



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 550**

51 Int. Cl.:
A61K 31/52 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04805910 .9**
96 Fecha de presentación : **03.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1711185**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Combinación de la roscovitina y de CS-682 o de su metabolito CNDAC.**

30 Prioridad: **04.12.2003 GB 0328180**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2011

73 Titular/es: **CYCLACEL LIMITED**
6-8 Underwood Street
London N1 7JQ, GB

72 Inventor/es: **Green, Simon y**
Sleigh, Roger, Neil

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 361 550 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

Combinación de la roscovitina y de CS-682 o de su metabolito CNDAC.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una combinación farmacéutica adecuada para el tratamiento del cáncer y de otros trastornos proliferativos.

10 Antecedentes de la invención

La iniciación, la progresión y el final del ciclo celular de las células de los mamíferos están regulados por múltiples complejos de cinasas dependientes de ciclinas (CDK), que resultan críticos para el crecimiento celular. Estos complejos comprenden por lo menos una subunidad catalítica (la propia CDK) y una subunidad reguladora (ciclina).
 15 Algunos de los complejos más importantes para la regulación del ciclo celular comprenden la ciclina A (CDK1-también conocida como cdc2, y CDK2), ciclina B1-B3 (CDK1), ciclina C (CDK8), ciclina D1-D3 (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6) ciclina E (CDK2), ciclinas K y T (CDK9) y ciclina H (CDK7). Cada uno de estos complejos está implicado en una fase particular del ciclo celular.

20 La actividad de las CDK está regulada postranslacionalmente, mediante asociaciones transitorias con otras proteínas, y por alteraciones de su localización intracelular. El desarrollo de los tumores está muy asociado a la alteración y la desregulación de las CDK y sus reguladores, lo que sugiere que los inhibidores de las CDK pueden ser útiles agentes terapéuticos anticancerosos. Desde luego, los resultados iniciales sugieren que las células transformadas y normales difieren en sus requerimientos de por ejemplo Ciclina A/CDK2 y que puede ser posible
 25 desarrollar nuevos agentes antineoplásicos desprovistos de la toxicidad general para el huésped observada en los fármacos citotóxicos y citostáticos convencionales.

La función de las CDK consiste en fosforilar y modo activar o desactivar así ciertas proteínas, que comprenden, por ejemplo las proteínas de retinoblastoma, lamininas, histona H1 y componentes del huso mitótico. La etapa catalítica
 30 mediada por las CDK comprende una reacción de fosfotransferencia del ATP al sustrato macromolecular del enzima. Se han descubierto múltiples grupos de compuestos (revisados en, por ejemplo, N. Gray, L. Détiavaud, C. Doerig, L. Meijer, *Curr. Med. Chem.* 6:859, 1999) que poseen propiedades antiproliferadoras en virtud de su antagonismo CDK-específico al ATP.

35 La roscovitina es el compuesto 6-bencilamimo-2[(R)-1-etil-2-hidroxietilamino]-9-isopropilpurina. Se ha demostrado que la roscovitina es un potente inhibidor de los enzimas dependientes de los enzimas cinasas dependientes de ciclinas, en particular CDK2. Este compuesto se desarrolla en la actualidad como un agente anticanceroso. Se conoce que los inhibidores de las CDK bloquean el paso de las células por la fase G2/M del ciclo celular.

40 En estudios clínicos se ha investigado la utilización de la roscovitina en combinación con gemcitabina y cisplatino para el tratamiento de los carcinomas broncopulmonares no microcíticos y en combinación con capecitabina, el profármaco 5-FU, en el tratamiento del cáncer de mama avanzado (PHARMAML, 27 enero 2002; Pharma Market Letter).

45 Está bien establecido en la técnica que los agentes farmacológicos activos se pueden administrar frecuentemente en combinación con el fin de optimizar el régimen de tratamiento. El objetivo de la presente invención consiste por lo tanto en proporcionar una nueva combinación de agentes farmacéuticos conocidos que sea particularmente adecuada para el tratamiento de los trastornos proliferativos, particularmente el cáncer. Más específicamente, la presente invención se centra en el sorprendente e inesperado efecto asociado a la utilización de ciertos agentes
 50 farmacéuticos en combinación.

Exposición de la invención

55 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una combinación que comprende roscovitina y 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil) citosina o 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina.

Un segundo aspecto proporciona una combinación farmacéutica que comprende una combinación según la presente invención mezclada con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.
 60

Un tercer aspecto se refiere a la utilización de una combinación según la presente invención en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los trastornos proliferativos.

65 Un cuarto aspecto se refiere a un producto farmacéutico que comprende roscovitina y 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil-citosina, o 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina, como una preparación combinada para uso terapéutico simultáneo, secuencial o por separado.

Un quinto aspecto se refiere a la utilización de roscovitina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, en el que dicho tratamiento comprende administrar roscovitina y 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil-citosina o 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina simultáneamente, en secuencia o por separado a un sujeto.

Un sexto aspecto se refiere a la utilización de roscovitina y 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil-citosina o 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo.

Un séptimo aspecto se refiere a la utilización de roscovitina en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno proliferativo, en el que dicho medicamento está destinado a la utilización en una terapia de combinación con 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil-citosina o 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina.

Un octavo aspecto se refiere a la utilización de 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil-citosina o 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, en el que dicho medicamento está destinado a la utilización en una terapia de combinación con roscovitina.

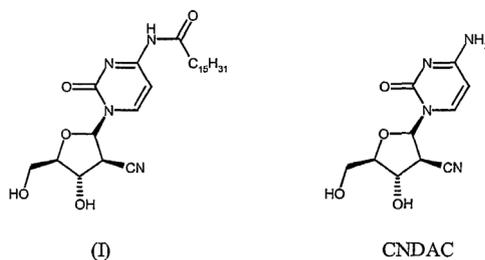
Descripción detallada de la invención

El efecto de las combinaciones de fármacos es inherentemente impredecible y frecuentemente existe la propensión a que un fármaco inhiba completa o parcialmente el efecto del otro. La presente invención se basa en la sorprendente observación de que la administración de 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil-citosina y roscovitina en combinación, simultáneamente, por separado o en secuencia, no produce interacciones adversas entre los dos agentes. La inesperada ausencia de cualquiera de tales interacciones antagonísticas resulta crítica para las aplicaciones clínicas.

En una forma de realización preferida, la combinación de 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil-citosina y roscovitina produce un efecto amplificado en comparación con uno cualquiera de entre los fármacos administrados por sí solos. La sorprendente naturaleza de esta observación está en contraste con lo esperado sobre la base de la técnica anterior.

Las formas de realización preferidas, tal como se describen a continuación son de aplicación a todos los aspectos de la presente invención mencionados anteriormente.

La 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N⁴-palmitoil-citosina (I), también conocida como 2'-ciano-2-desoxi-N⁴-palmitoil-1-β-D-arabinofuranosilcitosina (Hanaka, K., *et al.*, *Int. J. Cancer*, 82:226-236 1999; Donehower R, *et al.*, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, abstract 764, 2000; Burch, PA., *et al. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, Abstract 364, 2001), es un nuevo antimetabolito de 2'-desoxicidina, profármaco del nucleósido CNDAC, 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina de administración oral.



La 1-(2-C-cano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N⁴-palmitoil citosina (I) presenta una forma de acción especial respecto a otros metabolitos nucleósidos tales como la gemcitabina ya que tiene una actividad espontánea rompedora de la cadena de ADN, que produce una potente actividad antitumoral en una multiplicidad de líneas celulares, xenotransplantes y modelos de cáncer metastático.

La 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N⁴-palmitoil citosina (I) ha centrado múltiples estudios en vista de su biodisponibilidad oral y mejor actividad que la gemcitabina (el análogo de nucleósido estrella en el mercado) y el 5-FU (un fármaco antimetabolito muy utilizado) sobre la base de datos preclínicos en tumores sólidos. Recientemente, los investigadores han publicado que (I) muestra una potente acción anticancerosa en modelos de cáncer de colon. En el mismo modelo, se encontró que (I) era superior tanto a la gemcitabina como a 5-FU en términos de incrementar la supervivencia y también evitar la dispersión de las metástasis de cáncer de colon al hígado (Wu M. *et al.*, *Cancer Research*, 63:2477-2482, 2003). Hasta la fecha, los datos de fase I de pacientes con

una multiplicidad de cánceres sugieren que (I) se tolera bien en los humanos, siendo la mielosupresión la toxicidad limitante de la dosis.

5 El término “trastorno proliferativo” utilizado en un sentido amplio en la presente memoria se refiere a todo trastorno que requiere el control de ciclo celular, por ejemplo, los trastornos cardiovasculares tales como la restenosis y la cardiomiopatía, los trastornos autoinmunes tales como la glomerulonefritis y la artritis reumatoide, los trastornos dermatológicos tales como la psoriasis, los trastornos antiinflamatorios, antifúngicos, antiparasitarios tales como la malaria, enfisema y alopecia. En estos trastornos, los compuestos de la presente invención pueden inducir apoptosis o mantener el éxtasis en las células deseadas tal como se requiera. Preferentemente, el trastorno proliferativo es un
10 cáncer o leucemia, más preferentemente cáncer de pulmón, próstata, vejiga, cuello y cabeza, colon, sarcoma o linfoma.

En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a la utilización de la combinación descrita anteriormente en la presente memoria para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un
15 trastorno dependiente o sensible a CDK. Los trastornos dependientes de CDK están asociados a un nivel por encima de lo normal de actividad de una o más enzimas CDK. Tales trastornos están preferentemente asociados con un nivel anormal de actividad de CDK2 y/o CDK4. Un trastorno sensible a CDK es un trastorno en el que una aberración en el nivel de CDK no es la causa primaria, pero está corriente abajo de la aberración metabólica primaria. En tal escenario, se puede decir que CDK2 y/o CDK4 forman parte de la senda metabólica sensible y los
20 inhibidores de CDK pueden por consiguiente ser activos en el tratamiento de tales trastornos. Tales trastornos son preferentemente los trastornos de cáncer o leucemia.

Tal como se utiliza en la presente memoria “preparación de un medicamento” comprende la utilización de los
25 componentes de la presente invención directamente como el medicamento además de su utilización en una etapa cualquiera de la preparación de tal medicamento.

En una forma de realización preferida de la presente invención, la roscovitina se administra en secuencia o por separado antes de la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína. Preferentemente, la roscovitina se administra por lo menos 4 horas antes de la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-
30 palmitoil cisteína y más preferentemente por lo menos 72 horas antes de la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína.

En una forma de realización particularmente preferida, la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína se administra en secuencia o por separado antes de la roscovitina. Preferentemente, la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína se administra por lo menos una hora antes de la roscovitina, y más preferentemente por lo menos 24 horas antes de la roscovitina.
35

En una forma de realización preferida, la roscovitina y la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína se administran cada una de ellas en una cantidad terapéuticamente efectiva con respecto a los
40 componentes individuales; en otras palabras, la roscovitina y la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína se administran en cantidades que serían terapéuticamente efectivas incluso si los componentes se administrasen de otro modo que en combinación.

En otra forma de realización preferida, la roscovitina y 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína se administran cada una de ellas en una cantidad subterapéutica con respecto a los componentes
45 individuales; en otras palabras, la roscovitina y la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína se administran en cantidades que serían terapéuticamente inefectivas si los componentes se administrasen de otro modo que en combinación.

Preferentemente, la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína y la roscovitina interactúan de un modo sinérgico. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “sinérgico” se refiere a que la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína y la roscovitina producen un mayor efecto cuando se utilizan en combinación que el que se esperaría de sumar los efectos individuales de los dos
50 componentes. Ventajosamente, una interacción sinérgica puede permitir la administración de dosis inferiores a un paciente, disminuyendo así la toxicidad de la quimioterapia, mientras que se produce y/o mantiene el mismo efecto terapéutico. En consecuencia, en una forma de realización preferida, cada uno de los componentes se puede administrar en cantidades subterapéuticas.
55

En una forma de realización particularmente preferida, la presente invención se refiere a combinaciones de roscovitina y el metabolito de 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína que es 2'-C'-2'-ciano-2'-dioxi-1-β-D-arabino-pentofuranosil citosina (CNDAC).
60

En otra forma de realización particularmente preferida de la presente invención, la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína se metaboliza intracelularmente al metabolito activo CNDAC-trifosfato (CNDACTP), un proceso que implica tanto la escisión de la parte palmitoil como la activación del CNDACTP por la acción de nucleósido cinasas.
65

Sales/ésteres

5 Los agentes de la presente invención pueden estar presentes como sales o ésteres, en particular sales o ésteres farmacéuticamente aceptables.

10 Las sales farmacéuticamente aceptables de los agentes de la presente invención comprenden las sales adecuadas de ácidos de adición o bases de las mismas. Se puede encontrar una revisión de las sales farmacéuticamente adecuadas en Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 66:1-19 (1977). Las sales se forman, por ejemplo, con ácidos inorgánicos fuertes tales como ácidos minerales, por ejemplo, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácidos hidrohálicos; con ácidos orgánicos carboxílicos fuertes, tales como ácidos alcancarboxílicos de 1 a 4 átomos de carbono que están sustituidos o no sustituidos (por ejemplo, por halógeno), tales como ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo, oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como (C₁-C₄)-alquilo- o ácidos aril-sulfónicos que están sustituidos o no sustituidos (por ejemplo, por halógeno) tales como los ácido metan- o p-toluensulfónico.

20 Los ésteres se forman utilizando ácidos orgánicos o alcoholes/hidróxidos, dependiendo del grupo funcional que se ha de esterificar. Los ácidos orgánicos comprenden los ácidos carboxílicos, tales como los ácidos alcancarboxílicos de 1 a 12 átomos de carbono que se encuentran sustituidos o no sustituidos (por ejemplo, por halógeno), tales como ácido acético; con ácido dicarboxílico saturados o insaturado, por ejemplo, ácido oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo, ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como los ácidos (C₁-C₄)-alquilo- o aril-sulfónicos que se encuentra sustituidos o no sustituidos (por ejemplo, por halógeno) tales como el ácido metan- o p-toluensulfónico. Los hidróxidos adecuados comprenden los hidróxidos inorgánicos, tales como el hidróxido sódico, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio. Los alcoholes comprenden alcoholes alcánlicos de 1 a 12 átomos de carbono que pueden estar sustituidos o insustituidos, por ejemplo, por halógeno.

30 Enantiómeros/tautómeros

35 La presente invención comprende también, cuando sea apropiado, todos los enantiómeros y tautómeros de los agentes. El experto en la materia apreciará los compuestos que poseen propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono quiral) o características tautoméricas. Los correspondientes enantiómeros y/o tautómeros se pueden aislar/preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Isómeros estéricos y geométricos

40 Algunos de los agentes de la presente invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, por ejemplo, pueden poseer uno o más centros asimétricos o geométricos y por consiguiente pueden existir en dos o más formas estereoisoméricas y/o geométricas. La presente invención comprende la utilización de todos los estereoisómeros e isómeros geométricos individuales de los agentes individuales, y mezclas de los mismos. Los términos utilizados en las reivindicaciones comprenden estas formas, con la condición de que dichas formas retengan la actividad funcional apropiada. (aunque no necesariamente en el mismo grado).

Solvatos

50 La presente invención comprende también formas solvatadas de los agentes de la presente invención.

Polimorfos

55 La presente invención se refiere además a agentes de la presente invención en sus múltiples formas cristalinas, formas polimórficas y formas (an)hidras. Está bien establecido en la industria farmacéutica que los compuestos químicos se pueden aislar en una cualquiera de tales formas mediante ligeras modificaciones del procedimiento de purificación y/o forma de aislamiento del disolvente utilizado en la preparación sintética de tales compuestos.

Administración

60 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden adaptar para la administración mediante las vías oral, rectal, vaginal, parenteral, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intracecal, intrabronquial, subcutánea, intradérmica, intravenosa, nasal, bucal o sublingual.

65 Para la administración oral, se utilizan particularmente comprimidos, píldoras, pastillas, cápsulas de gelatinas, gotas y cápsulas. Preferentemente, estas composiciones comprenden entre 1 y 2.000 mg y más preferentemente entre 50 y 1.000 mg del principio activo por dosis.

Otras formas de administración oral comprenden disoluciones o emulsiones que se pueden inyectar intravenosamente, intraarterialmente, intracelalmente, subcutáneamente, intradermalmente, intraperitonealmente o intramuscularmente y que se preparan a partir de disoluciones estériles o esterilizables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden estar en forma de supositorios, pesarios, suspensiones, emulsiones, lociones, ungüentos, cremas, geles, pulverizados, disoluciones o polvos para espolvorear.

Una forma alternativa de administración transdermal es mediante un parche cutáneo. Por ejemplo, el principio activo se puede incorporar en una crema que comprende una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida. El principio activo se puede incorporar también, a una concentración comprendida entre el 1 y el 10% en peso, en un ungüento que comprende una base de cera blanca o parafina blanca blanda junto con los estabilizadores y conservantes que se puedan necesitar.

Las formas inyectables pueden comprender entre 10 y 1.000 mg, preferentemente entre 10 y 500 mg, de principio activo por dosis.

Las composiciones se pueden formular en forma de dosis unitaria, es decir, en forma de porciones discretas que comprenden una unidad de dosis, o un múltiplo o subunidad de dosis unitaria.

En una forma de realización preferida, la combinación o composición farmacéutica de la presente invención se administra intravenosamente.

Dosificación

Un experto en la materia puede fácilmente determinar, sin experimentación innecesaria, la dosis apropiada de una de las composiciones instantáneas que se ha de administrar a un sujeto. Típicamente, un médico determinará la dosis real que será más adecuada para un paciente individual y dependerá de una multiplicidad de factores que comprenden la actividad del compuesto específico utilizado, la estabilidad metabólica y duración de la acción de tal compuesto, la edad, peso corporal, salud general, género, dieta, modo y tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, gravedad del trastorno particular y del individuo sometido a la terapia. Las dosificaciones dadas a conocer en la presente memoria resultan ejemplificativas del caso promedio. Puede desde luego existir situaciones individuales en las que se requieran dosis superiores o inferiores, y éstas están comprendidas en el alcance de la presente invención.

Dependiendo de la necesidad, el agente se puede administrar a una dosis comprendida entre 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, tal como entre 2 y 20 mg/kg, más preferentemente entre 0,1 y 1 mg/kg de peso corporal.

A modo de guía, la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína se administra típicamente de acuerdo con las instrucciones de un médico en dosis orales comprendidas entre 1 y 120 mg/m² de superficie corporal. La dosis se puede administrar 5 días por semana durante 4 semanas o 3 días por semana durante 4 semanas. Las dosis y frecuencias de aplicación se adaptan típicamente al estado médico general del paciente y a la gravedad de los efectos adversos producidos, en particular a los provocados en el sistema hematopoyético, hepático y o renal.

La roscovitina se administra típicamente a entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 5 g/día, preferentemente entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 3 g/día. La roscovitina se administra preferentemente oralmente en comprimidos o cápsulas. La dosis total diaria de roscovitina se puede administrar como una sola dosis o dividida en dosis separadas administradas dos, tres o cuatro veces al día.

Preferentemente, la roscovitina se administra oral o intravenosamente a una dosis comprendida entre 0,4 y 3 g/día. La 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína se administra a continuación del modo considerado más adecuado a una dosis apropiada tal como se mencionó anteriormente. Preferentemente, la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína se administra por lo menos 24 horas después de la administración de roscovitina.

La presente invención se describe además a título de ejemplo.

Ejemplos

La actividad de la roscovitina inhibidora del crecimiento se midió sola y en combinación con 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil cisteína en una multiplicidad de líneas celulares utilizando un ensayo en monocapa y un ensayo con células progenitoras tumorales.

Materiales y métodosCompuesto

- 5 Las disoluciones madre de inhibidor de CDK (por ejemplo roscovitina) se prepararon en DMSO y las alícuotas se almacenaron a -20°C. Las diluciones finales se prepararon en un medio de cultivo (Medio de Dulbecco modificado por Iscove; Life Technologies, Karlsruhe) inmediatamente antes de su utilización.

Ensayo clonogénico

- 10 Preparación de suspensiones unicelulares de xenotransplantes de tumores humanos

15 Se extrajeron en condiciones estériles xenotransplantes de tumores sólidos humanos crecidos subcutáneamente por pases seriados en ratones desnudos de timo aplásico (NMRI, Naval Medical Research Institute, USA, cepa nu/nu, obtenida en las instalaciones de cría), se disgregaron mecánicamente y a continuación se incubaron con un cóctel de enzimas que comprendió colagenasa (41 U/ml, Sigma), ADNasa I (125 U/ml, Roche), hialuronidasa (100 U/ml, Sigma) y dispasa II (1,0 U/ml, Roche) en un medio RPMI 1640 (Life Technologies) a 37°C durante 30 minutos. Se pasaron las células por tamices de tamaños 200 µm y 50 µm y se lavaron dos veces con tampón PBS estéril (Life Technologies). El porcentaje de células viables se determinó en una hemocitómetro Neubauer utilizando exclusión de azul de tripano.

Procedimientos de cultivo

25 El ensayo clonogénico se realizó en un formato de 24 pocillos según un ensayo en agaragar blando de dos capa modificado introducido por Hamburger & Salmon [Alley, M.C. Uhi, C.B. y M.M. Lieber 1982] Improved detection of drug cytotoxicity in the soft agaragar colony formation assay through use of a metabolizable tetrazolium salt, *Life Sci.* 31:3071-3078]. La capa inferior comprendió 0,2 ml/pocillo de medio de Dulbecco modificado por Iscove (suplementado con 20% (v/v) de suero bovino fetal y 0,01% (v/v) gentamicina) y 0,75% (W/v) agaragar. Se añadieron entre $4 \cdot 10^4$ y $8 \cdot 10^4$ células a 0,2 ml del mismo medio de cultivo suplementado con 0,4% (W/v) agaragar y se sembraron en la capa del fondo de placas multipocillos de 24. Los fármacos citostáticos se aplicaron mediante exposición continua (recubrimiento con fármaco) en 0,2 ml de cultivo. Cada placa comprendió seis pocillos control comprendiendo los grupos del vehículo y los tratados por triplicado a 6 concentraciones. Los cultivos se incubaron a 37°C y 7,5% CO₂ en una atmósfera humedecida durante entre 8 y 20 días y se monitorizó detenidamente la formación de colonias con un microscopio invertido. Este período, el crecimiento tumoral *in vitro* condujo a la formación de colonias con un diámetro > 50 µm. En el momento de máxima formación de colonias, se realizaron cuentas mediante un sistema de análisis de imagen automático (OMNICON FAS IV, Biosys GmbH). Las colonias vitales se tiñeron 24 horas antes de la evaluación con una disolución acuosa estéril de cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolium (1 mg/ml, 100 µl/pocillo) [i].

- 40 Se consideró que se podía valorar totalmente un ensayo si se cumplieron los criterios de control de calidad siguientes:

- Número medio de colonias en el grupo control de pocillos de las placas multipocillos de 24 \geq 20 colonias con un diámetro de colonia > 50 µm.
- El compuesto de referencia positivo 5-fluorouracilo (5-FU) (a la dosis tóxica de 1000 µg/ml) debe producir una supervivencia de colonias < 20% de los controles
- Número inicial de placas en el día 0 ó 2 < 20% de las cuentas del grupo control final
- Coeficiente de variación en el grupo control \leq 50%

Evaluación de los datos

- 55 Los efectos de los fármacos se expresaron en términos del porcentaje de supervivencia, obtenido mediante la comparación del número medio de colonias en las placas tratadas con el número medio de cuentas de colonias de los controles no tratados (cuenta de colonias relativa expresada por el valor ensayo-contra-grupo control, T/C-valor [%]):

$$\frac{T}{C} = \frac{\text{cuenta de colonias}_{\text{grupo tratado}}}{\text{cuenta de colonias}_{\text{grupo control}}} \cdot 100 [\%]$$

- 60 Los valores IC50 e IC70, siendo las concentración de fármaco necesaria para inhibir la formación de colonias en un 50% (T/C = 50%) y 70% (T/C = 30%) respectivamente, se determinaron mediante una gráfica de concentración de compuesto contra la cuenta de colonias relativa. Los valores medios IC50 e IC70 se calcularon según la fórmula

$$\text{media IC}_{50,70} = 10^{\left(\frac{\sum_{x=1}^n \lg(\text{IC}_{50,70})}{n} \right)}$$

siendo x el modelo de tumor específico y n el número total de modelos de tumor estudiado. Si no se podía determinar un valor IC50 o IC70 dentro del intervalo de dosis examinado, se utilizó para el cálculo la menor o mayor concentración estudiada.

En el análisis de gráfico medio (gráfica-IC) la distribución de los valores IC70 obtenida para un compuesto de ensayo en los tipos tumorales individuales se da en relación al valor IC70 medio, obtenido para los tumores ensayados. Los valores IC70 individuales se expresan como barras en una escala logarítmica de ejes. Las barras a la izquierda muestran valores IC70 inferiores al valor medio (indicando modelos tumorales más sensibles), las barras a la derecha muestran valores superiores (indicando modelos tumorales más bien resistentes). La gráfica IC representa una huella del perfil antiproliferador de un compuesto.

Procedimiento de ensayo: combinación de roscovitina con agentes estándares

Líneas celulares

Las características de las 6 líneas de células tumorales humanas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Líneas celulares utilizadas en el ensayo de roscovitina en combinación con agentes estándares

Formación de tipo tumoral	Línea celular	Histología en ratón desnudo	Tiempo de duplicación (h)	Tumor <i>in vivo</i>
Colon	DLD1	Adeno ca	nd	Sí
	HT29	pd adeno ca	23	Sí
Pulmón, NSC	LXFA 629L	Adeno carcinoma	31	Sí
Próstata	22RV1	Nd	40	Sí
	DU145	Adeno ca	nd	Sí
	PC3M	Pd adeno ca	nd	Sí

ud = no diferenciado, pd = poco diferenciado, md = moderadamente diferenciado, wd = bien diferenciado, mm = melanoma maligno; ND = no determinado

La línea celular de carcinoma de pulmón LXFA 629L se estableció a partir de un xenotransplante de tumor humano tal como describen Roth *et al.*, 1999 [Roth T, Burger AM, Dengler W, Willmann H, Fiebig HH. Human tumor cell lines demonstrating the characteristics of patient tumors as useful models for anticancer drug screening. En Fiebig HH, Burger AM (eds). Relevance of tumor models for anticancer drug development. *Contrib. Oncol.* 54:145-156 1999]. El origen de los donantes del donante del xenotransplante fue descrito por Fiebig *et al.*, 1992 [Fiebig HH, Dengler WA, Roth T. Human tumor xenografts: Predictivity, characterization and discovery of new anticancer agents. En: Fiebig HH, Burger AM (eds). Relevance of tumor models for anticancer drug development. *Contrib. Oncol.* 54:29-50, 1999].

Las líneas celulares DLD1 y HT29 (colon), así como la de carcinoma de próstata DU145 y PC3M se obtuvieron de US-NCI (Nacional Cancer Institute, USA).

El carcinoma de próstata 22RV1 se adquirió de la American Type Culture Collection (ATCC).

Las células se pasaron rutinariamente una o dos veces por semana. No se mantuvieron más de 20 pases en cultivo. Todas las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada (95% aire, 5% CO₂) en medio RPMI 1640 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma, Deisenhofen, Germany) y 0,1% gentamicina (Invitrogen).

Ensayo de proliferación celular

Se utilizó un ensayo de yoduro de propidio modificado con el fin de ensayar los efectos de la roscovitina sobre el crecimiento de las líneas de células tumorales humanas [Dengler WA, Schulte J., Berger DP *et al.*, (1995). Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assay. *Anti-Cancer Drugs* 6:522-532, 1995). Brevemente, se cosecharon las células de cultivos en fase logarítmica por tripsinización, se contaron y sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano a una densidad celular dependiente de la línea celular (5 a 12.000 células viables/pocillo). Después de 24 horas de recuperación para permitir que las células reasuman el crecimiento exponencial, se añadieron 20 µl de medio de cultivo (3 pocillos control por placa) a los pocillos o medio de cultivo con múltiples combinaciones de artículo de ensayo n° 1 (agente estándar). Cada concentración se sembró por triplicado. En cada placa se aplicó el artículo n° 1 en cinco concentraciones, 4 veces en 4 cuartos de la placa de microtitulación. El cuarto 1 fue para el artículo de ensayo n° 1 solamente, en los cuartos 2 a 4 se aplicó el artículo n° 2 (roscovitina) a tres diferentes puntos de tiempo, respectivamente. Después de 4 días de

exposición continua al artículo de ensayo, se reemplazó el medio de cultivo con o sin fármaco por 200 µl de una disolución acuosa de yoduro de propidio (PI) (7 µg/ml). Debido a que el PI pasa solamente a través de las membranas celulares porosas o con pérdidas, se puede teñir y medir el ADN de las células muertas, mientras que las células vivas no se tiñen. Para medir la proporción de células vivas, las células vivas, las células se permeabilizaron congelando las placas, lo que produce la muerte de las células. Una vez descongeladas las placas se midió la fluorescencia utilizando un lector de microplacas Cytofluor 4000 (excitación 530 nm, emisión 620 nm), proporcionando una relación directa respecto al número total de células. La inhibición del crecimiento se expresó como (tratado/control) x 100 (%T/C) y se determinaron los valores IC₅₀, IC₇₀ e IC₉₀ para cada una de las combinaciones realizando un gráfico de la concentración del compuesto contra la viabilidad celular.

Ensayo MTT

El sistema que se utilizó para evaluar la roscovitina con o sin 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina fue el ensayo MTT. El ensayo MTT es un ensayo espectrofotométrico basado en la capacidad de las células viables para convertir MTT en formazano. Las concentraciones de células se estimaron midiendo la absorbancia a las longitudes de onda de ensayo de 570 nm y a una longitud de onda de referencia de 630 nm. Se utilizó un procedimiento automatizado con el fin de determinar el valor IC₅₀ (concentración de fármaco que inhibe el crecimiento celular en un 50% respecto al control) de todos los agentes utilizados en estos estudios. Las líneas celulares se seleccionaron considerando las posibilidades específicas de diseños de futuros ensayos clínicos.

Inicialmente la roscovitina y la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina se ensayaron por separado sobre un intervalo de concentraciones. Después de completar el análisis IC₅₀ inicial, se ensayaron las combinaciones. En los estudios de combinaciones, el esquema de las concentraciones (expresada como e porcentaje de la IC₅₀ de los agentes individuales) utilizadas para caracterizar el tipo de interacciones se presenta a continuación:

Concentración de fármaco (Expresada como porcentaje de la IC₅₀)

Roscovitina	1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina
100	0
75	25
60	40
50	50
40	60
25	75
0	100
0	0

Análisis estadístico de los estudios de combinaciones

Con el fin de interpretar las curvas de combinaciones, se realizaron las comparaciones estadísticas con cada una de las combinaciones de ensayo (75:25 roscovitina/1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina) y el punto extremo (100:0 roscovitina y 0:100 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina). Una observación estadísticamente significativa requiere la existencia de una diferencia entre el valor de la absorción de la combinación (roscovitina y 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina) y los dos valores de los puntos extremos (roscovitina y 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina sola) [Greco *et al.*, The search for synergy; A critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Review* 47:331-385 1995; Laska *et al.*, Simple designs and model-free tests for synergy; *Biometrics* 50:834-841 1994]. Si la mayoría de (≥ 3 de 5) de los valores están estadísticamente por encima o por debajo de la línea (puntos extremos) entonces se describe antagonismo o sinergia, respectivamente. De otro modo, el patrón concuerda más con una interacción aditiva.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Combinación que comprende roscovitina o un enantiómero de la misma, y 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina o 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina.
2. Composición farmacéutica que comprende una combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Utilización de una combinación según la reivindicación 1 ó 2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo.
- 15 4. Producto farmacéutico que comprende roscovitina o un enantiómero de la misma, y 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina o 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina como una preparación combinada para la utilización simultánea, en secuencia o por separado en terapia.
- 20 5. Producto farmacéutico según la reivindicación 4 en forma de una composición farmacéutica que comprende un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. Producto farmacéutico según la reivindicación 4 en el tratamiento de un trastorno proliferativo.
7. Producto farmacéutico según la reivindicación 6, en el que el trastorno proliferativo es cáncer.
- 25 8. Producto farmacéutico según la reivindicación 7, en el que el trastorno proliferativo se selecciona de entre cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de cuello y cabeza, cáncer de colon, sarcoma y linfoma.
- 30 9. Utilización de la roscovitina o de un enantiómero de la misma, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, en la que dicho tratamiento comprende administrar a un sujeto simultáneamente, en secuencia o por separado 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina, o 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina, y roscovitina.
- 35 10. Utilización de la roscovitina o de un enantiómero de la misma y 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina o 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo.
- 40 11. Utilización de la roscovitina o de un enantiómero de la misma, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, en el que dicho medicamento está destinado a la utilización en una terapia de combinación con 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina o 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina.
12. Utilización de la 1-(2-C-ciano-2-dioxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoil citosina, o de la 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, en el que dicho medicamento está destinado a la utilización en una terapia de combinación con la roscovitina o un enantiómero de la misma.