

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 484**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7068** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/337** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07119706 .5**

96 Fecha de presentación: **15.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1913947**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2008**

54 Título: **TERAPIA DE COMBINACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.**

30 Prioridad:  
**22.04.2004 US 564540 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.03.2012**

73 Titular/es:  
**ELI LILLY AND COMPANY  
LILLY CORPORATE CENTER  
INDIANAPOLIS IN 46285, US**

72 Inventor/es:  
**Patel, Bharvin, Kumar**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

**ES 2 376 484 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**

Terapia de combinación para el tratamiento del cáncer.

La presente invención se refiere a una terapéutica de oligonucleótidos antisentido dirigida a la survivina para usar junto con un agente quimioterapéutico con el fin de potenciar la eficacia del agente quimioterapéutico.

**5 Antecedentes de la invención**

La survivina es una proteína de la familia del inhibidor de apoptosis (IAP) que regula la apoptosis y la citocinesis. La survivina se sobreexpresa con frecuencia en muchas formas de cáncer, pero falta en gran parte en el tejido adyacente normal. El nivel de expresión normalmente guarda relación con una disminución de apoptosis en los tumores. Hasta la fecha, la sobreexpresión de survivina se ha detectado en tumores de pulmón, colon, páncreas, próstata, mama, estómago y en el linfoma no Hodgkin y el neuroblastoma (Altieri, Nature Cancer Rev., 3: 46-54 (2002); Adida y col., Lancet 351 :882-883 (1998); Ambrosini y col., Nat. Med. 3: 917-921 (1997); Lu y col., Cancer Res. 58:1808-1812 (1998)).

10 La patentes de EE.UU. 6.077.709 y 6.165.788 divulgan compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos antisentido (ASO) y procedimientos para modular la expresión o la sobreexpresión de survivina Estos compuestos son útiles para el tratamiento del cáncer, incluidos, entre otros, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin y cáncer que afecta a queratinocitos o fibroblastos. La patente de EE.UU. 6.335.194 divulga el uso de oligonucleótidos antisentido dirigidos a la survivina en combinación con agentes quimioterapéuticos que actúan a través de un mecanismo distinto del mecanismo antisentido.

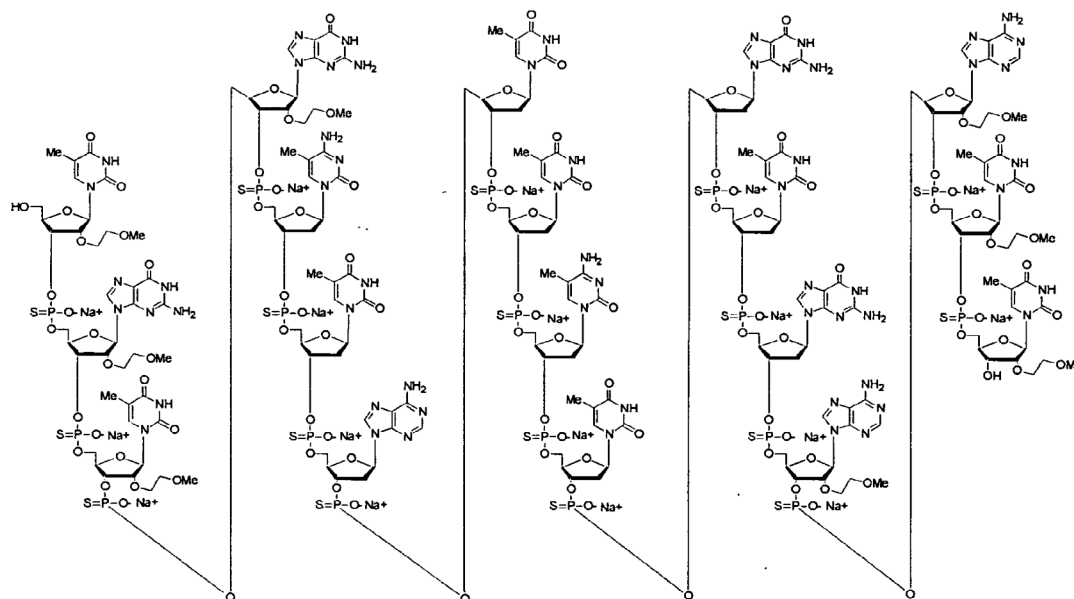
15 La patentes de EE.UU. 6.077.709 y 6.165.788 divulgan compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos antisentido (ASO) y procedimientos para modular la expresión o la sobreexpresión de survivina Estos compuestos son útiles para el tratamiento del cáncer, incluidos, entre otros, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin y cáncer que afecta a queratinocitos o fibroblastos. La patente de EE.UU. 6.335.194 divulga el uso de oligonucleótidos antisentido dirigidos a la survivina en combinación con agentes quimioterapéuticos que actúan a través de un mecanismo distinto del mecanismo antisentido.

20 El bloqueo de la expresión de survivina con un oligonucleótido antisentido dirigido a la survivina restaurará por defecto los puntos de control de muerte celular y, por sí solo o en combinación con quimioterapia, eliminará selectivamente las células cancerosas y mejorará el resultado clínico.

25 La presente invención describe el descubrimiento de que las neoplasias susceptibles pueden tratarse de un modo ventajoso o superior mediante terapia de combinación usando un oligonucleótido antisentido de survivina en combinación con un agente anticanceroso adicional.

**Breve resumen de la invención**

30 La presente invención proporciona una terapia de combinación útil para tratar el cáncer, incluidos, entre otros, cáncer hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin y cáncer que afecta a queratinocitos o fibroblastos. La presente invención incluye el uso de un oligonucleótido antisentido para bloquear la expresión o sobreexpresión de survivina en combinación con paclitaxel. Específicamente, la presente invención proporciona el Compuestos I



**Compuesto I**

para uso en terapia de combinación para tratar una neoplasia susceptible en un mamífero en el que dicho medicamento tiene que administrarse combinado con paclitaxel y en el que dicha terapia de combinación se realiza por vía parenteral. Por tanto, en la terapia de combinación de la presente invención, el OAS de survivina es el Compuesto I y el agente anticanceroso adicional es paclitaxel.

- 5 Sorprendentemente, los inventores han encontrado que la combinación de un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión o sobreexpresión de survivina con ciertos agentes anticancerosos adicionales da como resultado una inhibición del volumen tumoral más que aditiva en comparación con el tratamiento con cualquiera de los agentes solos.

10 Los tipos de cáncer que pueden tratarse con la terapia de combinación de la presente invención incluyen los siguientes: neoplasias del sistema nervioso central: glioblastoma multiforme, astrocitoma, tumores oligodendrogiales, tumores del plexo ependimario y coroideo, tumores pineales, tumores neuronales, meduloblastoma, schwannoma, meningioma, sarcoma meníngeo; neoplasias del ojo: carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, melanoma, rhabdomyosarcoma, retinoblastoma; neoplasias de las glándulas endocrinas: neoplasias hipofisarias, neoplasias de la tiroides, neoplasias de la corteza suprarrenal, neoplasias del sistema neuroendocrino, neoplasias del sistema endocrino gastroenteropancreático, neoplasias de las gónadas; 15 neoplasias de la cabeza y el cuello: cáncer de cabeza y cuello, cavidad bucal, faringe, laringe, tumores odontogénicos; neoplasias del tórax: carcinoma pulmonar de células grandes, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma no microcítico de pulmón, neoplasias del tórax, mesotelioma maligno, timomas, tumores de células germinales primarias del tórax; neoplasias del tubo digestivo: neoplasias del esófago, neoplasias del estómago, 20 neoplasias del hígado, neoplasias de la vesícula biliar, neoplasias del páncreas exocrino, neoplasias del intestino delgado, apéndice vermiforme y peritoneo, adenocarcinoma de colon y recto, neoplasias del ano; neoplasias del tracto genitourinario: carcinoma de células renales, neoplasias de la pelvis renal y uréter, neoplasias de la vejiga, neoplasias de la uretra, neoplasias de la próstata, neoplasias del pene, neoplasias de los testículos; neoplasias de los órganos reproductores femeninos: neoplasias de la vulva y la vagina, neoplasias del cuello del útero, adenocarcinoma del cuerpo uterino, cáncer de ovario, sarcomas ginecológicos: neoplasias de la mama; neoplasias de la piel: carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, dermatofibrosarcoma, tumor de células de Merkel; melanoma maligno; neoplasias huesos y tejidos blandos: sarcoma osteogénico, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor neuroectodérmico primitivo, angiosarcoma; neoplasias del sistema hematopoyético: síndromes mielodisplásicos, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia 30 linfocítica aguda, leucemia/linfoma por HTLV-1 y de células T, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia de mastocitos y neoplasias de niños: leucemia linfoblástica aguda, leucemias mielocíticas agudas, neuroblastoma, tumores óseos, rhabdomyosarcoma, linfomas, tumores renales.

35 De las indicaciones anteriores, el cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario y linfoma, tal como linfoma no Hodgkin, son trastornos preferidos que van a ser tratados por la terapia de combinación de la presente invención. La terapia de la combinación de la presente invención es más preferida para el tratamiento de cáncer hepatocelular, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer pancreático y linfoma no Hodgkin. La terapia de combinación de la presente invención es especialmente útil para el tratamiento de cáncer hepatocelular.

40 Por tanto, la presente invención se refiere a una terapia de combinación para tratar una neoplasia susceptible que comprende la administración por separado del compuesto I y paclitaxel.

En otra realización, la presente invención se refiere a una terapia de combinación para tratar una neoplasia susceptible que comprende la administración simultánea del compuesto I y paclitaxel.

45 Es decir, la presente invención proporciona la administración del compuesto I y paclitaxel para el tratamiento de neoplasias susceptibles.

En el presente documento también se describe el uso del compuesto I en combinación con paclitaxel en la fabricación de un medicamento para tratar neoplasias susceptibles por los medios descritos anteriormente.

50 En el presente documento también se describe una composición farmacéutica que comprende el compuesto I y paclitaxel. En el presente documento también se describe una composición farmacéutica que comprende el compuesto I y paclitaxel para uso en terapia.

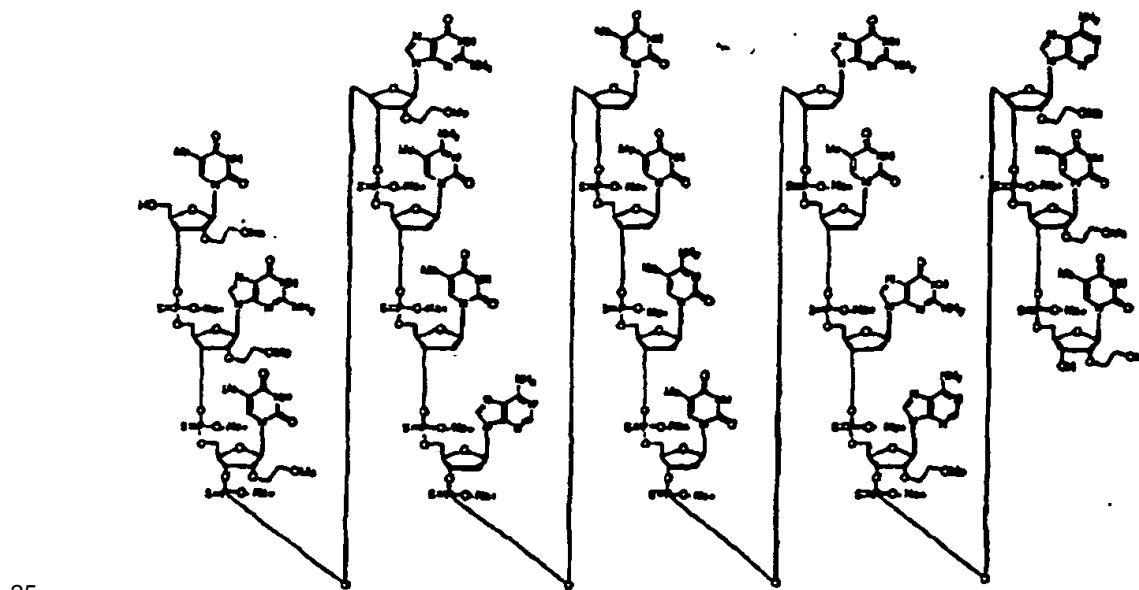
### **Descripción detallada de la invención**

En la terapia de combinación de la presente invención, el ARN diana, el gen diana u otra región de polinucleótido genómico diana es el de la survivina. Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico diana" y "ácido nucleico que codifica survivina" engloban ADN que codifica survivina, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm

o partes de los mismos) transcritos a partir de tal ADN, y también el ADNc derivado de tal ARN. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos que hibridan específicamente con él se denomina, generalmente, "antisentido".

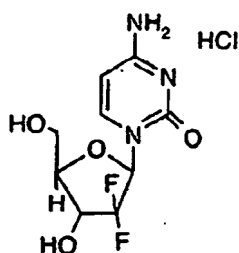
- 5 La expresión "oligonucleótido antisentido de survivina (OAS de survivina)" se refiere a un compuesto modificado o sin modificar que tiene una homología de al menos un 70% con la secuencia siguiente: 5'-TGTGCTATTCTGTGAATT-3'. Preferentemente, el compuesto modificado o sin modificar tiene una homología de al menos el 80% con la secuencia siguiente: 5'-TGTGCTATTCTGTGAATT-3'.

10 Todavía más preferentemente, el compuesto modificado o sin modificar tiene una homología de al menos el 90% o, más preferentemente del 95 %, con la secuencia siguiente: 5'-TGTGCTATTCTGTGAATT-3'. Lo más preferido, el compuesto modificado o sin modificar tiene una homología de al menos el 99% con la secuencia siguiente: 5'-TGTGCTATTCTGTGAATT-3'. Más particularmente, la expresión "OAS de survivina" se refiere a un compuesto modificado que tiene una homología de al menos el 80%, 90%, 95% o 99% con la secuencia anterior, en la que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato. Todavía más particularmente, el compuesto modificado que tiene una homología de al menos el 80%, 90%, 95% o 99% con la secuencia anterior, en la que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato, comprende además una modificación de 2'-O-metoxietil(2'-metoxietoxi) en las cuatro bases en el extremo 5' y las cuatro bases en el extremo 3'. Todavía más particularmente, los residuos de citidina del compuesto modificado comprenden una modificación de 5-metilo. Más particularmente, la expresión "OAS de survivina" se refiere a un compuesto de la siguiente secuencia: 5'-TGTGCTATTCTGTGAATT-3', en la que cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato, cuatro bases en el extremo 5' comprenden una modificación de 2'-O-metoxietilo, cuatro bases en el extremo 3' comprenden una modificación de 2'-O-metoxietilo y los residuos de citidina en las posiciones 5 y 10 comprenden una modificación de 5-metilo. Incluso más particularmente, la expresión "OAS de survivina" se refiere a la sal de sodio del compuesto modificado anterior. Lo más preferido, la expresión "OAS de survivina" se refiere al compuesto siguiente.



30 Paclitaxel es un agente quimioterapéutico aislado del árbol tejo del Pacífico *Taxus brevifolia* y un miembro de la familia de los taxanos de los terpenos (Wani y col., (1971) *J. Am. Chem. Soc.* 93: 2325). Una revisión de la síntesis y actividad anticancerosa de los derivados de paclitaxel se encuentra en Kingston y col., *Studies in Organic Chemistry*, vol. 26, "New Trends in Natural Products Chemistry 1986," Attaur-Rahman and Le Quesne, Eds. (Elsevier, Amsterdam, 1986) páginas 219-235.

El HCl de gemcitabina, un análogo nucleosídico que presenta actividad antitumoral, es monohidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina ( $\beta$ -isómero), también conocido como monohidrato de 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina, o como 1-(4-amino-2-oxo-1H-pirimidin-1-il)-2-desoxi-2',2'-difluororibosa. La fórmula estructural se representa a continuación:



El HCl de gemcitabina se describe en la patente de EE.UU. 5.464.826 que divulga los procedimientos para preparar el compuesto, formular el compuesto y el tratamiento de cáncer usando el compuesto.

5 El HCl de doxorubicina es un antibiótico antraciclina que se ha usado ampliamente como un agente antitumoral. Se aísla del hongo *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. El HCl de doxorubicina también puede sintetizarse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. Las referencias bibliográficas incluyen: Henry, D.W., ACS Symposium Series, N° 30. Cancer Chemotherapy, American Chemical Society (1976) páginas 15-57; y Arcamone, F., Doxorubicin Anticancer Antibiotics (1981) New York: Academic Press.

10 La expresión “principio activo” se refiere a los compuestos de OAS de survivina descritos en el presente documento. “Principio activo” también se refiere a una combinación de un OAS de survivina y un agente anticanceroso adicional, concretamente paclitaxel.

15 Como se usa en el presente documento, el término “paciente” se refiere a un mamífero que está afectado por uno o más trastornos asociados con la expresión o sobreexpresión de survivina. Se entenderá que el paciente más preferido es un ser humano. También se entiende que la presente invención se refiere específicamente a la inhibición de la expresión o sobreexpresión de survivina en mamíferos.

20 La expresión “sal farmacéuticamente aceptable”, como se usa en el presente documento, se refiere a una sal de los compuestos descritos en el presente documento. Debe reconocerse que el contraion particular que forma una parte de cualquier sal de esta invención normalmente no es de naturaleza crítica, siempre y cuando la sal como un todo sea farmacológicamente aceptable y siempre que el contraion no contribuya a calidades no deseadas para la sal como un todo.

Los términos “tratamiento” y “que trata” pretenden referirse a todos los procedimientos en los que puede haber una ralentización, interrupción, cese, control o detención de la progresión de los trastornos descritos en el presente documento, pero no indica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas.

25 Como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad o dosis de un compuesto, con administración de una única o múltiples dosis, bien solo o en combinación con otro agente anticanceroso, que es eficaz en el tratamiento de los trastornos descritos en el presente documento.

La expresión “intervalo terapéuticamente eficaz” es un periodo de tiempo que empieza cuando se administra uno de (a) el OAS de survivina o (b) un agente anticanceroso adicional a un paciente y que termina en el límite del efecto beneficioso anticancerígeno de la combinación de (a) y (b).

30 La expresión “combinación terapéuticamente eficaz” usada en la práctica de la presente invención significa la administración de (a) un OAS de survivina y (b) un agente anticanceroso adicional, bien simultáneamente o por separado, en cualquier orden. La expresión “combinación terapéuticamente eficaz” usada en la práctica de la presente invención significa la administración de (a) un OAS de survivina y (b) un agente anticanceroso adicional, bien simultáneamente o por separado, en cualquier orden.

35 Cuando se administran por separado, el OAS de survivina y el agente anticanceroso adicional pueden administrarse en un programa diferente. Cualquiera de ellos puede administrarse antes que el otro siempre que el tiempo entre las dos administraciones entre dentro de un intervalo terapéuticamente eficaz. Los procedimientos de administración del OAS de survivina y el agente anticanceroso adicional pueden variar. Por tanto, un agente puede administrarse por vía oral, mientras que el otro se administra por vía intravenosa. Es posible que uno de los productos pueda administrarse como una infusión continua, mientras que el otro se proporciona en formas farmacéuticas pequeñas. Es particularmente importante que el fármaco anticanceroso se administre de un modo conocido para optimizar su acción.

45 Los agentes anticancerosos se mezclan generalmente con un vehículo, que puede actuar como un diluyente, o excipiente. Los agentes anticancerosos pueden administrarse en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas para chupar, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsión, disolución, jarabes o aerosoles. También se pueden

usar disoluciones inyectables estériles.

5 Cuando los compuestos descritos en la presente invención poseen un(os) grupo(s) ácido(s) de otro grupo reactivo, pueden formarse sales que son más hidrosolubles y/o fisiológicamente adecuadas que el compuesto original en su forma ácida. Sales farmacéuticamente aceptables representativas incluyen, entre otras, las sales alcalinas y alcalino-térricas tales como litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio..

10 Las sales de sodio son formas particularmente preferidas de los compuestos de OAS de survivina descritos en el presente documento. Las sales se preparan convenientemente a partir del ácido libre mediante el tratamiento del ácido en solución con una base o la exposición del ácido a una resina de intercambio iónico. Preferentemente, el OAS de survivina se prepara inicialmente como una sal de amonio en disolución. Esto va seguido de la conversión de la sal de amonio en la sal de sodio mediante intercambio iónico o cromatografía de fase inversa y/o mediante diafiltración con sales de sodio en una membrana de ultrafiltración.

15 Incluidas en la definición de sales farmacéuticamente aceptables se encuentran las sales de adición de bases inorgánicas y orgánicas relativamente no tóxicas de los compuestos descritos en la presente invención, por ejemplo cationes de amonio, de amonio cuaternario y de amina, derivados de bases nitrogenadas de suficiente basicidad como para formar sales con los compuestos descritos en la presente invención (véase, por ejemplo, S. M. Berge, y col., "Pharmaceutical Salts," J. Phar. Sci., 66: 1-19 (1977)). Ciertos compuestos descritos en la presente invención pueden poseer uno o más centros quirales y, por tanto, pueden existir en formas ópticamente activas. Se contemplan todos estos estereoisómeros, además de las mezclas de los mismos. Si se desea un estereoisómero concreto, se puede preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de reacciones estereoespecíficas con materiales de partida que contienen los centros asimétricos y ya están resueltos o, como alternativa, mediante procedimientos que conducen a mezclas de los estereoisómeros y la posterior resolución por procedimientos conocidos. Por ejemplo, una mezcla racémica se puede hacer reaccionar con un enantiómero sencillo de algún otro compuesto. Esto cambia la forma racémica a una mezcla de diastereómeros. A continuación, debido a que los diastereómeros tienen diferentes puntos de fusión, diferentes puntos de ebullición y diferentes solubilidades, pueden separarse mediante medios convencionales, tales como cristalización.

20 Las composiciones de la presente invención comprenden una combinación de cantidades terapéuticamente eficaces de un OAS de survivina, descrito en el presente documento, y de los agentes anticancerosos indicados en el presente documento. Las composiciones se pueden administrar por diversas vías. Al llevar a cabo el tratamiento de un paciente afectado por los trastornos descritos en el presente documento, una composición de la presente invención puede administrarse en cualquier forma o modo que haga biodisponible el principio activo en una cantidad eficaz, que incluye las vías oral y parenteral. Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar por vía oral, por inhalación, o por las vías subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, intranasal, rectal, ocular, tópica, sublingual, bucal, u otras vías. Generalmente se prefiere administración por vía oral para el tratamiento de los trastornos descritos en el presente documento. No obstante, la administración oral no es la única vía preferida. Por ejemplo, la vía intravenosa puede preferirse por comodidad o para evitar posibles complicaciones relacionadas con la administración por vía oral. Cuando la composición se administra por vía intravenosa, se prefiere un bolo intravenoso o infusión lenta.

30 El médico encargado del diagnóstico, como un experto en la técnica, puede determinar fácilmente una cantidad eficaz del principio activo mediante el uso de técnicas conocidas y mediante la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad o dosis eficaz del compuesto administrado, el médico encargado del diagnóstico, considera varios factores, que incluyen: la especie de mamífero; su tamaño, edad y salud general; la neoplasia específica implicada; el grado, o implicación o la gravedad de la neoplasia; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; la pauta de dosis seleccionada; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

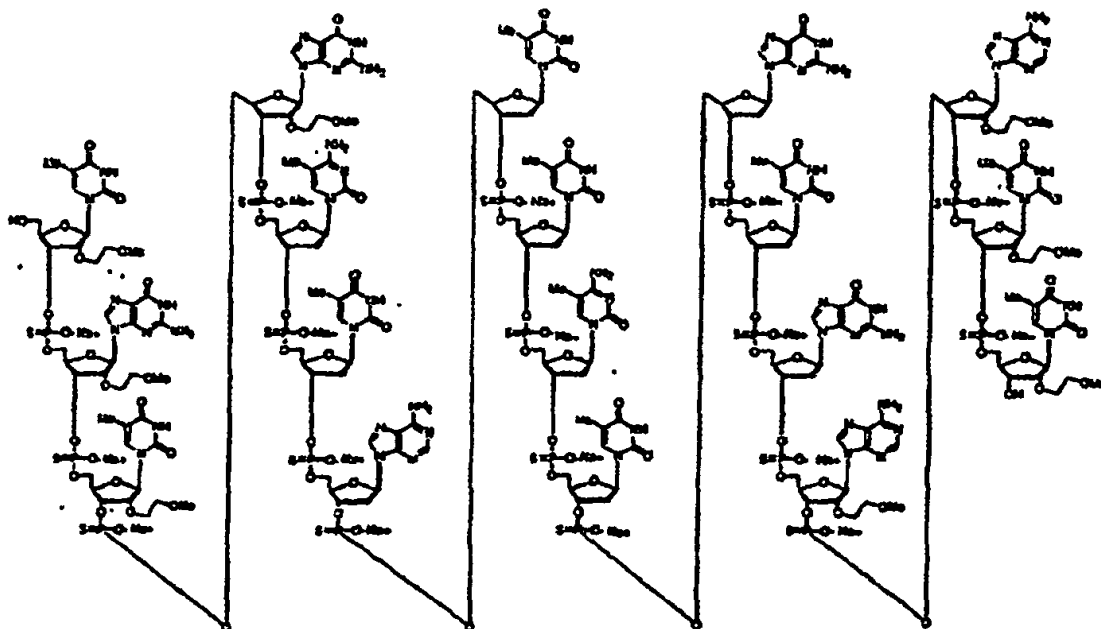
35 Las dosificaciones óptimas pueden variar en función de la potencia relativa del principio activo. En general, las dosificaciones oscilan de 0,01 µg a 100 g por kilogramo de peso corporal y pueden administrarse una o más veces diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. Los expertos en la materia pueden determinar tasas de repetición para dosis basadas en los tiempos de permanencia medidos y las concentraciones del principio activo en fluidos o tejidos. Tras el tratamiento con una dosis única, puede desearse que el paciente se someta a terapia de mantenimiento en la que el principio activo se administra en dosis de mantenimiento que oscilan de 0,01 µg a 100 g por kilogramo de peso corporal, y pueden administrarse una o más veces diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente.

40 Los siguientes ejemplos ilustran la terapia de combinación de la presente invención, además de los compuestos y composiciones empleados para demostrar los principios de la invención. Los reactivos y los materiales de partida están fácilmente disponibles para un experto en la materia.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1** Los siguientes compuestos son para uso en la terapia de combinación de la presente invención.

Compuesto I (OAS de survivina)

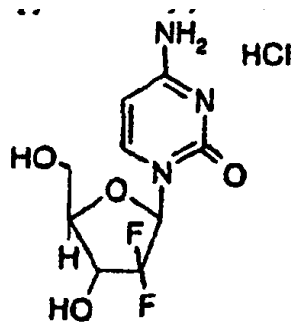


5

El compuesto I es un OAS de survivina, útil para la inhibición de expresión o sobreexpresión. El compuesto I puede prepararse mediante los siguientes procedimientos generales reconocidos como se describen en las patentes de Estados Unidos nº 6.077.709; 6.165.788; y 6.335.194.

Compuesto II (HCl de gemcitabina)

10 Monoclorhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina ( $\beta$ -isómero); o monoclorhidrato de 2',2'-difluoro-2'-desoxicitidina; o 1-(4-amino-2-oxo-1H-pirimidin-1-il)-2-desoxi-2',2'-difluororibosa.



El HCl de gemcitabina se describe en la patente de EE.UU. 5.464.826 que divulga los procedimientos para preparar el compuesto, formular el compuesto y el tratamiento de cáncer usando el compuesto.

15 Compuesto III (Paclitaxel)

13-éster de 5 $\beta$ ,20-epoxi-1,2 $\alpha$ ,4,7 $\beta$ ,10 $\beta$ -13 $\alpha$ -hexahidroxitax-11-en-9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato con (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilisoserina

El paclitaxel se divulga en las patentes de EE.UU. nº 5,496,804; 5.641,803; 5,670,537; y 6,510.398, que describen la síntesis, formulación y procedimientos de uso de paclitaxel para el tratamiento de neoplasias susceptibles. El

paclitaxel también está disponible comercialmente en Sigma-Aldrich Co.

#### Compuesto IV (HCl de doxorubicina)

5,12-Naftacenediona, 10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- $\alpha$ -L-lixo-hexopiranosil)oxi]-7,3,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-, clorhidrato

- 5 La doxorubicina HCl se puede preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. La doxorubicina también está disponible comercialmente en Sigma-Aldrich Co.

#### **Ejemplo de ensayo 1**

- 10 El ensayo de caspasa 3 basado en células descrito en el presente documento se usa habitualmente para evaluar agentes anticancerosos y se ha descrito previamente (véase Carrasco y col., BioTechnique (2003) 34:1064-1067). El ensayo se realiza como se describe a continuación.

#### Procedimientos

- 15 Se obtienen células HeLa de la ATCC, Manassas, VA y se cultivan en DMEM con medio con L-glutamina (Gibco/Invitrogen) complementado con 10% de suero bovino fetal (Hyclone), aminoácidos no esenciales 0,1 mM y piruvato de sodio 1 mM (Gibco/Invitrogen). Para el ensayo de caspasa 3, placas de 96 pocillos se siembran con  $1 \times 10^4$  células/pocillo. Se usa reactivo de transfección de lipofectina (GIBCO/Invitrogen) a una concentración de 3  $\mu$ l/ml de medio de suero reducido OPTIMEM (Gibco/Invitrogen)/compuesto I 100 nM. El reactivo de lipofectina se incuba con medio OPTIMEM durante 30 minutos antes de la adición del compuesto I. Se añaden cincuenta (50) nM del compuesto I o su oligonucleótido de control de desapareamiento (control MM) y se mezclan. Las células se lavan dos veces con solución salina tamponada con fosfato IX y luego se tratan con la mezcla de compuesto I/lipofectina en OPTIMEM. Después de un periodo de incubación de 4 h, el medio OPTIMEM se reemplaza por medio de crecimiento completo. Después de 24 horas de transfección se añaden HCl de gemcitabina 10 nM o paclitaxel 1,25 nM y se incuba durante 48 horas adicionales. Al final del periodo de incubación se añade 3X tampón de lisis (HEPES 150 mM pH 7,4, HEPES 150 mM pH 7,4, NaCl 450 mM, KCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 30 mM, EGTA 1,2 mM, NP40 al 1,5%, CHAPS al 0,3%, 30% de sacarosa, DTT 30 mM y PMSF 3,0 mM) que contiene el sustrato de caspasa 3 150  $\mu$ M Ac-DEVD-AMC (Biomol) a cada pocillo (50  $\mu$ l/pocillo) y se incuba a 37°C durante 1 hora. La actividad de la caspasa 3 se mide leyendo el flúor liberado proteolíticamente del sustrato Ac-DEVD-AMC sustrato usando un fluorómetro de lectura de placas con excitación a 360 nm y emisión a 460 nm. Después de restar el ruido de la placa, las unidades de fluorescencia relativa (UFR) se comparan con el control sin tratar y se expresan como aumento en porcentaje en la actividad de la caspasa 3.

#### 30 **Resultados**

- Para investigar si la regulación por disminución de la expresión de survivina sensibiliza a las células HeLa a quimioterapia, se evalúa el tratamiento de combinación con el compuesto I y o HCl de gemcitabina, HCl de doxorubicina o paclitaxel. Las células HeLa se transfeccionan con el compuesto I u oligonucleótido de control MM durante 24 horas y se tratan con HCl de gemcitabina 10 nM o paclitaxel 1,25 nM durante 48 horas adicionales. Al finalizar el periodo de incubación se mide la actividad de la caspasa 3. Los datos de la tabla 1 muestran que las células tumorales tratadas con el compuesto I en combinación con HCl de gemcitabina o paclitaxel producen una actividad enzimática de la caspasa 3 más que aditiva frente a cualquier agente solo. Los datos se expresan como el porcentaje de la actividad de la caspasa 3 en comparación con el control sin tratar. "S.E.M" se refiere al error estándar de la media. El tratamiento con el oligonucleótido de control MM no sensibiliza a las células tumorales ni a HCl de gemcitabina ni a paclitaxel.

**Tabla 1**

<b>Grupo de tratamiento</b>	<b>Media (% Actividad de caspasa-3)</b>	<b>SEM</b>
Gemcitabina HCl (10 nM)	24,33	2,04
Control MM (50 nM)	8,66	4,75
Compuestos I (50 nM)	29,01	3,45
Control MM (50 nM) + Gemcitabina HCl (10 nM)	9,12	2,92
Compuesto I (50 nM) + Gemcitabina HCl (10 nM)	78,13	13,63



Paclitaxel (1,25 nM)	12,77	3,49
Control MM (50 nM) +Paclitaxel (1,25 nM)	-5,79	1,90
Compuesto I (50 nM) + Paclitaxel (1,25 nM)	95,33	8,46

### Ejemplo de ensayo 2

El uso de modelos de tumor de xenoinjerto humano se ha descrito previamente y es muy conocido en la técnica. Pueden usarse los siguientes tipos de tumores para realizar el ensayo como se describe más adelante. Se obtiene glioblastoma humano U-87 MG de la ATCC (Manassas, VA, EE.UU.) (Kiaris y col., Neoplasia (2000) 2(3):242-50).

#### Procedimientos

Para estudios de xenoinjerto, justo antes de la implantación, los animales se irradian (450 de ICT (irradiación corporal total)) y las células se mezclan en matrigel (1:1). Se inyectan por vía subcutánea (s.c.) un total de  $6 \times 10^6$  células tumorales de U-87 MG en un volumen de 0,2 ml en el flanco posterior izquierdo. El tratamiento se inicia cuando el volumen tumoral alcanza aproximadamente 100 mg con una dosis de carga inicial de 50 mg/kg del compuesto I u oligonucleótido de control MM de cada uno. Todas las dosis intravenosas posteriores (25 mg/kg) del compuesto I u oligonucleótido de control MM se administran en días alternos. El tratamiento con dosis inferiores a la óptima de HCl de gemcitabina, HCl de doxorubicina o paclitaxel se inicia un día tras la dosis de carga. El HCl de gemcitabina se administra por vía intraperitoneal a 2,5 mg/kg cada tercer día durante un total de cuatro dosis. El paclitaxel se administra por vía intravenosa a 1 mg/kg cada cuarto día con un total de cuatro dosis.

Las mediciones bidimensionales se realizan dos veces a la semana y los volúmenes tumorales se calculan en base a la siguiente fórmula:  $(\text{Volumen tumoral}) = [(\text{Longitud})(\text{anchura}^2)(\pi/6)]$  Los datos del volumen tumoral se transforman en una escala logarítmica para igualar la varianza a lo largo del tiempo y los grupos de tratamiento. Los datos se analizan usando un análisis de varianza de dos vías por tiempo y tratamiento usando el software SAS PROC MIXED (SAS Institute, Inc., Cary, N.C.). El modelo de correlación preferido para las medidas repetidas es AR (autorregresivo de orden 1).

Los grupos de tratamiento se comparan en cada punto temporal. Los datos se representan como medias y errores estándar para cada grupo de tratamiento frente al tiempo. La presencia de sinergia en las terapias de combinación se evalúa en la escala de retraso del crecimiento tumoral (TGD). El tiempo hasta alcanzar un tamaño de tumor especificado (1500 o 2000 o 2500 mg en este estudio) se determina para cada animal. Los tumores que no alcanzan ese tamaño se incluyen en el análisis como valores censurados por la derecha. El análisis de máxima probabilidad suponiendo una distribución de Weibull se usa para calcular tiempos medios y errores estándar para cada grupo de tratamiento. El retraso del crecimiento tumoral es la diferencia en los tiempos medios entre cada uno de los grupos tratados y el grupo de control. Se determina que una terapia de combinación tiene un efecto sinérgico si su TGD es significativamente mayor que la suma de los TGD para las terapias individuales.

#### Resultados

En la tabla 2, los datos muestran el efecto de combinación del compuesto I con HCl de gemcitabina. La combinación produce un retraso estadísticamente significativo ( $p = 0,0092$ ) del crecimiento tumoral en comparación con cualquiera de los compuestos solos. Por tanto, la combinación del compuesto I con HCl de gemcitabina da como resultado un retraso más que aditivo en el crecimiento tumoral de 3 a 4,6 días.

**Tabla 2**

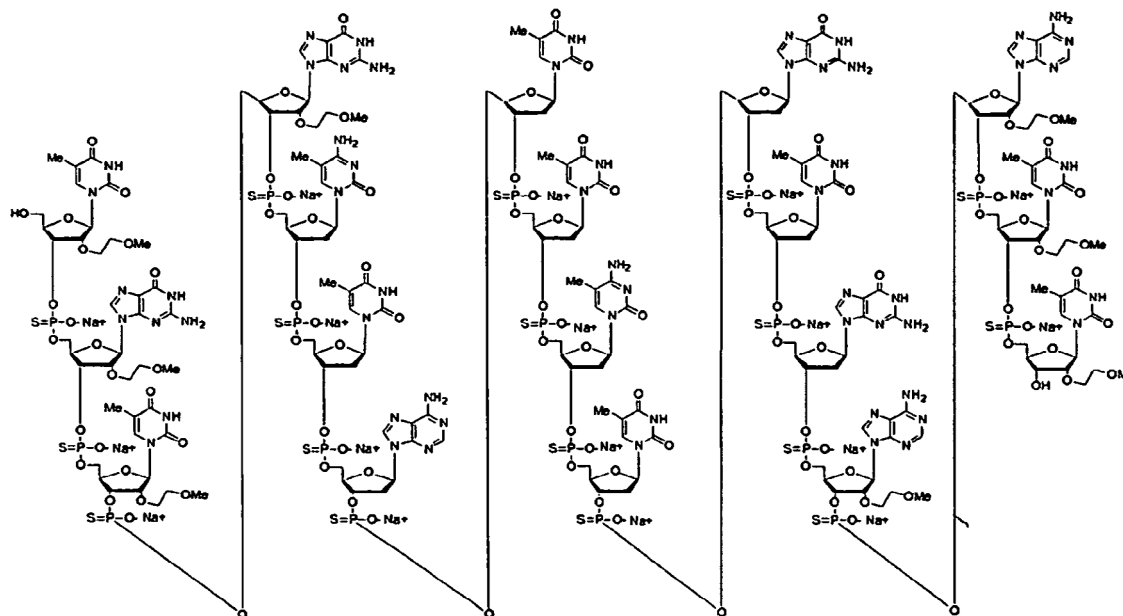
Retraso del crecimiento del tumor en:	1500 mg	2000 mg	2500 mg
Grupo	Media $\pm$ SEM (días)	Media $\pm$ SEM (días)	Media $\pm$ SEM (días)
Solución salina	0,0 $\pm$ 0,9	0,0 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,6
Gemcitabina HCl	0,3 $\pm$ 1,1	0,3 $\pm$ 1,2	0,6 $\pm$ 1
Control MM	-0,6 $\pm$ 0,9	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,9

ES 2 376 484 T3

Control MM + Gemcitabina HCl	1,1 Gemcitabina $\pm$ 0,9	1,5 $\pm$ 0,9	1,9 $\pm$ 0,8
Compuesto I	6,3 $\pm$ 0,7	8,9 $\pm$ 0,7	8,8 $\pm$ 0,5
Compuesto I + Gemcitabina HCl	10,9 $\pm$ 0,8	12,2 $\pm$ 0,9	14 $\pm$ 0,6
Efecto de interacción; Compuesto I + Gemcitabina HCl	4,3	3	4,6

REIVINDICACIONES

1. Un Compuesto I



Compuesto I

- 5 para su uso en terapia de combinación para tratar una neoplasia susceptible en un mamífero, en el que dicho medicamento es para administrarse combinado con paclitaxel y en el que dicha terapia de combinación se realiza por vía parenteral.
- 2. El compuesto I para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto I se administra de forma simultánea con la administración de dicho paclitaxel.
- 10 3. El compuesto I para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto I y dicho paclitaxel se administran por separado, en cualquier orden, dentro de un intervalo terapéuticamente eficaz.
- 4. El compuesto I para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha vía parenteral es mediante administración intravenosa.
- 5. El compuesto I para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha administración intravenosa es mediante infusión lenta.
- 15 6. El compuesto I para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho compuesto I y dicho paclitaxel está en forma de una disolución inyectable estéril.
- 7. El compuesto I para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha neoplasia susceptible es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer hepatocelular, cáncer colorrectal y linfoma.
- 20 8. El compuesto I para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha neoplasia susceptible es cáncer hepatocelular.