpour M (2014) Preparation and pharmaceutical evaluation of glibenclamide slow release mucoadhesive buccal film. *Research in Pharmaceutical Sciences* 9, 213-223.

40

Bakewell SJ, Nestor P, Prasad S, Tomasson MH, Dowland N, Mehrotra M, Scarborough R, Kanter J, Abe K, Phillips D, Weillbaecher KN.(2003) Platelet and osteoclast beta3 integrins are critical for bone metastasis. *Proc Natl Acad Sci*; 100, 14205-10.

Bambace NM, Holmes CE (2011). The platelet contribution to cancer progression. *J Thromb. Haemost*. 9, 237-49.

45

Battinelli, EM, Kulenthirarajan R Italiano JE Johnson K (2014). Tamoxifen directly disrupts platelet angiogenic potential and inhibits platelet-mediated metastasis *Blood*: 124, 4169

Berge SM, Bighley LD, Monkhouse DC. (1977). *Pharmaceutical salts J Pharm Sci*. 66, 1-19.

50

Birgegård G, Björkholm M, Kutti J, Läfars G, Löfvenberg E, Markevärn B, Merup M, Palmblad J, Mauritzson N, Westin J, Samuelsson J. (2004) Adverse effects and benefits of two years of anagrelide treatment for thrombocytopenia in chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 89, 520-7.

55

Björkman S, Rigemar G, Idvall J. (1997) Pharmacokinetics of midazolam given as an intranasal spray to adult surgical patients. *Br J Anaesth*. 79, 575-80.

Borsig L (2008) The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther*. 8, 1247-55.

60

Bosetti C, Rosato V, Gallus S, La Vecchia C (2012). Aspirin and urologic cancer risk: an update. *Nat Rev Urol*. 9, 102-10.

Bottsford-Miller J, Choi HJ, Dalton HJ, Stone RL, Cho MS, Haemmerle M, Nick AM, Pradeep S, Zand B, Previs RA, Pecot CV, Crane EK, Hu W, Lutgendorf SK, Afshar-Kharghan V, Sood AK. (2015) Differential platelet levels affect response to taxane-based therapy in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 21, 602-10.

- Boucharaba A, Serre CM, Grès S, Saulnier-Blache JS, Bordet JC, Guglielmi J, Clézardin P, Peyruchaud O (2004). Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest.* 114 1714-25.
- 5 Brockmann MA, Giese A, Mueller K, Kaba FJ, Lohr F, Weiss C, Gottschalk S, Nolte I, Leppert J, Tuettenberg J, Groden C (2007). Preoperative thrombocytosis predicts poor survival in patients with glioblastoma. *Neuro Oncol.* 9, 35-42.
- Buergy D, Wenz F, Groden C, Brockmann MA. (2012) Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int J Cancer.* 130, 2747-60.
- 10 Cacciola RR, Francesco ED, Giustolisi R, Cacciola E. (2004) Effects of anagrelide on platelet factor 4 and vascular endothelial growth factor levels in patients with essential thrombocythemia. *Br J Haematol.* 126, 885-6.
- 15 Chadha AS, Kocak-Uzel E, Das P, Minsky BD, Delclos ME, Mahmood U, Guha S, Ahmad M, Varadhachary GR, Javle M, Katz MH, Fleming JB, Wolff RA, Crane CH, Krishnan S. (2015) Paraneoplastic thrombocytosis independently predicts poor prognosis in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Acta Oncol.* 54, 971-8.
- 20 Chen YP, Chen C, Mai ZY, Gao J, Shen LJ, Zhao BC, Chen MK, Chen G, Yan F, Huang TY, Xia YF (2015) Pretreatment platelet count as a predictor for survival and distant metastasis in nasopharyngeal carcinoma patients. *Oncol Lett.* 9 1458-1466.
- Chen YG, Lin CS, Shen CH, Chian CF (2012) Platelet-lowering therapy with anagrelide as an adjuvant therapy for treatment of primary pulmonary neoplasm-associated extreme thrombocytosis. *Jpn J. Clin. Oncol.* 42, 761-3.
- 25 Cho MS, Vasquez HG, Stone R, Zand B, Kroll MH, Sood AK, Afshar-Kharghan V (2012) . Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells. *Blood.* 120, 4869-72.
- Dabbagh, MA, Ameri, A, Honarmand M (2007) Preparation of diazepam rectal gel using cellulose polymers. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 2, 34-44
- 30 Davis AN, Afshar-Kharghan V, Sood AK. (2014) Platelet effects on ovarian cancer. *Semin Oncol.* 41, 378-84.
- Demers M, Ho-Tin-Noé B, Schatzberg D, Yang JD, Wagner DD (2011) Increased efficacy of breast cancer chemotherapy in thrombocytopenic mice *Cancer Res.* 71, 1540-9.
- 35 Dodla S, Velmurugan S., (2013) Buccal penetration enhancers - an overview. *Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 6, 39-47.
- 40 Erpenbeck L, Schön MP (2010) Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood.* 115, 3427-36.
- Fiuzza M (2012) *Cardiotoxicity of Oncologic Treatments* ISBN 978-953-51-0273-1 Publisher: InTech.
- 45 Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J Med.* 285, 1182-6.
- Furlan C, Steffan A, Polesel J, Trovo M, Gobitti C, Vaccher E, Serraino D, Barzan L, Franchin G (2015) Lower platelet counts and antiplatelet therapy independently predict better outcomes in patients with head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective analysis. *Biomark Res.* 3, 25.
- 50 Gay LJ, y Felding-Habermann B (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer.* 11, 123-34.
- Gu L, Li H, Gao Y, Ma X, Chen L, Li X, Zhang Y, Fan Y, Zhang X. (2015) The association of platelet count with clinicopathological significance and prognosis in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 10, 1-12.
- 55 Gupta GP, Massagué J. (2004) Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J Clin Invest.* 114, 1691-3.
- Guo T, Krzystanek M, Szellas Z, Szallas A (2014) Thrombocytosis portends adverse prognostic significance in patients with stage II colorectal carcinoma. *F1000Research* 3, 180-183.
- 60 Gaorav P. Gupta y Joan Massagué (2004) Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J Clin Invest.* 114, 1691-1693.
- 65 Hale KL (2012) Research explores link between thrombocytosis and cancer. *Oncolog.* 57, 11-12.

- Harrison CN, Bareford D, Butt N y otros (2010) Guideline for investigation and management of adults and children presenting with thrombocytosis. *Brit. J Haematol.* 149, 352-275.
- 5 Hart CA, Brown M, Bagley S, Sharrard M, Clarke NW. (2005) Invasive characteristics of human prostatic epithelial cells: understanding the metastatic process. *Br J Cancer* 92, 503-12.
- Hong Y, Wang G, Del Arroyo AG, Hernandez J, Skene C, Erusalimsky JD (2006). Comparison between anagrelide and hydroxycarbamide in their activities against haematopoietic progenitor cell growth and differentiation: selectivity of anagrelide for the megakaryocytic lineage Leukemia. 20, 1117-22.
- 10 Ho-Tin Noe B, Goerge T y Wagner DD (2009) Platelets: Guardian of tumour vasculature. *Cancer Res.* 69, 5623-69.
- Hwang S-J, Chyuan J, Ki C-P y otros (2004) Thrombocytosis: a paraneoplastic syndrome in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 10 (17) 2472-2477.
- 15 Jackson W, Mastro AM, Sosnoski DM (2015) Thrombopoietin and megakaryocytes in breast cancer metastasis to bone. Proceedings of the 106th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research April 18-22 2014 Philadelphia.
- James CW (2000), Anagrelide-induced cardiomyopathy *Pharmacotherapy.* 20, 1224-7.
- 20 Johnson KE, Machlus KR, El-Husayni S, Kulenthirarajan R, Forward JA, Italiano JE, Battinelli EM. (2015) Platelets promote breast cancer metastasis by reprogramming tumor cell to produce IL-8. *ASH 57th Annual Meeting, Orlando, FL.* Dic 5-8, 2015.
- 25 Josa V, Krzystanek M, Eklund AC, Salamon F, Zarand A, Szallasi Z, Baranyai Z. (2015) Relationship of postoperative thrombocytosis and survival of patients with colorectal cancer. *Int. J. Surg.* 18, 1-6.
- Joshi J T (2011) A review of micronization techniques. *J. Pharmaceut.Sci. & Technol.* 3, 651-681.
- 30 Jurgens D, Moreno-Aspitia A, Tefferi A (2004). Anagrelide-associated cardiomyopathy in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica* 89, 1394- 1395.
- Kacena MA, Gundberg CM, Horowitz MC. (2006) A reciprocal regulatory interaction between megakaryocytes, bone cells, and hematopoietic stem cells. *Bone.* 39, 978-84.
- 35 Kawano M, Mabuchi S, Matsumoto Y, Sasano T, Takahashi R, Kuroda H, Kozasa K, Isohashi F, Ogawa K, Kimura T (2015). Prognostic significance of pretreatment thrombocytosis in cervical cancer patients treated with definitive radiotherapy. *Int J Gynecol Cancer.* 25 1656-62.
- 40 Kisucka J Butterfield CE, Duda DG y otros (2006) Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive haemorrhage. *Proc Natl. Acad. Sci.* 103, 855-860.
- Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschlager M, Dolznig H (2013) In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research* 752, 10-24,
- 45 Krotscheck U, Boothe DM, Little AA, Erb HN. (2010) Pharmacokinetics of buprenorphine in a sodium carboxymethylcellulose gel after buccal transmucosal administration in dogs. *Vet Ther.* 11, E1-8.
- 50 Labelle M, Begum S. y Hynes RO (2011) Direct signalling between platelets and cancer cells induces epithelial-mesenchymal -like transitions and promotes metastasis *Cancer Cell* 20, 576-590.
- Labelle M, y Hynes RO (2012). The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov.* 12, 1091-9
- 55 Lal I, Dittus K, Holmes CE (2013) Platelets, coagulation and fibrinolysis in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 15, 207.
- Leader A, Zelikson-Saporta R, Rozovski U, Pereg D, Raanani P, Spectre G, Lishner M, Hermoni D (2015) Clopidogrel treatment is associated with a decrease in cancer incidence. *ASH 57th Annual Meeting Orlando FL* 5-8 Dic 2015
- 60 Lee CH, Lin YJ, Lin CC, Yen CL, Shen CH, Chang CJ, Hsieh SY (2015). Pretreatment platelet count early predicts extrahepatic metastasis of human hepatoma. *Liver Int.* 35, 2327-36.
- 65 Lee M, Kim SW, Nam EJ, Yim GW, Kim S, Kim YT (2011) The impact of pretreatment thrombocytosis and persistent thrombocytosis after adjuvant chemotherapy in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 122, 238-41.

- Lee SY, Kang TH, Knoff J, Hung CF, Wu T, Kang KO, Shim JJ (2013) Depletion of platelets enhances therapeutic antitumour effects generated by therapeutic DNA vaccine. *J. Immunotherapy of Cancer* 1 (Suppl.1) 222.
- 5 Li FX, Wei LJ, Zhang H, Li SX, Liu JT (2014) Significance of thrombocytosis in clinicopathologic characteristics and prognosis of gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 15, 6511-7.
- Li F, Hu H, Gu S, Chen X, Sun Q. (2015) Platelet to lymphocyte ratio plays an important role in prostate cancer's diagnosis and prognosis *Int J Clin Exp Med.* 8, 11746-5.
- 10 Li R, Ren M, Chen N, Luo M, Deng X, Xia J, Yu G, Liu J, He B, Zhang X, Zhang Z, Zhang X, Ran B, Wu J. (2014) Presence of intratumoral platelets is associated with tumor vessel structure and metasasis. *BMC Cancer.* 14, 167, 1-10.
- Li X, Koh AJ, Wang Z, Soki FN, Park SI, Pienta KJ, McCauley LK. (2011) Inhibitory effects of megakaryocytic cells in prostate cancer skeletal metastasis. *J Bone Miner Res.* 26,125-34.
- 15 Lin RJ, Afshar-Kharghan y Schafer A I (2014) Paraneoplastic thrombocytosis: the secrets of tumor self-promotion. *Blood* 124, 184-187.
- Lou XL, Sun J, Gong SQ, Yu XF, Gong R, Deng H. (2015) Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. *Chin J Cancer Res.* 27, 450-60.
- 20 Lv X, Li Y, Chen T, Li N (2010) Relationship between platelet count and gastric cancer stage and prognosis. *Chinese-German J. of Clin. Onc.* 9. 213-215.
- 25 Maeda H Brandon M Sano A (2003) Design of controlled release formulation for invermectin using silicone (II) In. *J. Pharm.* 261, 9-19.
- Maráz A1, Furák J, Varga Z, Kahán Z, Tiszlavicz L, Hideghéty K (2013). Thrombocytosis has a negative prognostic value in lung cancer. *Anticancer Res.* 33(4):1725-9.
- 30 Martinez-Selles M, Datino T, Figueiras-Graillet L, Gama J G , Jones C, Franklin R, y Fernandez-Aviles F. (2013) Cardiovascular Safety of Anagrelide in Healthy Subjects: Effects of Caffeine and Food Intake on Pharmacokinetics and Adverse Reactions. *Clin Drug Investig.* 33, 45-54.
- 35 Mlot B y Rzepecki (2012) Cardiac complications of cancer treatment. Chapter 3 in "Cardiotoxicity on Oncologic Treatments" Edited by Fiuza M , InTech Europe. ISBN 978-953-51-0273-1.
- Mishra A, Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. (2011) Homing of cancer cells to the bone. *Cancer Microenviron.* 4, 221-35.
- 40 Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. (1999) Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* 59, 1295-300.
- O'Keefe SC1, Marshall FF, Issa MM, Harmon MP, Petros JA (2002). Thrombocytosis is associated with a significant increase in the cancer specific death rate after radical nephrectomy. *J Urol.* 168(4 Pt 1):1378-80.
- 45 Paget S (1889) quoted in "The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 1989) 8, 98-101.
- 50 Pang Q, Zhang JY, Xu XS, Song SD, Qu K, Chen W, Zhou YY, Miao RC, Liu SS, Dong YF, Liu C (2015). Significance of platelet count and platelet-based models for hepatocellular carcinoma recurrence. *World J Gastroenterol.* 21 5607-21.
- Park SI, Soki FN, McCauley LK. (2011) Roles of bone marrow cells in skeletal metastases: no longer bystanders. *Cancer Microenviron.* 4, 237-46.
- 55 Pathak Y y Thassu D (2009) Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization ISBN 9781420078046. Publishers Taylor & Francis Group.
- Phutane P, Shidhaye S, Lotlikar V, Ghuule A, Sutar S y Kadam V (2010) In vitro evaluation of novel sustained release microspheres of glipizide prepared by emulsion -solvent diffusion evaporation method. *J Young Pharm.* 2, 35-42.
- 60 Psaila B (2010) Interactions between megakaryocytes and tumour cells in the bone marrow vascular stem cell niche promote tumour growth and metastasis. PhD Thesis, Imperial College London
- 65 Rachidi S, Wallace K, Day TA, Alberg AJ, Li Z. (2014) Lower circulating platelet counts and antiplatelet therapy independently predict better outcomes in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Hematol Oncol.* 7, 65.

- Rajkumar A, Szallasi A. (2013) Paraneoplastic thrombocytosis in breast cancer. *Anticancer Res.* 33 4545-6.
- Rasheed A, Kumar K, Sravanthi V (2008) Cyclodextrins as drug carrier molecules: A review. *Scienta Pharmaceutica* 76, 567-598.
- 5 Reiss L (1872) Zur pathologischen Anatomie des Blutes. *Arch Anat. Physiol Wissensch Med.* 39, 237-249.
- Remington The Science and Practice of Pharmacy (2012 - 22nd edition) Edited by Allen, LV. Published by Pharmaceutical Press. ISBN 978 0 85711 062 6.
- 10 Riedl J, Pabinger I y Ay C (2014) Platelets in cancer and thrombosis *Hamostaseologie.* 2014/1, 1-9.
- Saidi A y Alharethi R (2011) Management of chemotherapy induced cardiomyopathy *Current Cardiology Review.* 7, 245-249.
- 15 Sarfaraz Md, Venubabu PV, Doddayya H, Udipi RH (2011) Design and characterization of transmucosal drug delivery system of glibenclamide. *Int. Research J. of Pharmacy.* 2, 116-120.
- Schumacher D, Strilic B, Sivaraj KK y otros (2013) Platelet-derived nucleotides migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer Cell* 24, 130-137.
- 20 Shimada H, Oohira G, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Hayashi H, Takeda A, Gunji Y, Ochiai T. (2004) Thrombocytosis associated with poor prognosis in patients with esophageal carcinoma . *J Am Coll Surg.* 198 737-41.
- 25 Shire Pharmaceuticals (2013) Further information on the safety concern (of anagrelide) <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/comms-ic/documents/websiteresources/con228796.pdf>
- Sierko E, Wojtukiewicz MZ (2004). Platelets and angiogenesis in malignancy. *Semin Thromb Hemost.* 30, 95-108.
- 30 Soares FA (1992) Increased numbers of pulmonary megakaryocytes in patients with arterial pulmonary embolism and with lung metastases seen at necropsy. *J Clin Pathol* 45, 140-2.
- Stone RL, Nick AM, McNeish IA, Balkwill F, Han HD, Bottsford-Miller J, Rupairmoole R, Armaiz-Pena GN, Pecot CV, Coward J, Deavers MT, Vasquez HG, Urbauer D, Landen CN, Hu W, Gershenson H, Matsuo K, Shahzad MM, King ER, Tekedereli I, Ozpolat B, Ahn EH, Bond VK, Wang R, Drew AF, Gushiken F, Lamkin D, Collins K, DeGeest K, Lutgendorf SK, Chiu W, Lopez-Berestein G, Afshar-Kharghan V, Sood AK. (2012). Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med.* 366, 610-18.
- 35 Stravodimou A, Voutsadakis IA, (2013). Pretreatment thrombocytosis as a prognostic factor in metastatic breast cancer. *Internat. J. of Breast Canc.* 2013, 1-6.
- Sun C, Li Q, Hu Z, He J, Li C, Li G, Tao X, Yang A. (2013) Treatment and prognosis of anaplastic thyroid carcinoma: experience from a single institution in China. *PLoS One.* 8, 1-8.
- 45 Suzuki K, Aiura K, Kitagou M, Hoshimoto S, Takahashi S, Ueda M, Kitajima M. (2004) Platelets counts closely correlate with the disease-free survival interval of pancreatic cancer patients. *Hepatogastroenterology.* 51, 847-53.
- Takagi S, Tsukamoto S, Kawano Y, Moschetta M, Mishima Y, Kokubun K, Manier S, Salem K, Huynh D, Sacco A, Roccaro AM, Johnson KE, Battinelli EM, Ghobrial IM (2015). Platelets/megakaryocytes are critical regulators of tumour progression in multiple myeloma. *ASH 2015 Dec 5-8, Orlando, FL.*
- 50 Verma GR, Thiagarajan S, Gupta R, KamanL, Das R, Kochhar R, Sinha SK (2015) J. Thrombocytosis and raised CRP levels predicts advanced esophageal carcinoma. *Gastrointest. Cancer* 46, 350-355.
- 55 Voglová J, Maisnar V, Beránek M, Chrobák L. (2006) Combination of imatinib and anagrelide in treatment of chronic myeloid leukemia in blastic phase .*Vnitř Lek.* 52, 819-22.
- Voutsadakis I A (2014) Thrombocytosis as a prognostic marker in gastrointestinal cancers. *World J of Gastrointest Oncol.* 6, 34-40.
- 60 Wang G, Franklin R, Hong Y, Erusalimsky JD. (2005). Comparison of the biological activities of anagrelide and its major metabolites in haematopoietic cell cultures. *Br. J. Pharmacol.* 146, 324-32.
- 65 Wang H, Gao J, Bai M, Liu R, Li H, Deng T, Zhou L, Han R, Ge S, Huang D, Ba Y. (2014) The pretreatment platelet and plasma fibrinogen level correlate with tumor progression and metastasis in patients with pancreatic cancer. *Platelets.* 25, 382-7.

- Wang LI, Huang X, Chen Y, Jin X, Li Q, Yi TN (2012). Prognostic value of TP/PD-ECGF and thrombocytosis in gastric carcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* 38, 568-573.
- 5 Wang RT, Zhang LQ, Mu YP, Li JB, Xu XS, Pang Q, Sun LK, Zhang X, Dong SB, Wang L, Liu C (2015). Prognostic significance of preoperative platelet count in patients with gallbladder cancer. *World J Gastroenterol.* 21, 5303-10.
- Weilbacher KN, Guise TA y McCauley K (2011) Cancer to bone: fatal attraction. *Nature Reviews Cancer* 11, 411-25.
- 10 Williams M, Liu ZW, Woolf D, Hargreaves S, Michalarea V, Menashy R, Kooner I, Wilson E. (2012) Change in platelet levels during radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide for the treatment of glioblastoma: a novel prognostic factor for survival. *J Cancer Res. Clin Oncol.* 138, 1683-8.
- 15 Wong R.S.M., Lam L.W.K., Cheng G. (2008) Successful rechallenge with anagrelide in a patient with anagrelide-associated cardiomyopathy. *Ann Hematol.* 87, 683-4.
- Yeh ET, Yeh ET, Tong AT, Lenihan DJ, Yusuf SW, Swafford J, Champion C, Durand JB, Gibbs H, Zafarmand AA, Ewer MS. (2004) Cardiovascular complications of cancer therapy toxicity. *Circulation.* 109, 3122-31.
- 20 Yuan L, Liu X. (2015) Platelets are associated with xenograft tumor growth and the clinical malignancy of ovarian cancer through an angiogenesis dependent mechanism *Mol Med Reports* 11, 2449- 2458.
- Yu D, Liu B, Zhang L, Du K. (2013) Platelet count predicts prognosis in operable non-small cell lung cancer. *Exp Ther. Med.* 5, 1351-1354.
- 25 Zhang W, Yu C, Huang B, Zhou FL, Huang HD, Li Q. (2015) Correlation between bone metastasis and thrombocytosis in pulmonary adenocarcinoma patients. *Oncol Lett.* 9, 762-768.
- 30 Zhang X, Ran Y. (2015) Prognostic role of elevated platelet count in patients with lung cancer: a systematic review and meta-analysis *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 5379-87.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto, en donde el compuesto es anagrelida, una sal, solvato o metabolito activo farmacéuticamente aceptable de esta, en donde el metabolito activo de anagrelida es anagrelida que se hidroxiló en las posiciones 5, 8 o 9 individualmente o en conjunto y/o anagrelida que se oxidó en la posición de nitrógeno terciario para formar un N-óxido, para uso en tratar o prevenir la enfermedad metastásica en hueso o pulmón de un paciente con cáncer trombocitótico; en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cerebro, cavidad oral, cabeza y cuello, carcinoma de tiroides, cánceres gastrointestinales, cáncer pancreático, hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer de pulmones y bronquios, cáncer de ovarios, endometrio, cuello uterino, mama, próstata, riñones, mesotelioma cutáneo, melanoma, vesícula biliar y mieloma múltiple.
10
2. El compuesto para uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer de cabeza y cuello es un cáncer de la región nasofaríngea.
- 15 3. El compuesto para uso de cualquier reivindicación precedente, en donde los cánceres gastrointestinales se seleccionan del grupo que consiste en: cánceres esofágicos y cánceres gástricos.
- 20 4. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, se formuló como una formulación de reducción de efectos secundarios/cardiopreservadora seleccionada del grupo que consiste en: tabletas sublinguales, aerosol oral, tabletas orales mucoadhesivas, películas orales mucoadhesivas, pastillas/piruletas orales, supositorios rectales, geles rectales, aerosol nasal, dispositivos de administración pulmonar, parches transdérmicos, ungüentos, geles o cremas, formulaciones inyectables que incluyen las administradas por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea como preparaciones de liberación inmediata y sostenida.
- 25 5. El compuesto para uso de cualquier reivindicación precedente, en donde el conteo de plaquetas se reduce a un límite superior de $400 \times 10^3/\mu\text{l}$ pero por encima de un límite inferior de $150 \times 10^3/\mu\text{l}$.
- 30 6. El compuesto para uso de cualquier reivindicación precedente, en donde el conteo de plaquetas se reduce a un límite superior de $350 \times 10^3/\mu\text{l}$ pero por encima de un límite inferior de $150 \times 10^3/\mu\text{l}$.
7. El compuesto para uso de cualquier reivindicación precedente, en donde el conteo de plaquetas se reduce a un límite superior de $300 \times 10^3/\mu\text{l}$ pero por encima de un límite inferior de $150 \times 10^3/\mu\text{l}$.
- 35 8. El compuesto para uso de cualquier reivindicación precedente, en donde el conteo de plaquetas se reduce a un límite superior de $250 \times 10^3/\mu\text{l}$ pero por encima de un límite inferior de $150 \times 10^3/\mu\text{l}$.

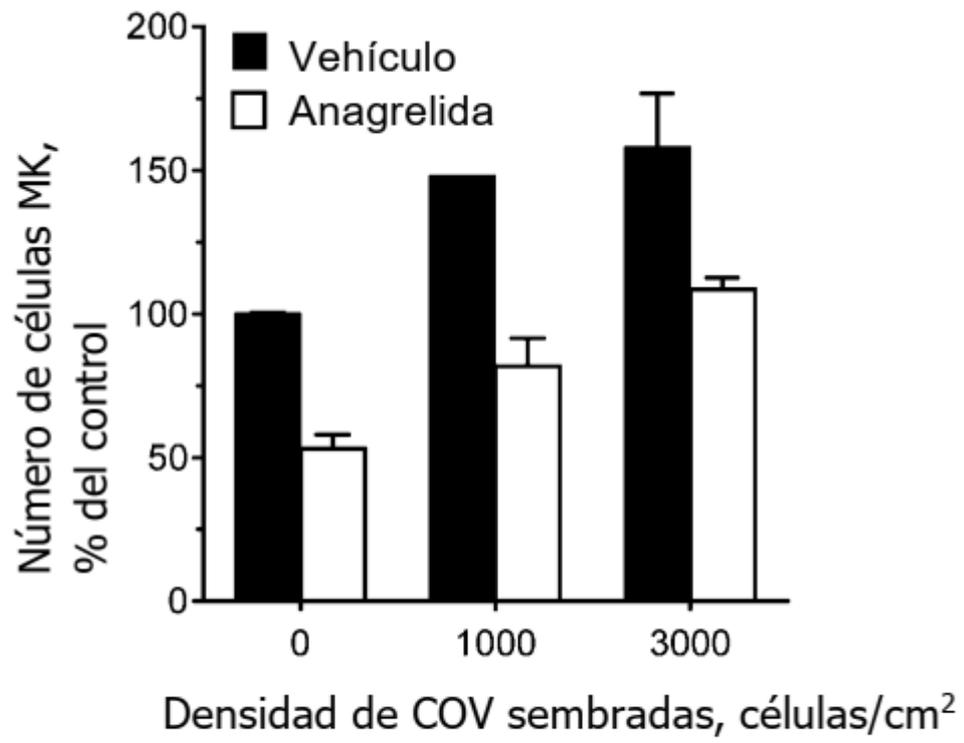


FIGURA 1

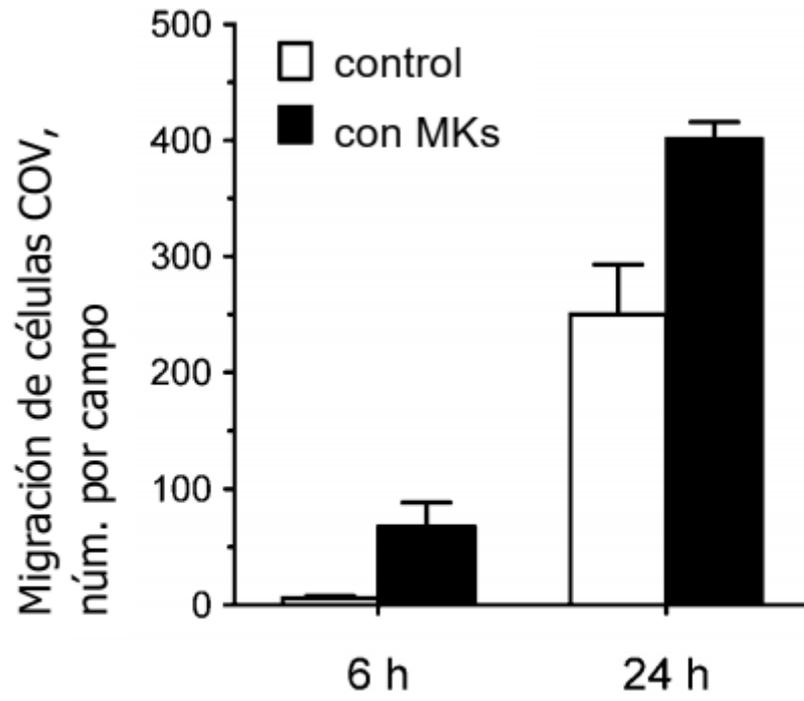


FIGURA 2

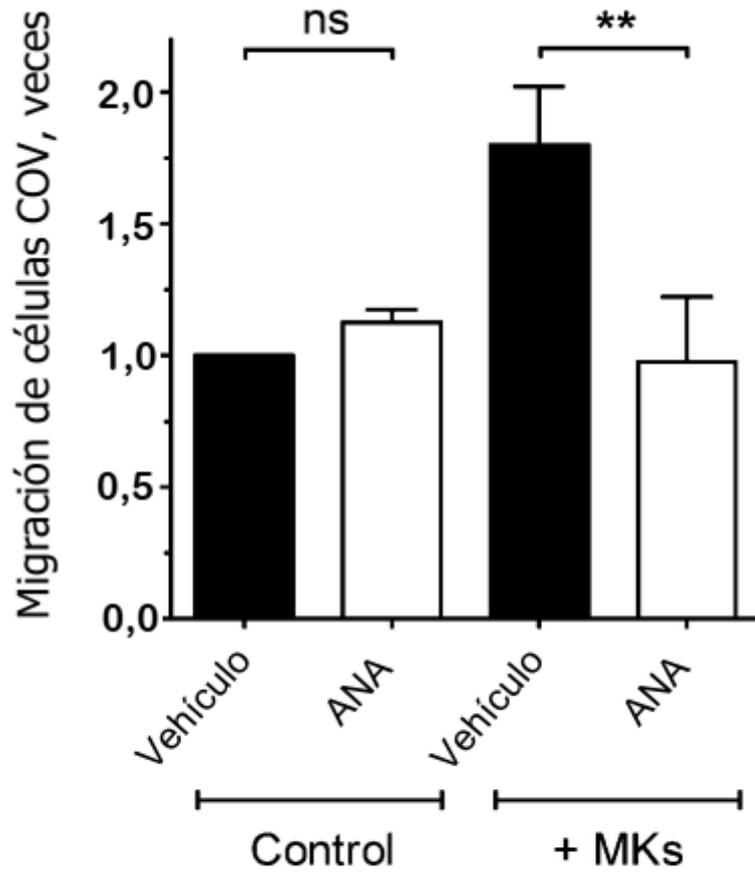


FIGURA 3

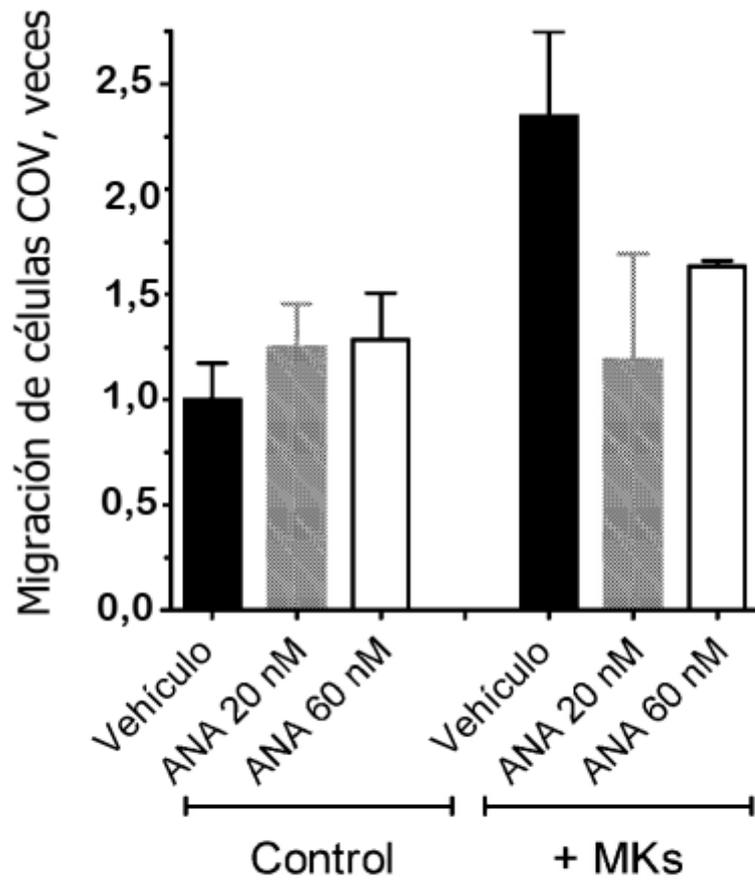


FIGURA 4