



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 028**

51 Int. Cl.:
A61K 38/15 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05719967 .1**
96 Fecha de presentación : **25.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1718322**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

54 Título: **Composiciones sinérgicas con FK-228.**

30 Prioridad: **25.02.2004 JP 2004-50520**
29.04.2004 US 566077 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2011

73 Titular/es: **ASTELLAS PHARMA Inc.**
3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-8411, JP

72 Inventor/es: **Naoe, Yoshinori;**
Inoue, Takeshi y
Kano, Yasuhiko

74 Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 028 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

Composiciones sinérgicas con FK-228.

CAMPO TÉCNICO

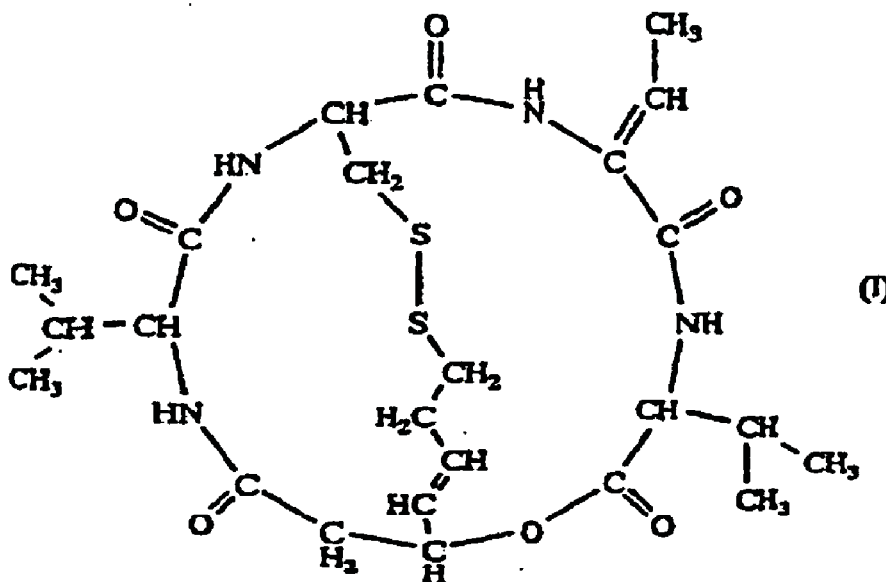
5 La presente invención se refiere al uso de un inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) definido más adelante en combinación con un agente antitumoral seleccionado de un agente antitumoral de taxano, un agente antitumoral de compuesto de platino, un agente antitumoral antimetabolitos, un agente antitumoral que comprende dicha combinación, y dicho inhibidor de las histona-desacetilasas para uso en la intensificación del efecto antitumoral de dichos agentes antitumorales.

TÉCNICA ANTERIOR

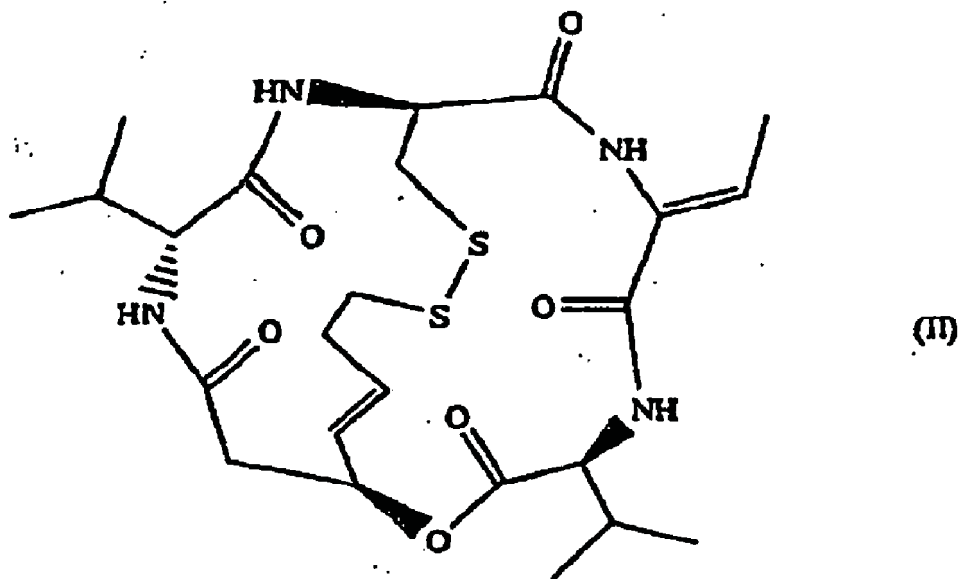
10 En la quimioterapia de los tumores, particularmente los tumores malignos, en general, es raro alcanzar un efecto antitumoral deseado por administración de un solo agente antitumoral, y en situaciones clínicas, por consiguiente, se ha empleado terapia con fármacos múltiples que utiliza dos o más agentes que tienen mecanismos de acción diferentes con la finalidad de aumentar su efecto. Esta terapia de combinación está orientada a aliviar los efectos secundarios y intensificar la acción antitumoral por combinación
15 de agentes antitumorales que tienen mecanismos de acción diferentes, a fin de 1) reducir la población de células insensibles, 2) prevenir o retardar el desarrollo de resistencia a los fármacos, 3) dispersar la toxicidad por una combinación de agentes farmacéuticos con diferentes toxicidades y análogos. Sin embargo, las combinaciones aleatorias de agentes farmacéuticos con mecanismos de acción diferentes para una terapia de combinación no proporcionan necesariamente una acción intensificadora
20 del efecto antitumoral o sinergia.

Se ha informado que los inhibidores de la histona-desacetilasa (HDAC) inducen alta acetilación de la histona y, como resultado, inducen actividad reguladora de la transcripción sobre diversos genes, actividad inhibidora del ciclo celular y apoptosis. Los inhibidores de la histona-desacetilasa son conocidos también como agentes anticáncer potentes (véase JP-B-7-64872, Experimental Cell Research, US
25 (1998), vol. 241, pp. 126-133).

Por ejemplo, un compuesto representado por la fórmula (I)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (a la que se hará referencia también en lo sucesivo como compuesto (I), particularmente un estereoisómero representado por la fórmula (II)



(a la que se hace referencia también en lo sucesivo como FK228) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo son inhibidores de la histona-desacetilasa y se ha informado que exhiben una actividad antitumoral potente (véase JP-B-7-64872 (correspondiente a la Patente U.S. No. 4977138), Experimental Cell Research, US (1998), vol. 241, pp. 126-133).

Sin embargo, el uso combinado del compuesto (I) y un agente antitumoral que forma una reticulación con el DNA y exhibe un efecto antitumoral, tal como cisplatino y análogos, un agente antitumoral antimetabolitos tal como 5-fluorouracilo y análogos o un agente antitumoral de taxano, todos los cuales se utilizan convencionalmente en gran escala como agentes antitumorales, así como un efecto proporcionado por el uso combinado no han sido comunicados todavía.

Budillon E.T., European Journal of Cancer, S29, 2002, describe el uso combinado del inhibidor de HDAC SAHA y 5-fluorouracilo para inhibir la proliferación de células de cáncer colorrectal.

R. Furomai et al., Cancer Research 62, 4916-4921, 2002, menciona que el uso de FK228 en combinación con fármacos antitumorales que están inactivados por glutatión podría ser prometedor.

15 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un agente antitumoral que comprende, en combinación, un agente tumoral seleccionado del grupo constituido por un agente antitumoral de taxano, un agente antitumoral de compuesto de platino y un agente antitumoral antimetabolitos, y un agente farmacéutico de fórmula (I) que intensifica notablemente el efecto antitumoral, que reduce los efectos secundarios y exhibe una actividad antitumoral excelente.

Como resultado de profundos estudios, los autores de la presente invención han encontrado que el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I), que se sabe tiene una potente actividad inhibidora de la histona-desacetilasa, intensifica también notablemente el efecto antitumoral de agentes antitumorales conocidos: un agente antitumoral del grupo del platino, un agente antitumoral antimetabolitos y un agente antitumoral de taxano, lo cual dio como resultado la finalización de la presente invención. De acuerdo con ello, la presente invención proporciona el uso del compuesto de fórmula (I), como se define en la reivindicaciones 1 a 7, un agente antitumoral como se define en las reivindicaciones 8 a 14, y dicho compuesto para uso en la intensificación del efecto antitumoral de agentes antitumorales específicos como se definen en las reivindicaciones 15 a 28.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1 es una gráfica que muestra el concepto del análisis.

Fig. 2 es una gráfica que muestra el análisis del isoblograma de uso combinado (adición simultánea) de FK228 y cisplatino sobre células DU-145 (Ejemplo 1).

Fig. 3 es una gráfica que muestra un análisis del isoblograma de uso combinado de FK228 y cisplatino (adición continua en el orden de FK228 → cisplatino) sobre células DU-145 (Ejemplo 2).

Fig. 4 es una gráfica que muestra el análisis del isoblograma de uso combinado de FK228 y cisplatino (adición continua en el orden de cisplatino → FK228) sobre células DU-145 (Ejemplo 2).

5 Fig. 5 es una gráfica que muestra el análisis del isoblograma de uso combinado (adición simultánea) de FK228 y 5-fluorouracilo sobre células DU-145 (Ejemplo 3).

Fig. 6 es una gráfica que muestra el análisis del isoblograma de uso combinado de FK228 y 5-fluorouracilo (adición continua en el orden de FK228 → 5-fluorouracilo) sobre células DU-145 (Ejemplo 4).

10 Fig. 7 es una gráfica que muestra el análisis del isoblograma de uso combinado de FK228 y 5-fluorouracilo (adición continua en el orden de 5-fluorouracilo → FK228) sobre células DU-145 (Ejemplo 4).

Fig. 8 es una gráfica que muestra el análisis del isoblograma de uso combinado de FK228 y paclitaxel (adición continua en el orden de paclitaxel → FK228) sobre células DU-145 (Ejemplo 5).

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inhibidores de la histona-desacetilasa (particularmente el compuesto (I) y FK228) intensifican notablemente el efecto antitumoral de un agente antitumoral de compuesto de platino, un agente antitumoral antimetabolitos o un agente antitumoral de taxano.

20 Por consiguiente, el agente antitumoral de la presente invención que comprende, en combinación, al menos una clase de agente antitumoral seleccionado de un agente antitumoral del grupo del platino, un agente antitumoral antimetabolitos y un agente antitumoral de taxano, y el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) proporciona un mayor efecto terapéutico contra el cáncer a una dosis más baja comparada con la administración de un solo agente antitumoral seleccionado de dichos agentes antitumorales, o el inhibidor de las histona-desacetilasas, y puede reducir los efectos secundarios a un nivel inferior.

25 MODO ÓPTIMO PARA REALIZACIÓN DE LA INVENCION

El inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) a utilizar en la presente invención es un compuesto que se fija a un sitio activo de las histona-desacetilasas competitivamente con los sustratos y/o exhibe un efecto de reducción de la actividad enzimática de las histona-desacetilasas o inhibe de otro modo la actividad enzimática e incluye compuestos conocidos como inhibidores de la histona-desacetilasa. Para ser específico, el compuesto antes mencionado (I), una sal del mismo y un derivado del mismo (v.g., el compuesto acetilado (I), forma tiol con enlace S-S reducido, etc. Descritos en WO 02/06307) se utilizan de acuerdo con la invención. Análogos de FK228 se describen en la patente U.S. No. 6403555. El inhibidor de las histona-desacetilasas puede ser un compuesto o una mezcla de dos o más compuestos de fórmula (I).

Como el inhibidor de las histona-desacetilasas, se utiliza el compuesto de fórmula (I). Si bien el compuesto (I) puede tener un estereoisómero (v.g., FK228) basado en un átomo de carbono asimétrico o un enlace doble, tal como una forma ópticamente activa, un isómero geométrico y análogos, todos estos isómeros y mezclas de los mismos están abarcados también en el alcance del compuesto (I).

40 Además, los solvatos (v.g., compuestos de inclusión (v.g., hidratos, etc.)), formas anhidras y otras formas polimórficas o sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en esta memoria están abarcados también en el alcance de la presente invención.

En la descripción que sigue de la memoria descriptiva, a no ser que se especifique particularmente, una simple referencia al compuesto (I) significa un grupo de compuestos que incluye FK228 y una sal farmacéuticamente aceptable, con indiferencia de la estereoisomería.

Los inhibidores de la histona-desacetilasa citados anteriormente son sustancias conocidas y disponibles. Por ejemplo, FK228, que es uno de los estereoisómeros del compuesto (I), puede obtenerse por cultivo de una cepa perteneciente al género *Chromobacterium*, que es capaz de producir FK228, en condiciones aerobias, y cosechar la sustancia a partir de su caldo de cultivo. Como la cepa perteneciente al género

Chromobacterium que es capaz de producir FK228, por ejemplo, puede mencionarse *Chromobacterium violaceum* WB968 (FERM BP-1968). Más específicamente, puede obtenerse FK228 a partir de una cepa productora de FK228 como se describe en JP-B-7-64872 (correspondiente a la patente US No. 4977138). FK228 se cosecha preferiblemente a partir de una cepa perteneciente al género *Chromobacterium*, que es capaz de producir FK228, debido a que puede obtenerse más fácilmente. FK228 sintético o semisintético es ventajoso también en el sentido de que no es necesario un paso de purificación ulterior o el número de pasos puede reducirse. Análogamente, compuestos A distintos de FK228 pueden obtenerse también por semi-síntesis o síntesis total por métodos conocidos convencionalmente. Para ser más específicos, el mismo puede producirse de acuerdo con el método comunicado por Khan W. Li, et al. (J. Am. Chem. Soc., Vol. 118, 7237-7238(1996)).

Una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto (I) incluye sales con una base o una sal de adición de ácido tales como sales con bases inorgánicas (v.g., sales de metal alcalino tales como sal de sodio, sal de potasio, etc., sales de metal alcalinotérreo tales como sal de calcio, sal de magnesio, etc., sal de amonio), sales con una base orgánica (v.g., sales de aminas orgánicas tales como sal de trietilamina, sal de diisopropiletilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de etanolamina, sal de trietanolamina, sal de dicitclohexilamina, sal de N,N'-dibenciletilenodiamina, etc.), sales de adición de ácidos inorgánicos (v.g., hidrocioruro, hidrobromuro, sulfato, fosfato, etc.), sales de adición de ácidos orgánicos carboxílicos o sulfónicos (v.g., formiato, acetato, trifluoroacetato, maleato, tartrato, fumarato, metanosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, etc.), sales con un aminoácido básico o ácido (v.g., arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, etc.) y análogos.

Agentes tumorales de compuestos de platino conocidos son adecuados de acuerdo con la invención. Ejemplos específicos de los mismos incluyen cisplatino, carboplatino y análogos para agentes antitumorales de compuestos de platino. Estos compuestos pueden utilizarse como una sola clase de compuesto, o dos o más clases de compuestos en una mixtura.

El agente antitumoral antimetabolitos a utilizar en la presente invención puede ser cualquier antimetabolito conocido como agente antitumoral. Ejemplos específicos incluyen 5-fluorouracilo, tegaful y análogos. El agente antitumoral antimetabolitos puede ser una sola clase de compuesto o dos o más clases de compuestos en una mixtura.

El agente antitumoral de taxano utilizado en la presente invención incluye diversos componentes o productos semisintéticos de los mismos que tienen, en la estructura, un esqueleto de taxano aislado de *Taxusbrevifolia* o productos sintéticos puros que tienen un esqueleto de taxano. Específicamente, pueden mencionarse paclitaxel, docetaxel y análogos. El agente antitumoral de taxano puede ser una sola clase de compuesto o dos o más clases de compuestos en una mixtura.

En la presente invención, el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) intensifica notablemente al menos una clase de agente antitumoral seleccionado de un agente antitumoral del grupo del platino, un agente antitumoral antimetabolitos y un agente antitumoral de taxano. Por esta razón, el agente antitumoral y el intensificador del efecto antitumoral de la presente invención son útiles como agentes terapéuticos para enfermedades cancerosas que incluyen cáncer de la sangre, tumores sólidos, etc.; de modo más específico, cáncer de pulmón, linfoma maligno (v.g. reticulosarcoma, linfosarcoma, enfermedad de Hodgkin, etc.), cáncer de órganos digestivos (v.g., cáncer gástrico, cáncer de vesícula biliar, cáncer de los conductos biliares, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer rectal 5 etc.), cáncer de mama, cáncer de ovario, sarcoma musculoesquelético (v.g., osteosarcoma etc.), cáncer de vejiga, leucemia, (v.g., leucemia aguda con inclusión de crisis blástica de leucemia crónica mieloide etc.), cáncer de riñón, cáncer de próstata y análogos.

La al menos una clase de agente antitumoral seleccionado del grupo constituido por un agente antitumoral del grupo del platino, un agente antitumoral antimetabolitos y un agente antitumoral de taxano puede ser una sola clase de compuesto o dos o más compuestos administrados por separado o en mixtura.

En la presente memoria descriptiva, a no ser que se especifique particularmente, por el "agente antitumoral A" se entiende "al menos una clase de agente antitumoral seleccionado del grupo constituido por un agente antitumoral del grupo del platino, un agente antitumoral antimetabolitos y un agente antitumoral de taxano".

El agente antitumoral o la composición farmacéutica de la presente invención comprende el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y un agente antitumoral A en combinación (es decir, agente concomitante) y puede ser cualquiera con tal que el mismo pueda comprender el inhibidor de las histona-

desacetilasas de fórmula (I) y un agente antitumoral A cuando se utiliza para administración. El agente antitumoral de la presente invención puede ser una sola preparación obtenida preparando simultáneamente el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y un agente antitumoral A, o una combinación de al menos dos preparaciones obtenidas preparando por separado el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y el agente antitumoral A.

El modo de administración no está limitado particularmente, y, por ejemplo, pueden mencionarse (1) la administración de una composición que contiene el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y un agente antitumoral A, a saber, la administración de una sola preparación, (2) administración simultánea de dos preparaciones por la misma ruta de administración, que se obtiene preparando por separado el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y un agente antitumoral A, (3) administración alternada de dos preparaciones por la misma ruta de administración, que se obtienen preparando por separado el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y un agente antitumoral A (v.g. administración en el orden de un inhibidor de las histona-desacetilasas y un agente antitumoral A, o administración de los mismos en orden inverso), (4) administración simultánea de dos preparaciones por rutas de administración diferentes, que se obtienen preparando por separado el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y un agente antitumoral A, (5) administración alternada de dos preparaciones por rutas de administración diferentes, que se obtienen preparando por separado el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y un agente antitumoral A (v.g. administración en el orden del inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y un agente antitumoral A, o administración de los mismos en orden inverso) y análogos.

El inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) está destinado, de acuerdo con la invención, para ser utilizado en la intensificación del efecto antitumoral de al menos un agente antitumoral concomitante A. En lo que sigue, esta realización se denomina "intensificador". De acuerdo con ello, con tal que esté contenido el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I), el intensificador puede contener un agente antitumoral A en una sola preparación, e incluso si no contiene un agente antitumoral A, puede administrarse un agente antitumoral A por separado como un agente concomitante.

El modo de administración no está limitado particularmente y, por ejemplo, pueden mencionarse (1) administración del intensificador que contiene el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y un agente antitumoral A en una sola preparación, (2) administración simultánea del intensificador y un agente antitumoral A por la misma ruta de administración, (3) administración alternada del intensificador y un agente antitumoral A por la misma ruta de administración (v.g., administración en el orden de un agente antitumoral A y el intensificador de la presente invención, o administración de los mismos en orden inverso), (4) administración simultánea del intensificador y un agente antitumoral A por rutas de administración diferentes, (5) administración alternada del intensificador y un agente antitumoral A por rutas de administración diferentes (v.g., administración en el orden de un agente antitumoral A y el intensificador de la presente invención, o administración de los mismos en orden inverso) y análogos.

En la presente invención, la ratio de mezcla del inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y el agente antitumoral A puede ser, se formulan en una sola preparación o en formulaciones separadas, dentro del intervalo comprendido generalmente entre 1:100 y 100:1, preferiblemente 1:10-10:1, como ratio en peso.

Cuando un agente antitumoral A debe formularse en una mixtura de dos o más clases del mismo, la ratio de mezcla no está limitada particularmente. Cuando debe prepararse una mixtura de un agente antitumoral del grupo del platino o un agente antitumoral alquilante y un agente antitumoral antimetabolitos, la ratio de mezcla (ratio en peso) está comprendida preferiblemente en el intervalo de 1:100 a 100:1; cuando una mixtura de un agente antitumoral del grupo del platino o un agente antitumoral alquilante y un agente antitumoral de taxano, la ratio de mezcla (ratio en peso) está comprendida preferiblemente en el intervalo de 1:100-100:1; y cuando debe prepararse una mixtura de un agente antitumoral antimetabolitos y un agente antitumoral de taxano, la ratio de mezcla (ratio en peso), está comprendida preferiblemente en el intervalo de 1:100-100:1.

Es preferible también administrar el agente concomitantemente con ATRA (ácido all-trans-retinoico) (v.g., administración como agente combinado, administración simultánea o separada como preparaciones individuales), con la finalidad de intensificar el efecto antitumoral de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas, agente antitumoral A y/o inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) de la presente invención pueden utilizarse en la forma de una preparación farmacéutica tal

como un sólido, semisólido o líquido (tableta, pelet, trocisco, cápsula, supositorio, crema, ungüento, aerosol, polvo, líquido, emulsión, suspensión, jarabe, inyección etc.) que contiene el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y/o un agente antitumoral A como ingrediente(s) activo(s), que es adecuada para administración transrectal, intranasal, pulmonar, vaginal, externa (local), oral o parenteral (con inclusión de las vías subcutánea, de implante, intravenosa e intramuscular).

El intensificador del efecto antitumoral puede utilizarse en la forma de una preparación farmacéutica tal como un sólido, semisólido, o líquido (tableta, pelet, trocisco, cápsula, supositorio, crema, ungüento, aerosol, polvo, líquido, emulsión, suspensión, jarabe, inyección etc.) que contiene el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) como ingrediente activo, que es adecuada para administración transrectal, intranasal, pulmonar, vaginal, externa (local), oral o parenteral (con inclusión de las vías subcutánea, de implante, intravenosa e intramuscular).

El agente antitumoral y el intensificador del efecto antitumoral pueden producirse también por métodos convencionales utilizando diversos vehículos orgánicos o inorgánicos utilizados convencionalmente para formar preparaciones farmacéuticas, tales como excipientes (v.g., sacarosa, almidón, manitol, sorbitol, lactosa, glucosa, celulosa, talco, fosfato de calcio, carbonato de calcio etc.), agentes de condensación (v.g., celulosa, metil-celulosa, hidroxipropil-celulosa, polipropilpirrolidona, gelatina, goma arábiga, polietilenglicol, sacarosa, almidón etc.), desintegrantes (v.g., almidón, carboximetil-celulosa, sal de calcio de carboximetil-celulosa, hidroxipropilalmidón, carboximetil-almidón sódico, hidrogenocarbonato de sodio, fosfato de calcio, citrato de calcio etc.), lubricantes (v.g., estearato de magnesio, aerosil, talco, laurilsulfato de sodio, etc.), correctores (v.g., ácido cítrico, mentol, glicina, polvo de naranja etc.), conservantes (v.g. benzoato de sodio, hidrogenosulfito de sodio, metilparabén, propilparabén, etc.), estabilizadores (ácido cítrico, citrato de sodio, ácido acético, etc.), agentes de suspensión (v.g., metil-celulosa, polivinilpirrolidona, estearato de aluminio etc.), dispersantes (v.g., hidroxipropilmetil-celulosa etc.), diluyentes (v.g., agua etc.), materiales base céreos (v.g., manteca de cacao, polietilenglicol, petrolatum blanco etc.), y análogos.

El agente antitumoral y el intensificador del efecto antitumoral pueden administrarse a mamíferos con inclusión de los humanos en forma de las preparaciones farmacéuticas convencionales arriba mencionadas sin limitación particular alguna. En particular, es preferible la administración intravenosa, intramuscular u oral.

La dosis en la presente invención puede ajustarse a un nivel más bajo que el correspondiente a la administración separada de cada uno del inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y el agente antitumoral A.

Por ejemplo, la dosis se determina adecuadamente de acuerdo con diversos factores tales como peso corporal y/o edad de los pacientes y/o gravedad de la enfermedad y la ruta de administración.

Por ejemplo, cuando el compuesto (I) se utiliza como inhibidor de las histona-desacetilasas y se utiliza cisplatino como agente antitumoral A, la dosis diaria de compuesto (I) y cisplatino en combinación en el caso de una administración intravenosa es generalmente 1-1000 mg, preferiblemente 5-100 mg, más preferiblemente 10-60 mg, para 1 m² de superficie corporal humana, que se administra para el tratamiento por infusión continua. En este caso, la dosis diaria de compuesto (I) es 0,1-100 mg, preferiblemente 1-50 mg, más preferiblemente 5-30 mg, en la cantidad de compuesto (I) para 1 m² de superficie corporal humana, y se administra cisplatino en la dosis de [la dosis arriba mencionada de una combinación de compuesto (I) y cisplatino - la dosis de compuesto (I)].

Ejemplos

A continuación se presentan los resultados de tests farmacológicos que muestran la utilidad de la presente invención.

Utilizando FK228 como inhibidor de las histona-desacetilasas, cisplatino (CDDP) como agente antitumoral, 5-fluorouracilo (5-FU) como agente antitumoral antimetabolitos y paclitaxel como agente antitumoral de taxano, se evaluó el efecto del uso combinado del inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) y cada uno de los agentes antitumorales. Para el test de evaluación, se cultivaron células DU-145 de cáncer de próstata humano (obtenidas de ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION)) en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco que contenía 10% de suero bovino fetal, y se aplicaron al test.

Ejemplo Experimental 1: Efecto del uso combinado (adición simultánea) de FK228 y cisplatino.

Se cultivaron células de cáncer de próstata (6×10^3 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos durante 24 h y se añadió/añadieron FK228 (0,1 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM y 50 nM), cisplatino (50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1000 nM, 2000 nM y 5000 nM) o ambos agentes farmacéuticos (adición simultánea de la combinación a las concentraciones arriba mencionadas) para alcanzar diversas concentraciones. Después de cultivo durante 24 h, las células se lavaron dos veces con PBS (-) (solución salina tamponada con fosfato) (exenta de calcio y magnesio) que contenía 1% de FBS (Suero Bovino Fetal). Se cambió el medio a un medio exento de fármacos y las células se cultivaron ulteriormente durante 96 h. Se disolvió FK228 en etanol y se diluyó con un medio antes de su utilización, y se diluyó el cisplatino con un medio antes de su utilización.

- 5
- 10 La actividad antitumoral después de cada tratamiento se evaluó por el ensayo MTT. Específicamente, se disolvió 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazonio (MTT) en PBS a una concentración de 2,5 mg/ml, se añadieron 20 μ l del mismo a cada pocillo y se cultivaron durante 4 h. El formazano formado por las células vivas se disolvió por adición de isopropanol ácido (100 μ l) y se midió la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 580 nm.
- 15 Con la absorbancia (OD) de las células sin tratar como 100%, se trazaron curvas concentración-respuesta de actividad antitumoral de un solo agente farmacéutico y una combinación de agentes farmacéuticos.

El efecto del uso combinado de FK228 y cisplatino se evaluó por análisis del isoblograma de acuerdo con el método de Steel et al. (Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 5:85-91, 1979.). A saber, basándose en la curva de reacción de concentración de cada agente farmacéutico aisladamente considerado, se determinó teóricamente la concentración inhibitoria del crecimiento de 80% (CI_{80}) por el uso combinado y se representó mediante curvas en una gráfica. Se representó gráficamente la concentración de un agente farmacéutico que alcanzaba CI_{80} en un uso combinado real (véase Fig. 1). Cuando la gráfica se encontraba en un área (b) rodeada por las curvas, se determinó que estaba presente un efecto aditivo, cuando la misma se encontraba en un área (a) más próxima al punto de origen, se determinó que estaba presente un efecto sinérgico, y cuando aquélla se encontraba en un área (c) más alejada del punto de origen, se determinó que estaba presente un efecto antagonista. Se emplearon valores relativos en los cuales CI_{80} de un solo agente era 1.

El isoblograma del Ejemplo Experimental 1 se muestra en Fig. 2. Como resultado del uso combinado (adición simultánea) de FK228 y cisplatino, la actividad antitumoral se intensificaba notablemente.

Ejemplo Experimental 2: Efecto del uso combinado (adición continua) de FK228 y cisplatino.

Se cultivaron células de cáncer de próstata (6×10^3 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos durante 24 horas y se añadieron FK228 (0,1 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM) y cisplatino (50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1000 nM, 2000 nM y 5000 nM) para alcanzar diversas concentraciones. Después de cultivo durante 24 h, las células se lavaron dos veces con PBS (-) que contenía 1% de FBS.

Después del lavado, se añadieron FK228 y cisplatino por adición continua de ambos agentes farmacéuticos en combinación (añadidos en el orden de FK228 \rightarrow cisplatino o cisplatino \rightarrow FK228 para conseguir una combinación de cada concentración). La mezcla se cultivó ulteriormente durante 24 h y se lavó dos veces con PBS (-) que contenía 1% de FBS. El medio se cambió a un medio exento de fármacos y las células se cultivaron ulteriormente durante 72 h. El efecto del uso combinado se evaluó por un método similar al empleado en el Ejemplo Experimental 1.

El isoblograma del Ejemplo Experimental 2 se muestra en Fig. 3 (orden de adición de FK228 \rightarrow cisplatino) y Fig. 4 (orden de adición cisplatino \rightarrow FK228). Una intensificación notable de la actividad antitumoral fue proporcionada por el uso combinado (adición continua) de FK228 y cisplatino en cualquier orden de adición (orden de adición de FK228 \rightarrow cisplatino o cisplatino \rightarrow FK228).

Ejemplo Experimental 3: Efecto del uso combinado (adición simultánea) de FK228 y 5-fluorouracilo

De la misma manera que en el Ejemplo Experimental 1, excepto que se añadieron diversas concentraciones de 5-fluorouracilo (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M y 500 μ M) en lugar de cisplatino, se evaluó el efecto del uso combinado. 5-Fluorouracilo se diluyó con un medio antes de la adición.

El isoblograma del Ejemplo Experimental 3 se muestra en Fig. 5. El uso combinado (adición simultánea) de FK228 y 5-fluorouracilo intensificaba la actividad antitumoral.

Ejemplo Experimental 4: Efecto del uso combinado (adición continua) de FK228 y 5-fluorouracilo.

5 De la misma manera que en el Ejemplo Experimental 2, excepto que se añadieron diversas concentraciones de 5-fluorouracilo (5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM y 500 µM para al orden de adición de 5-fluorouracilo → FK228; y 100 µM, 200 µM, 500 µM, 1000 µM, 2000 µM, 5000 µM y 10000 µM para el orden de adición de FK228 → 5-fluorouracilo) en lugar de cisplatino, se evaluó el efecto del uso combinado. 5-Fluorouracilo se diluyó con un medio antes de la adición.

10 El isoblograma del Ejemplo Experimental 4 se muestra en Fig. 6 (orden de adición de FK228 → 5-fluorouracilo) y Fig. 7 (orden de adición de 5-fluorouracilo → FK228). El uso combinado (adición continua) de FK228 y 5-fluorouracilo en cualquier orden de adición (orden de adición de FK228 → 5-fluorouracilo o 5-fluorouracilo → FK228) intensificaba la actividad antitumoral.

Ejemplo Experimental 5: Efecto del uso combinado de FK228 y paclitaxel (adición continua en el orden de paclitaxel → FK228)

15 De la misma manera que en el Ejemplo Experimental 2, excepto que se añadieron diversas concentraciones de paclitaxel (0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM y 20 nM) en el orden de paclitaxel → FK228 en lugar de cisplatino, se evaluó el efecto del uso combinado. Se disolvió paclitaxel en etanol y se diluyó con un medio antes de la adición.

20 El isoblograma del Ejemplo Experimental 5 se muestra en Fig. 8. El uso combinado de FK228 y paclitaxel (adición continua en el orden de paclitaxel → FK228) intensificaba la actividad antitumoral.

Ejemplo de Formulación 1

FK228	20 mg
Etanol	20 ml

Se disuelve FK228 (20 mg) en y se diluye con etanol (20 ml) para dar una preparación para inyección.

Ejemplo de Formulación 2

FK228	20 mg
Cisplatino	100 mg
Solución salina fisiológica	100 ml

25 Se disuelven FK228 (20 mg) y cisplatino (100 mg) en y se diluyen con solución salina fisiológica (100 ml) para dar una preparación para inyección.

Ejemplo de Formulación 3

FK228	20 mg
5-Fluorouracilo	500 mg
Etanol	100 ml

Se disuelven FK228 (20 mg) y 5-fluorouracilo (500 mg) en y se diluyen con etanol (100 ml) para dar una preparación para inyección.

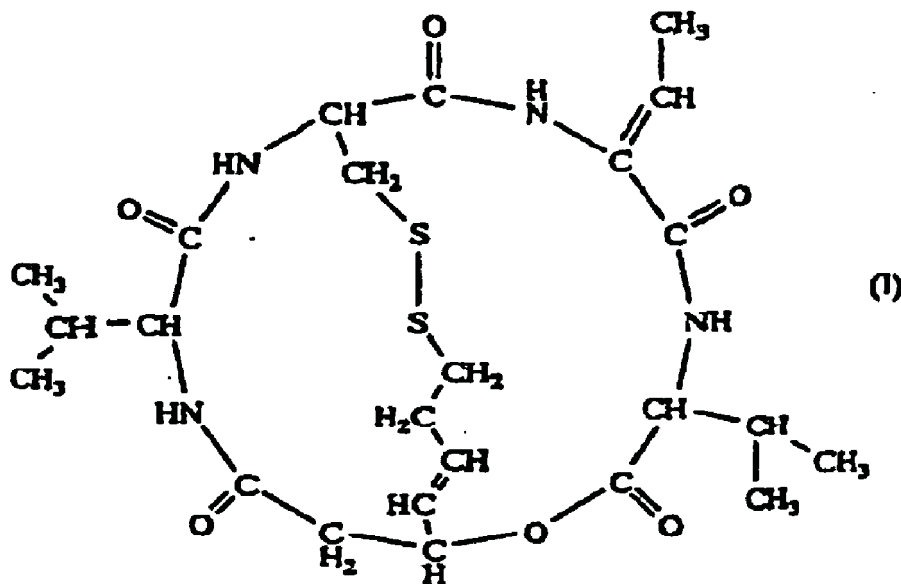
Ejemplo de Formulación 4

FK228	20 mg
Paclitaxel	20 mg
5 Etanol	40 ml

Se disuelven FK228 (20 mg) y paclitaxel (20 ml) en y se diluyen con etanol (40 ml) para dar una preparación para inyección.

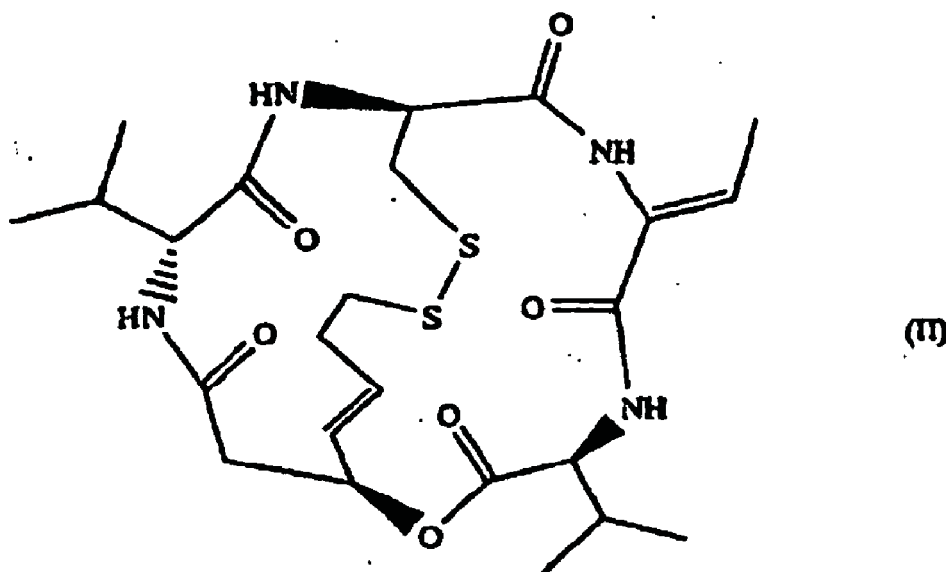
REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor de las histona-desacetilasas en combinación con al menos una clase de agente antitumoral seleccionado del grupo constituido por un agente antitumoral de taxano, agente antitumoral de compuesto de platino, y agente antitumoral antimetabolitos, en el cual el inhibidor de las histona-desacetilasas es el compuesto de la fórmula (I) siguiente



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un agente antitumoral.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el agente antitumoral de compuesto de platino es al menos uno de cisplatino y carboplatino.
- 10 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el agente antitumoral antimetabolitos es al menos uno seleccionado de 5-fluorouracilo y tegafur.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 3, en el cual el agente antitumoral antimetabolitos es 5-fluorouracilo.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el agente antitumoral de taxano es al menos uno de paclitaxel y docetaxel.
- 15 6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el cual el agente antitumoral es un agente antitumoral para cáncer de pulmón, linfoma maligno, cáncer de órganos digestivos, cáncer de mama, cáncer de ovario, sarcoma musculoesquelético, cáncer de vejiga, leucemia, cáncer de riñón o cáncer de próstata.
- 20 7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) es el estereoisómero FK228 que se muestra en la fórmula (II)



8. Un agente antitumoral que comprende, en combinación, al menos una clase de agente antitumoral seleccionado del grupo constituido por un agente antitumoral de taxano, un agente antitumoral de compuesto de platino, un agente antitumoral antimetabolitos, y un inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
9. El agente antitumoral de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual el agente antitumoral de compuesto de platino es al menos uno de cisplatino y carboplatino.
10. El agente antitumoral de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual el agente antitumoral antimetabolitos se selecciona de 5-fluorouracilo y tegaful.
11. El agente antitumoral como se define en la reivindicación 8 ó 10, en el cual el agente antitumoral antimetabolitos es 5-fluorouracilo.
12. El agente antitumoral de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual el agente antitumoral de taxano es al menos uno de paclitaxel y docetaxel.
13. El agente antitumoral de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-12, que es un agente antitumoral para cáncer de pulmón, linfoma maligno, cáncer de órganos digestivos, cáncer de mama, cáncer de ovario, sarcoma musculoesquelético, cáncer de vejiga, leucemia, cáncer de riñón o cáncer de próstata.
14. El agente antitumoral de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en el cual el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) es el estereoisómero FK228 que se muestra en la fórmula (II).
15. Un inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en la intensificación del efecto antitumoral de al menos una clase de agente antitumoral concomitante seleccionado del grupo constituido por un agente antitumoral de taxano, un agente antitumoral de compuesto de platino, y un agente antitumoral antimetabolitos.
16. Inhibidor de las histona-desacetilasas para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el agente antitumoral de compuesto de platino es al menos uno de cisplatino y carboplatino.
17. Inhibidor de las histona-desacetilasas para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el agente antitumoral antimetabolitos se selecciona de al menos 5-fluorouracilo y tegaful.
18. Inhibidor de las histona-desacetilasas para uso de acuerdo con la reivindicación 15 ó 17, en el cual el agente antitumoral antimetabolitos es 5-fluorouracilo.
19. El inhibidor de las histona-desacetilasas para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el agente antitumoral de taxano es al menos uno de paclitaxel y docetaxel.

20. Inhibidor de las histona-desacetilasas para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el cual el tumor tratado se selecciona de cáncer de pulmón, linfoma maligno, cáncer de órganos digestivos, cáncer de mama, cáncer de ovario, sarcoma musculoesquelético, cáncer de vejiga, leucemia, cáncer de riñón o cáncer de próstata.
- 5 21. Inhibidor de las histona-desacetilasas para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en el cual el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) es el estereoisómero FK228 representado en la fórmula (II).
- 10 22. Un inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en el tratamiento del cáncer en terapia de combinación, terapia que comprende el uso de al menos una clase de agente antitumoral seleccionado del grupo constituido por un agente antitumoral de taxano, un agente antitumoral de compuesto de platino, y un agente antitumoral antimetabolitos.
23. Inhibidor de las histona-desacetilasas para uso en el tratamiento del cáncer en terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 22, en el cual el agente antitumoral de compuesto de platino es al menos uno de cisplatino y carboplatino.
- 15 24. Inhibidor de las histona-desacetilasas para uso en el tratamiento del cáncer en terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 22, en el cual el agente antitumoral antimetabolitos se selecciona del al menos 5-fluorouracilo y tegaful.
- 20 25. Inhibidor de las histona-desacetilasas para uso en el tratamiento del cáncer en terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 22 ó 24, en el cual el agente antitumoral antimetabolitos es 5-fluorouracilo.
26. Inhibidor de las histona-desacetilasas para uso en el tratamiento del cáncer en terapia de combinación de acuerdo con la reivindicación 22, en el cual el agente antitumoral de taxano es uno de paclitaxel y docetaxel.
- 25 27. Inhibidor de las histona-desacetilasas para uso en el tratamiento del cáncer en terapia de combinación de cualquiera de las reivindicaciones 22-26, para uso en la intensificación del efecto antitumoral de al menos uno de los agentes antitumorales citados en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en el cual el tumor tratado se selecciona de cáncer de pulmón, linfoma maligno, cáncer de órgano digestivo, cáncer de mama, cáncer de ovario, sarcoma musculoesquelético, cáncer de vejiga, leucemia, cáncer de riñón o cáncer de próstata.
- 30 28. Inhibidor de las histona-desacetilasas para uso en el tratamiento del cáncer en terapia de combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en el cual el inhibidor de las histona-desacetilasas de fórmula (I) es el estereoisómero FK228 que se muestra en la fórmula (II).

FIG. 1

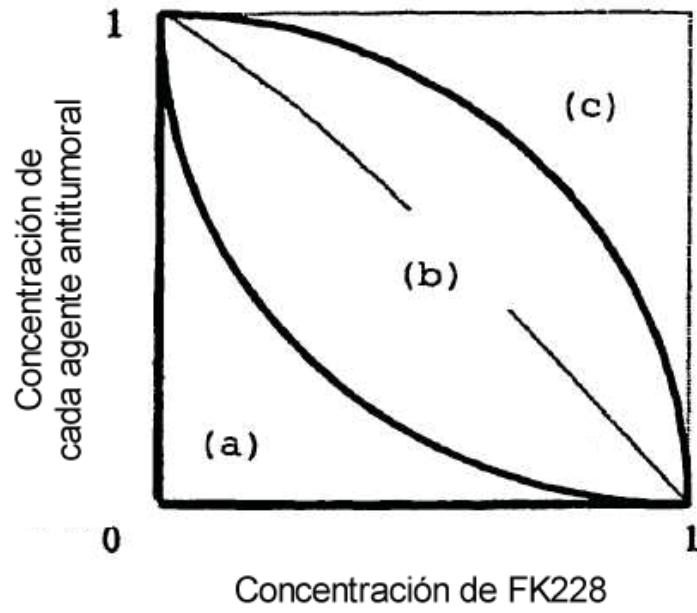


FIG. 2

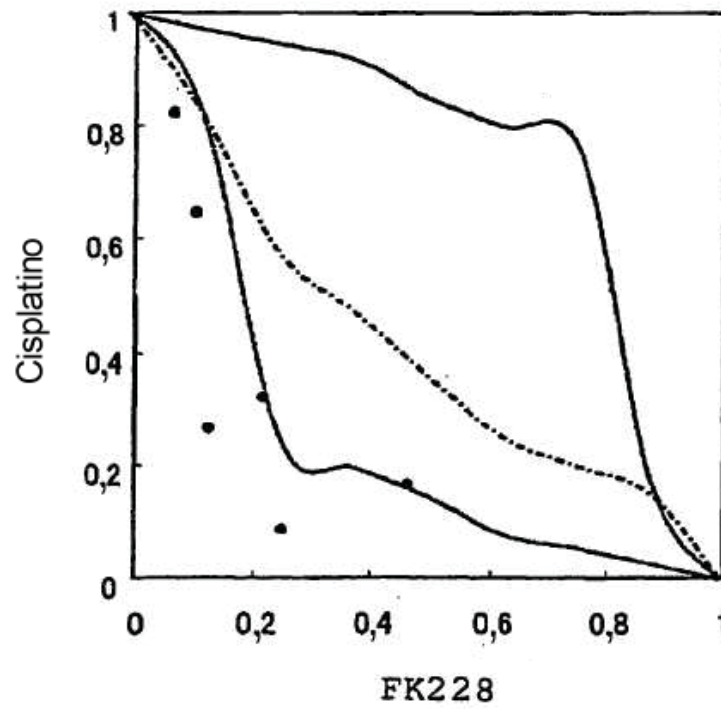


FIG. 3

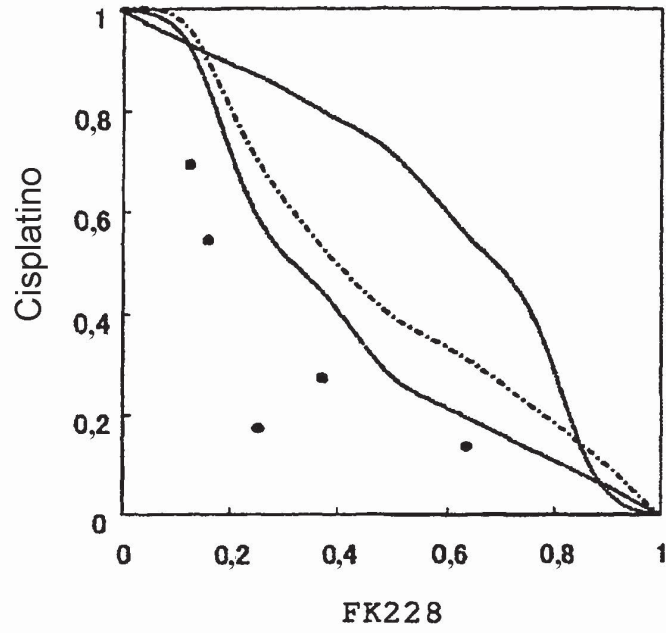


FIG. 4

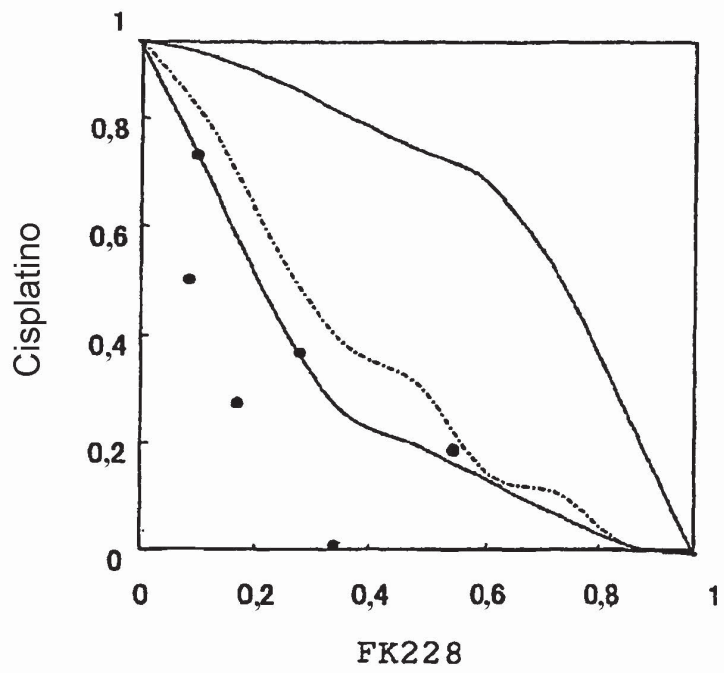


FIG. 5

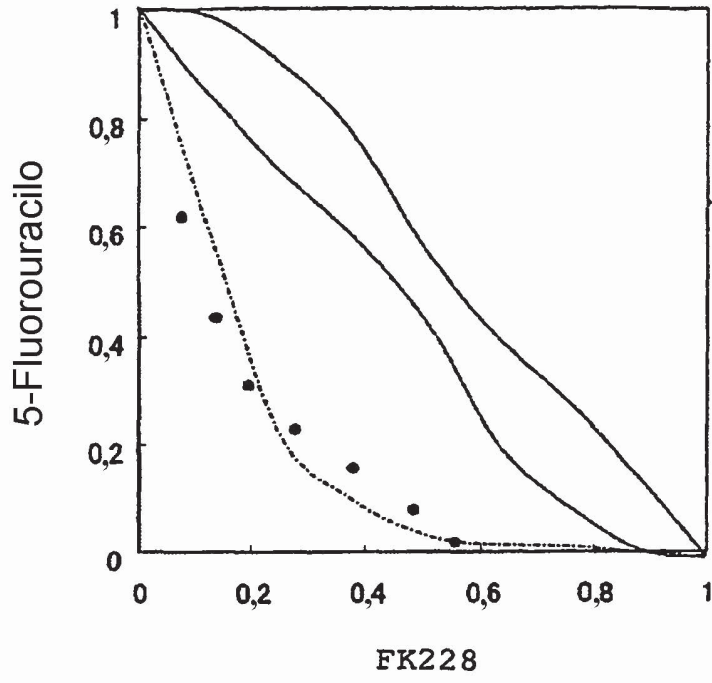


FIG. 6

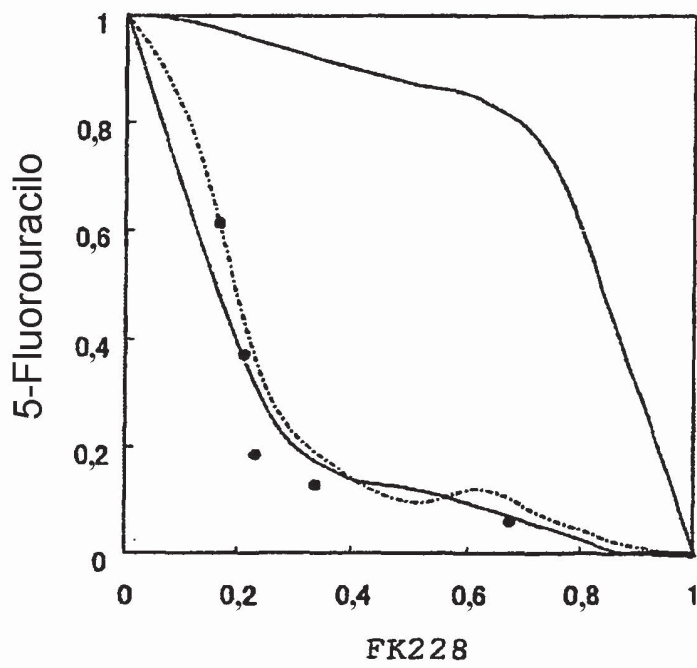


FIG. 7

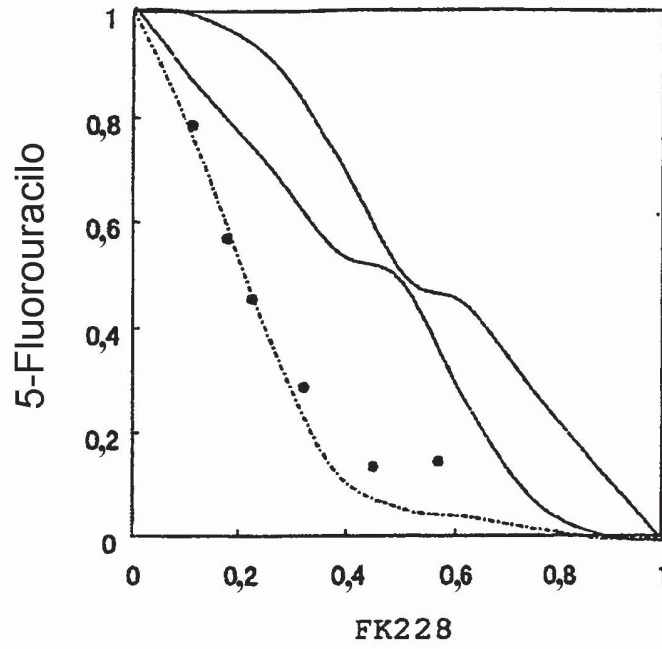


FIG. 8

