

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 789**

51 Int. Cl.:
A61K 31/335 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02717548 .8**
96 Fecha de presentación: **05.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1383490**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2004**

54 Título: **Combinación de un análogo de epotilona y agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de enfermedades proliferativas**

30 Prioridad:
14.03.2001 US 275801 P
31.08.2001 US 316395 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.07.2012

73 Titular/es:
**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
ROUTE 206 AND PROVINCE LINE ROAD P.O.
BOX 4000
PRINCETON NJ 08543-4000, US**

72 Inventor/es:
LEE, Francis Y. F.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 384 789 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 un análogo de epotilona y agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de enfermedades proliferativas

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de la oncología.

Proporciona combinaciones de dos fármacos anticancerosos como se define en las reivindicaciones 1-15, así como las combinaciones para usar en el tratamiento de enfermedades antiproliferativas.

Antecedentes de la invención

10 El Instituto Nacional del Cáncer ha estimado que solo en Estados Unidos, 1 de cada 3 personas padecerá cáncer durante su vida. Además, aproximadamente del 50 % al 60 % de las personas que contraen cáncer terminarán sucumbiendo a la enfermedad. La presencia generalizada de esta enfermedad subraya la necesidad de mejorar los regímenes antineoplásicos para el tratamiento de las neoplasias malignas.

15 Debido a la amplia variedad de cánceres que se observan en la actualidad se han desarrollado numerosos agentes antineoplásicos para destruir el cáncer dentro del cuerpo. Estos compuestos se administran a pacientes de cáncer con el objetivo de destruir o, de otro modo, inhibir el crecimiento de células malignas sin alterar las células sanas normales. Los agentes antineoplásicos se han clasificado en función de su mecanismo de acción.

20 Un tipo de agente quimioterapéutico se denomina complejo de coordinación metálico. Se cree que este tipo de agente quimioterapéutico forma, principalmente, reticulaciones intercatenarias de ADN en los núcleos de las células, de modo que se evita la replicación celular. Como resultado, inicialmente se reprime el crecimiento tumoral y después se invierte. Otro tipo de agente quimioterapéutico se denomina agente alquilante. Estos compuestos funcionan insertando composiciones o moléculas extrañas en el ADN de las células cancerosas en división. Como resultado de estos restos extraños se alteran las funciones normales de las células cancerosas y se evita la proliferación. Otro tipo de agente quimioterapéutico se denomina agente antineoplásico. Este tipo de agente evita, mata o bloquea el crecimiento y la diseminación de las células cancerosas. Otros tipos más de agentes anticancerosos incluyen inhibidores no esteroideos de la aromatasas, agentes alquilantes bifuncionales etc.

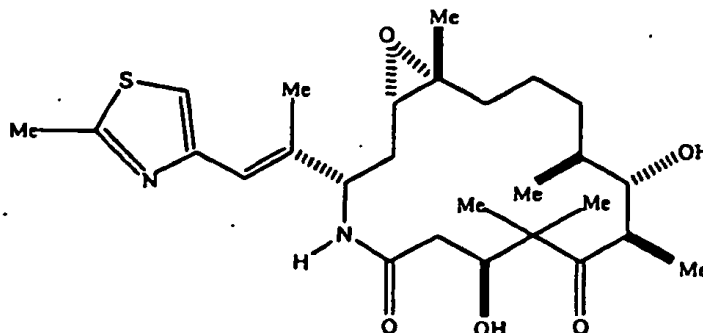
El paclitaxel representa una de las principales clases de agentes antimicrotubulares que estimula la polimerización de la tubulina y, probablemente, detiene la mitosis durante la división celular. Se ha demostrado que el taxol[®] (paclitaxel) tiene una actividad antitumoral excelente *in vivo* y se ha usado en el tratamiento de diversos cánceres, incluidos los de mama, ovarios y pulmón. Por desgracia, muchos tumores desarrollan resistencia al paclitaxel.

30 Los presentes inventores han descubierto un análogo de epotilona que actúa de forma sinérgica cuando se usa en combinación con ciertos agentes quimioterapéuticos convencionales. Es un objeto de la invención proporcionar regímenes de tratamiento de combinación de agentes quimioterapéuticos eficaces, en los que se combina un análogo de epotilona con otros agentes antineoplásicos para el tratamiento de enfermedades proliferativas.

35 En el documento WO 99/02514 se divulga el uso del compuesto derivado de epotilona 1 como se define en las reivindicaciones para el tratamiento del cáncer (reivindicación 1, página 65, compuesto 2). Se ha propuesto la combinación con otros fármacos citotóxicos. Se menciona que el derivado de epotilona se combina, preferentemente, con otros fármacos citotóxicos en los que el segundo fármaco escogido actúa en una fase del ciclo celular diferente, por ejemplo la fase S, a la fase en la que actúan los compuestos reivindicados (pág.10, l., 15-30).

Resumen de la invención

40 La presente invención proporciona combinaciones para usar en el tratamiento de enfermedades antiproliferativas, incluido el cáncer. Las combinaciones comprenden (1) al menos un agente antiproliferativo, como se define en las reivindicaciones y (2) un compuesto 1



La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica para el tratamiento sinérgico del cáncer, que comprende al menos un agente anti-proliferativo como se define en las reivindicaciones, y el compuesto 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 El agente antiproliferativo se administra de forma simultánea o antes o después de la administración del compuesto 1.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el espectro de citotoxicidad del Compuesto 1 frente a un panel de líneas de células tumorales en un ensayo de oncología de diversas células. Los gráficos de barras, a la derecha, representan los valores de CI_{50} de las líneas celulares enumeradas en la columna de la izquierda (de arriba a abajo).

10 La Figura 2 muestra un curso de tiempo del bloqueo mitótico inducido mediante incubación de células HCT116 en presencia del Compuesto 1 7,5 nm.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la actividad antitumoral comparativa del Compuesto 1 y paclitaxel frente al modelo de carcinoma de cáncer de ovarios humano scPat-7.

15 Las Figuras 5A y 5B son gráficos que muestran la actividad antitumoral comparativa de la administración oral del Compuesto 1 y la administración intravenosa de paclitaxel en el modelo de carcinoma ováricos humano Pat-7.

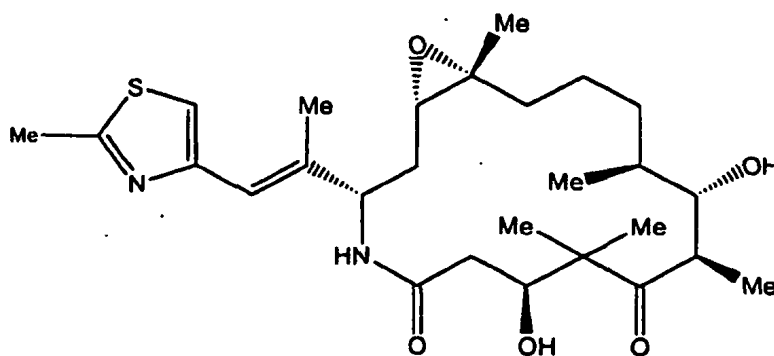
La Figura 6 es un gráfico que muestra la dependencia de la actividad antitumoral del compuesto 1 sobre el régimen de tratamiento en el modelo de cáncer de ovarios humano A2780.

Descripción detallada de la invención

20 Las epotilonas imitan los efectos biológicos del taxol (Bollag y col., Cancer Research 55: 2325-2333 (1995), y en estudios de competición actúan como inhibidores competitivos de la unión de taxol a los microtúbulos. No obstante, las epotilonas disfrutan de una ventaja significativa sobre el taxol en cuanto a que las epotilonas exhiben una disminución mucho menor de la potencia en comparación con taxol frente a una línea celular resistente a múltiples fármacos (Bollag y col. (1995)). Además, las epotilonas son exportadas desde las células por la P-glicoproteína con considerablemente menos eficiencia que el taxol (Gerth y col. (1996)).

25 El análogo de epotilona divulgado en el presente documento, cuando se usa en combinación con al menos otro(s) agente(s) anticanceroso(s) como se define en las reivindicaciones, demuestra una actividad citotóxica superior.

El análogo de epotilona para usar en la invención es [1S 1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*, 16S*]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[l-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17oxabicyclo[14.1.0]-heptadecano-5,9-diona (Compuesto 1). Este compuesto (Compuesto 1) es de fórmula:



30 El Compuesto 1, el análogo de epotilona de la invención es un análogo de epotilona semisintético y tiene un modo de acción análogo al del paclitaxel (es decir, estabilización de los microtúbulos). No obstante, en estudios de farmacología clínica, se ha demostrado que el Compuesto 1 produce una mejora significativa sobre el paclitaxel en varios aspectos clínicos. El Compuesto 1 exhibe un espectro muy impresionante y amplio de actividad antitumoral
35 contra modelos tumores de colon humanos sensibles a paclitaxel (A2780, HCT116 y LS174T) y, más importante, también frente a tumores de colon humanos resistentes a paclitaxel ((HCT116/VM46), a carcinoma de ovarios (Pat-7 y A2780Tax) y a carcinoma de mama (Pat-21). El Compuesto 1 es eficaz por vía oral; la actividad antitumoral producida tras la administración oral es comparable con la producida mediante la administración parenteral del fármaco. Estos datos de eficacia preclínica indican que el Compuesto 1 demuestra mejor eficacia clínica en los tipos
40 de enfermedad sensibles e insensibles a TAXOL®.

El compuesto 1 se administra junto con al menos un agente antineoplásico, como se define en las reivindicaciones.

Como se usa en el presente documento, la frase "agente antineoplásico" es sinónima de "agente quimioterapéutico" y/o "agente antiproliferativo" y se refiere a compuestos que previenen el cáncer o evita que las células hiperproliferativas se multipliquen. Los agentes antiproliferativos impiden que las células cancerosas del siguiente modo: (1) interfiriendo con la capacidad de las células para replicar el ADN e (2) induciendo la muerte celular y/o apoptosis en las células cancerosas.

Los agentes citotóxicos antiproliferativos que se usan de acuerdo con la invención son: cisplatino; capecitabina; inhibidores del VEGF seleccionados de anticuerpos anti-VEGF, ZD6474 y SU6668; u el anticuerpo Imclone C225 inmuno específico del EGFR.

Por tanto, las combinaciones de la presente invención se pueden usar para el tratamiento sinérgico de diversos cánceres, incluidos los siguientes:

carcinoma, incluido el de vejiga urinaria (incluido el cáncer de vejiga urinaria acelerado y metastático), de mama, de colon (incluido el cáncer colorrectal), renal, hepático, pulmonar (incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y el adenocarcinoma pulmonar), de ovarios, de próstata, de testículos, del tracto genitourinario, del sistema linfático, de recto, de laringe, de páncreas (incluido el carcinoma pancreático exocrino), de esófago, de estómago, de vesícula biliar, de cuello uterino, de tiroides y de piel (incluido carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluida leucemia, leucemia leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células peludas, linfoma de Burkitt'; tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluidas leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielóide y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso periférico y central, incluidos astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluidos fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluidos melanoma, xeroderma pigmentosum, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma.

Más preferentemente, la invención se usa para tratar los cánceres acelerados y metastásicos de la vejiga urinaria, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal y cáncer de mama.

Los expertos en la técnica conocen la administración segura y eficaz de la mayoría de estos agentes quimioterapéuticos. Además, la administración se describe en la literatura estándar.

Por ejemplo, la administración de muchos agentes quimioterapéuticos se describe en "Physicians' Desk Reference" (PDR), p. ej., edición de 1996 (Medical Economics Company, Montvale, NJ 07645-1742, EE.UU.).

El compuesto 1 puede prepararse mediante los procedimientos descritos documento WO/9902514.

La presente invención también abarca una composición farmacéutica, como se define en las reivindicaciones, útil en el tratamiento del cáncer, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las combinaciones de la presente invención, con o sin vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas sinérgicas de la presente invención comprenden un agente o agentes antiproliferativos, el compuesto 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable como se define en las reivindicaciones.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales farmacéuticamente aceptables, tales como alúmina, estabilizantes, agentes antimicrobianos, tampones, agentes colorantes, agentes aromatizantes, adyuvantes y similares. Los agentes antineoplásicos, el compuesto 1 y las composiciones de la presente invención se pueden administrar por vía oral o parenteral, incluidas las vías de administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, rectal y tópica.

Para uso oral, los agentes antineoplásicos, el compuesto 1 y las composiciones de la presente invención se pueden administrar, por ejemplo, en forma de comprimidos o cápsulas, polvos, gránulos dispersables o sellos, o en forma de soluciones o suspensiones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan habitualmente incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar, y normalmente se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los vehículos útiles incluyen lactosa, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco y azúcar. Cuando se usan suspensiones acuosas para administración oral, normalmente se añaden agentes emulsionantes y/o de suspensión.

Además, a las composiciones orales se pueden añadir agentes edulcorantes y/o aromatizantes. Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, normalmente se usan soluciones estériles del o los ingrediente(s) activo(s) y el pH de las soluciones deberá ajustarse y tamponarse de forma adecuada. Para uso intravenoso, se controlará la concentración total del o los solutos con el fin de convertir en isotónica la preparación.

Para preparar supositorios de acuerdo con la invención, primero se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, y el ingrediente activo se dispersa homogéneamente en la cera mediante, por ejemplo, agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte después en moldes de tamaño conveniente y se dejan enfriar y, de este modo, solidificar.

Las preparaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Dichas preparaciones tienen como ejemplo soluciones de agua o agua/propilenglicol para inyección parenteral. Las preparaciones líquidas pueden incluir también soluciones para administración intranasal.

5 Las preparaciones en aerosol adecuadas para inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden estar en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un gas comprimido inerte,

También se incluyen preparaciones sólidas que están destinadas a convertirse, poco antes de usar, en preparaciones en forma líquida para administración oral o parenteral. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones.

10 El compuesto 1, así como los agentes antineoplásicos, descrito en el presente documento también se pueden administrar por vía transdérmica. Las composiciones transdérmicas pueden tomar la forma de cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones, y se pueden incluir en un parche transdérmico de la matriz o un tipo reservorio como los convencionales en la técnica para este fin.

Las combinaciones de la presente invención también se pueden usar junto con otras terapias bien conocidas que se seleccionan por su utilidad concreta contra la afección que se está tratando.

15 Se formula como una dosis fija, los ingredientes activos de las composiciones de la combinación de la presente invención se usan dentro de los intervalos de dosis que se describen más adelante. Como alternativa, el antineoplásico y el compuesto 1 se pueden administrar por separado en los intervalos de dosis que se describen más adelante. En una realización preferida de la presente invención, el agente antineoplásico se administra en el intervalo de dosis que se describe más adelante después o simultáneamente a la administración del compuesto 1 en el intervalo de la dosis que se describe más adelante.

20 La Tabla I indica las combinaciones quimioterapéuticas preferidas y dosis de ejemplo para usar en los procedimientos de la presente invención. El "Compuesto de Fórmula I" es el Compuesto 1.

TABLA 1

COMBINACIÓN QUIMIOTERAPÉUTICA	DOSIFICACIÓN mg/m² (por dosis)
Compuesto de Fórmula I + cisplatino	0,1-100 mg/m ² 5-150 mg/m ²
Compuesto de Fórmula I + Gemcitabina + cisplatino	0,1-100 mg/m ² 100-3000 mg/m ² 5-150 mg/m ²
Compuesto de Fórmula I + cisplatino + paclitaxel	0,1-100 mg/m ² 5-150 mg/m ² 40-250 mg/m ²
Compuesto de Fórmula I + cisplatino + 5FU	0,1-100 mg/m ² 5-150 mg/m ² 5-5.000 mg/m ²
Compuesto de Fórmula I + radiación + 5FU + Cisplatino	0,1-100 mg/m ² 200-8.000 cGy 5-5.000 mg/m ² 5-150 mg/m ²

25 En la Tabla I anterior, "5FU" representa 5-fluorouracilo y la "leucovorina" se puede usar como leucovorina cálcica.

Aunque la Tabla I proporciona ejemplos de intervalos de dosificación del compuesto 1 y ciertos agentes anticancerosos de la invención, al formular las composiciones farmacéuticas de la invención, el clínico puede usar

5 dosificaciones preferidas según indica la afección del paciente que se esté tratando. Por ejemplo, el Compuesto 1 puede administrarse, preferentemente, a 25-60 mg/m² cada 3 semanas. Dosificaciones preferidas para cisplatino son 75-120 mg/m² administrados cada tres semanas. Cuando el procedimiento empleado usa radiación, las dosificaciones preferidas están dentro del intervalo de 200-6000 cGY. Dosificaciones preferidas para paclitaxel son 130-225 mg/m² cada 21 días. Dosificaciones preferidas para gemcitabina están dentro del intervalo de 80-1.500 mg/m² administrados semanalmente. Dosificaciones preferidas para leucovorina son 10-600 mg/m² administrados semanalmente.

10 La dosificación real usada puede variar en función de los requisitos del paciente y de la gravedad de la afección que se esté tratando. La determinación de la dosificación adecuada para una situación concreta está dentro de la experiencia en la técnica. En general, el tratamiento se inicia con dosificaciones menores que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. Después, la dosis se aumenta en pequeñas cantidades hasta que se alcanza el efecto óptimo en las circunstancias dadas. Por comodidad, la dosificación diaria total se puede dividir y administrar en porciones durante el día, si se desea. También se puede usar terapia intermitente (p. ej., una semana de cada tres semanas o tres de cada cuatro semanas).

15 Ciertos cánceres pueden tratarse de forma eficaz con el compuesto 1 y una pluralidad de agentes anticancerosos. Dichas combinaciones triples y cuádruples pueden proporcionar mayor eficacia. Cuando se usan en dichas combinaciones triples y cuádruples se pueden usar las dosificaciones indicadas anteriormente.

Al usar composiciones de la presente invención, también se pueden administrar, según se desee, otros agentes usados en la modulación del crecimiento o la metástasis tumoral en un contexto clínico, tales como antieméticos.

20 El agente neoplásico, como se define en las reivindicaciones, y el compuesto 1 se administran de forma simultánea o secuencial. Por tanto, aunque una formulación farmacéutica que comprende agente(s) antineoplásico(s) y el compuesto 1 puede ser ventajosa para administrar la combinación para un tratamiento concreto, la administración previa del o los agente(s) antineoplásico(s) puede ser ventajosa en otro tratamiento. También se entiende que la presente combinación de agente(s) antineoplásico(s) y el compuesto 1 puede usarse junto con otros tratamientos para el cáncer (preferentemente tumores cancerosos), incluidas radioterapia y cirugía. Se entiende adicionalmente que un agente citostático o quiescente, en su caso, se puede administrar secuencial o simultáneamente con cualquiera o todas las demás terapias sinérgicas.

25 Las combinaciones de la presente invención también se pueden coadministrar con otros agentes terapéuticos bien conocidos que se seleccionan por su utilidad concreta contra la afección que se está tratando. Como alternativa, las combinaciones de la presente invención pueden usarse secuencialmente con agente(s) farmacéuticamente aceptable(s) conocidos(s) cuando una formulación de combinación es adecuada.

30 El o los agente(s) quimioterapéutico(s) y/o la radioterapia se pueden administrar de acuerdo con protocolos terapéuticos bien conocidos en la técnica. Será evidente para los expertos en la técnica que la administración del o los agente(s) quimioterapéutico(s) y/o la radioterapia se puede variar en función de la enfermedad que se esté tratando y los efectos conocidos del o los agente(s) quimioterapéutico(s) y/o la radioterapia sobre dicha enfermedad. Asimismo, de acuerdo con los conocimientos del clínico experto, los protocolos terapéuticos (p. ej., cantidades de las dosis y tiempos de administración) se pueden modificar a la luz de los efectos observados de los agentes terapéuticos administrados (es decir, agente(s) antineoplásico(s) o radiación) sobre el paciente y a la luz de las respuestas observadas de la enfermedad a los agentes terapéuticos administrados.

35 El Compuesto 1 se administra de forma simultánea o secuencia junto con un agente antiproliferativo como se define en las reivindicaciones. Por tanto, no es necesario que el o los agentes quimioterapéutico(s) y el compuesto 1 se administren de forma simultánea o esencialmente simultánea. La ventaja de la administración simultánea o esencialmente simultánea está bien dentro de la determinación del clínico experto.

40 Asimismo, en general, el compuesto 1 y el o los agentes quimioterapéutico(s), como se define en las reivindicaciones, no tienen que administrarse en la misma composición farmacéutica y pueden, por diferentes características físicas y químicas, tener que administrarse por vías diferentes. Por ejemplo, el compuesto 1 se puede administrar por vía oral para generar y mantener buenos niveles en sangre del mismo, mientras que el(los) agente(s) quimioterapéuticos se pueden administrar por vía intravenosa. La determinación del modo de administración y la conveniencia de la administración, cuando sea posible, en la misma composición farmacéutica está dentro de los conocimientos del clínico experto. La administración inicial se puede realizar de acuerdo con los protocolos establecidos conocidos en la técnica y, después, en base a los efectos observados, el clínico experto puede variar la dosificación, los modos de administración y los tiempos de administración.

45 La elección concreta del compuesto 1 y del o los agente(s) citotóxico(s) antiproliferativo(s), como se define en las reivindicaciones, o la radiación dependerá del diagnóstico del los médicos de atención y su juicio de la afección del paciente y el protocolo de tratamiento adecuado.

50 Si el compuesto 1 y el o los agente(s) antineoplásico(s) no se administran de forma simultánea o esencialmente simultánea, la orden inicial de administración del compuesto 1 y el o los agente(s) quimioterapéuticos se pueden variar. Por tanto, por ejemplo, el compuesto 1 se puede administrar primero, seguido de la administración del o los

agentes antiproliferativos; o el o los agentes antiproliferativos se pueden administrar primero seguido de la administración del compuesto 1. Esta administración alternativa se puede repetir durante un único protocolo de tratamiento. La determinación del orden de administración y el número de repeticiones de administración de cada agente terapéutico durante un protocolo de tratamiento está dentro de los conocimientos del médico experto tras la evaluación de la enfermedad que se está tratando y la afección del paciente. Por ejemplo, el o los agentes antineoplásicos se pueden administrar inicialmente, especialmente si se usa un agente citotóxico. Después, el tratamiento continúa con la administración del compuesto 1 y seguido, opcionalmente, por la administración de un agente citostático, si se desea, hasta que el protocolo de tratamiento esté completo.

Por tanto, de acuerdo con la experiencia y conocimientos, el médico de atención puede modificar cada protocolo para el administración de un componente (agentes terapéutico, es decir el compuesto 1, agente(s) antineoplásico(s)) del tratamiento de acuerdo con las necesidades de cada paciente individual, a medida que el tratamiento procede.

El médico de atención, a la hora de juzgar si el tratamiento es eficaz a la dosis administrada, considerará el bienestar general del paciente así como signos más claros, tales como el alivio de los síntomas relacionados con la enfermedad, la inhibición del crecimiento tumoral la reducción real del tamaño del tumor o la inhibición de la metástasis. El tamaño del tumor se puede medir mediante procedimientos convencionales, tales como estudios radiológicos, por ejemplo CAT o RM, y se pueden usar mediciones sucesivas para juzgar si el crecimiento del tumor se ha retrasado o no o incluso si se ha invertido. El alivio de los síntomas relacionados con la enfermedad, como el dolor, y la mejora de la afección global también se pueden usar para ayudar a juzgar la eficacia del tratamiento.

Con el fin de facilitar una comprensión adicional de la invención, los ejemplos siguientes se presentan principalmente con el fin de ilustrar detalles más específicos de la misma.

Protocolo experimental

Compuestos

Las siguientes designaciones se usan para identificar los compuestos de ensayo en los ejemplos:

Compuesto 1: [1S-1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-aza-17-oxabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona

Sustancias químicas y soluciones:

A menos que se especifique lo contrario, las sustancias químicas y las soluciones usadas para el mantenimiento del cultivo celular se obtuvieron en GIBCO/ BRL. Los instrumentos para cultivo tisular estéril se obtuvieron de Corning, NY. Los demás reactivos procedían de Sigma o Fisher con el mayor grado disponible.

Administración del fármaco

Para la administración del compuesto 1 (una epitolona) a roedores se han usado dos excipientes diferentes: (1) etanol/agua 1:9, v/v) y (2) Cremophor®/ etanol/agua (1:1:8, v/v). El compuesto 1 se disolvió primero en etanol o una mezcla de Cremophor®/etanol (50:50). La dilución final a la concentración de la dosificación requerida se hace menos de 1 hora antes de la administración del fármaco. Para la administración parenteral (IV), la dilución se hizo con agua de modo que las soluciones de dosificación contienen la composición del excipiente especificada descrita anteriormente. Para la administración oral (PO), la dilución se hizo con tampón de fosfato sódico 0,25M (pH= 8,0) a una proporción de 30/70, v/v. El paclitaxel se disolvió en una mezcla de 50/50 de etanol y Cremophor® y se almacenó a 4 °C; la dilución final de paclitaxel se obtuvo inmediatamente antes de la administración del fármaco con NaCl al 0,9 %. El volumen de todos los compuestos inyectado fue de 0,01 ml/g de ratón y 0,005 ml/g de ratas.

Líneas celulares tumorales:

Las líneas celulares de carcinoma humano HCT116 y células HCT116/VM46, una variante de MDR [1], se mantuvieron en medio McCoy's 5A (GIBCO) y 10 % de suero bovino fetal al 10 % inactivado con calor (GIBCO). Las células de carcinoma ovárico humano A2780 y células A2780Tax obtenidos del Dr. Antonio Fojo (NCI, Bethesda, MD) se mantuvieron en IMEM (GIBCO) y 10% de suero bovino fetal al 10 % (GIBCO). Esta línea celular resistente a paclitaxel no sobreexpresa la P-glicoproteína pero tiene mutaciones puntuales e el isotipo M40 de la beta-tubulina [2]. La tubulina purificada aislada de estas células resistentes es refractaria a la polimerización mediante paclitaxel y se piensa que representa la resistencia a este fármaco y la sensibilidad colateral a los agentes de despolimerización de microtúbulos, tales como vinblastina.

Ensayo de citotoxicidad:

La citotoxicidad *in vitro* se evaluó en células tumorales mediante un ensayo colorimétrico basado en tetrazolio, que aprovecha la conversión metabólica de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfenil)-2H-tetrazolio, sal interna) en una forma reducida que absorbe la luz a 492 nm [3]. Las células se sembrarán 24 horas antes de la adición del fármaco. Tras una incubación durante 72 horas a 37 °C con compuesto diluido en serie, a las células se añadió MTS, en combinación con el agente de acoplamiento electrónico metosulfato de fenazina. La

incubación continuó durante 2 horas, después se midió la absorbancia del medio a 492 nm con un espectrofotómetro para obtener el número de células supervivientes respecto a las poblaciones control. Los resultados se expresan como la mediana de las concentraciones citotóxicas (valores de CI50).

Ensayo de formación de colonias de células clonogénicas:

5 Mediante un ensayo de formación de colonias se evaluó *in vitro* la potencia con el compuesto 1 y paclitaxel mata las células tumorales clonogénicas (las células que pueden dividirse indefinidamente para formar una colonia). Se determinó la concentración necesaria para matar las células de carcinoma de colon humano HCT-116 clonogénicas en un 90 % (es decir la CI₉₀). El análisis de los efectos del tratamiento de combinación *in vitro* se realizó mediante isoblograma y los procedimientos de multiplicidad descritos por Stephens and Steel [4].

10 Ensayo de polimerización de tubulina:

La potencia con la cual el Compuesto 1 y paclitaxel polimerizan la tubulina aislada de cerebro de ternero se evaluó mediante la técnica publicada [5, 6].

Animales:

15 Todos los roedores se obtuvieron de Harlan Sprague Dawley Co. (Indianapolis, Indiana) y se mantuvieron en un ambiente sin amoníaco en una colonia definida y sin patógenos. El programa de asistencia animal de Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute está completamente acreditado por la American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC).

Ensayos antitumorales *in vivo*

20 Se usaron los siguientes tumores humanos: de ovarios A2780, de ovarios A2780Tax (establecido a partir de las células obtenidas del Dr. Antonio Fojo, Medicine Branch, NCI, Bethesda, MD), de colon HCT116/VM46, de ovarios Pat-7 (establecidos de una biopsia tumoral proporcionada por el Dr. Thomas Hamilton, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA) de un paciente que había desarrollado resistencia a TAXOL®). También se empleó el fibrosarcoma murino M5076.

25 Los tumores humanos se mantuvieron en ratones atímicos Balb/c nu/nu. M5076 se mantuvo en ratones C57BL/6. Los tumores se propagaron como trasplantes subcutáneos en la cepa de ratón adecuada usando fragmentos de tumor obtenidos de ratones donantes.

30 Los tumores siguientes se pasaron en la cepa huésped de ratón indicada: fibrosarcoma M5076 murino (M5076) en ratones C57Bl/6-, carcinomas de ovarios humanos A2780 y Pat-7, carcinoma de colon HCT116, HCT116/VM46 y LS174T, carcinoma de mama Pat-21 en ratones atímicos. El paso del tumor se produjo dos veces a la semana para tumores murinos y aproximadamente cada de dos a ocho semanas para las diversas líneas tumorales humanas. Con respecto a los ensayos de eficacia se implantaron tumores M5076 en ratones híbridos (C57Bl/6 x DBA/2)F1 y tumores humanos en ratones atímicos. Todos los implantes tumorales para los ensayos de eficacia se realizaron por vía subcutánea (sc).

35 El número requerido de animales necesarios para detectar una respuesta significativa se agruparon al inicio del experimento y a cada uno se le realizó un implante subcutáneo de un fragmento de tumor (• 50 mg) con un trocar de 13 gauge. Para el tratamiento de tumores en estadio precoz, se agruparon de nuevo los animales antes de la distribución a los diversos grupos de tratamiento y control. Para el tratamiento de animales con enfermedad en estadio avanzado se dejaron crecer los tumores hasta la ventana de tamaño predeterminado (se excluyeron los tumores fuera de los límites) y los animales se distribuyeron de forma uniforme a diversos grupos de tratamiento y control. El tratamiento de cada animal se basó en el peso corporal individual. Se comprobó en los animales tratados la existencia de toxicidad/mortalidad relacionada con el tratamiento a diario. Cada grupo de animales se pesó antes del inicio del tratamiento (St1) y, después, de nuevo, tras la última dosis de tratamiento (St2). La diferencia en el peso corporal (St2-St1) proporciona una medida de la toxicidad relacionada con el tratamiento.

45 La respuesta tumoral se determinó mediante la medición de los tumores con un compás dos veces a la semana, hasta que los tumores que alcanzan un tamaño “diana” predeterminado de 1 g. Los pesos tumorales (mg) se estimaron a partir de la fórmula:

$$\text{Peso tumoral} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2) \div 2$$

50 La actividad antitumoral se evaluó a la dosis máxima tolerada (DMT), que se define como el nivel de dosis inmediatamente por debajo de la que produjo una toxicidad excesiva (es decir, más de una muerte). La DMT con frecuencia fue equivalente a la DO. Cuando se produjo la muerte se registró el día de la muerte. Los ratones tratados que murieron antes de que sus tumores alcanzaran el tamaño diana se consideró que habían muerto por toxicidad relacionada con el fármaco. Ningún ratón del grupo control murió con tumores con un tamaño menor que el tamaño diana. Se consideró que los grupos de tratamiento con más de una muerte producida por toxicidad relacionada con el fármaco habían tenido tratamientos excesivamente tóxicos y sus datos no se incluyeron en la evaluación de la eficacia antitumoral del compuesto.

El criterio de valoración de la respuesta del tumor se expresó en términos de retraso del crecimiento tumoral (valor T-C), definido como la diferencia en tiempo (días) requerido para que los tumores tratados (T) alcanzaran un tamaño diana predeterminado en comparación con los del grupo control (C).

5 Para estimar la muerte de las células tumorales, primero se calculó el tiempo de duplicación del volumen tumoral con la fórmula:

TVT= Mediana del tiempo (días) para que los tumores control alcancen el tamaño diana—mediana del tiempo (días) para que los tumores control alcancen la mitad del tamaño diana

y

10 **Log de muerte celular= T-C ÷ (3,32 X TCDT)**

Las evaluaciones estadísticas de los datos se realizaron usando la prueba de Wilcoxon generalizada de Gehan [7].

Ejemplo I (Referencia)

El compuesto 1 demuestra citotoxicidad contra las células cancerosas in vitro

15 El compuesto 1 tiene una actividad de amplio espectro contra un panel de líneas de células tumorales *in vitro*. De las 21 líneas celulares analizadas (Figura 1), 18 tienen valores de CI₅₀ entre 1,4-6 nM. Tres líneas celulares tienen valores de CI₅₀ superiores a 6 nM. frente a dos líneas de tumor de colon altamente resistentes a múltiples fármacos (MDR) HCT116/VM46 (24,5 nM) y MIP (24,8 nM) y la línea celular de fibroblastos de pulmón de ratón normal ((34,5 nM). Cabe destacar el Compuesto 1 "superó" sustancialmente la resistencia a múltiples fármacos inherente en estas líneas celulares. Por tanto, para paclitaxel, las proporciones de las concentraciones (R/S, o proporción de resistencia) requeridas para inhibir el crecimiento celular en un 50 % en estas líneas resistentes frente a las 20 requeridas para la línea HCT116 sensible fueron 155 y <<55 respectivamente, para HCT116/VM46 y MIP. En comparación, las proporciones R/S para el Compuesto 1 fueron solo 9,4 y 9,5, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Citotoxicidad in vitro del Compuesto 1 y Paclitaxel en líneas de células tumorales sensibles y resistentes a paclitaxel.			
<u>CI₅₀, nM (proporción de resistencia)</u>			
Compuesto	HCT-116	HCT-116/VM46	MIP
Paclitaxel	2,1	326 (155)	>>112 (<<53)
Compuesto 1	2,6	24,5 (9,4)	24,8 (9,5)

Mecanismo de citotoxicidad- Polimerización de tubulina

25 Las actividades citotóxicas de las epotilonas, como las de los taxanos, se han relacionado con la estabilización de los microtúbulos, lo que tiene como resultado la detención de la mitosis en la transición G2/M. A este respecto la potencia, la potencia del Compuesto 1 es similar a las de sus dos análogos naturales, las epotilonas A y B (Tabla 3).

Tabla 3. Potencia de la polimerización de tubulina de tres epotilonas en relación con paclitaxel		
Análogo	Potencia de la polimerización, CE _{0,01} (μM)	Proporción de la potencia de la polimerización del análogo/paclitaxel
Compuesto 1	3,5	0,4
(Epotilona A)	2,0	0,4
(Epotilona B)	1,8	0,3
Paclitaxel	8,5, 5,0, 6,0	1,0

Ejemplo 2 (referencia):

El compuesto 1 inhibe la progresión del ciclo celular

De forma similar al paclitaxel, el Compuesto 1 bloquea las células en la fase mitótica del ciclo de división celular. Además, la concentración del Compuesto 1 necesaria para detener las células en la mitosis se corresponde bien con la concentración requerida para matar las células sobre la misma duración del tratamiento. Por tanto, como se muestra en la Figura 2, el Compuesto 1, a una concentración cercana al valor de la CI90 (•7.5 nM), bloquea casi completamente las células en mitosis en 8 horas.

Ejemplo 3

Quimioterapia de combinación *in vitro*

El éxito de un agente anticanceroso depende no solo de su actividad antitumoral como agente único, sino también de su capacidad para combinarse con éxito con otros fármacos antineoplásicos. Como el paclitaxel, el Compuesto 1 induce una profunda perturbación en el ciclo celular deteniendo las células en la mitosis. Por estas razones, es particularmente pertinente investigar el comportamiento del Compuesto 1 cuando se usa quimioterapia de combinación. Los ensayos de formación de colonias se usaron para analizar la citotoxicidad del Compuesto 1 en combinación con varios agentes anticancerosos seleccionados de diversos mecanismos de acción *in vitro*.

Los análisis en isoblogramas mostraron que el modo de interacción entre el Compuesto 1 y otros agentes citotóxicos *in vitro* depende del fármaco, la secuencia y la dosis, y puede variar desde sinergia a antagonismo (Tabla 4).

En el caso del cisplatino, se observó adición o suma cuando los dos agentes se usaron secuencialmente, pero se obtuvo sinergia para el tratamiento simultáneo.

Tabla 4. El efecto de la secuencia de la exposición al fármaco sobre la interacción citotóxica entre el Compuesto 1 y otros cinco agentes antineoplásicos en la línea celular de carcinoma de colon humano HCT116

Secuencia de la combinación	Modo de interacción
+ Cisplatino (daña el ADN)	
Compuesto 1 → Cisplatino	Adición
Cisplatino → Compuesto 1	Adición
Simultáneo	Sinergia

Ejemplo 4 (Referencia):

Actividad antitumoral mediante administración parenteral

El Compuesto 1 se evaluó en un panel de ocho modelos de tumores humanos y murinos. Se escogieron cinco por su resistencia al paclitaxel (Tabla 5) y se incluyeron tres modelos sensibles a paclitaxel con el fin de obtener una evaluación completa del espectro de actividad antitumoral del Compuesto 1.

Modelos de tumor refractarios a paclitaxel

1. Modelo de carcinoma ovárico resistente a TAXOL® derivado clínicamente de Pat-7

Este modelo de tumor se estableció a partir de una biopsia tumoral de un paciente de cáncer de ovarios (Pat-7), que inicialmente respondió al tratamiento con TAXOL® pero que, en última instancia, desarrolló resistencia a él tras nueve cursos de monoterapia con TAXOL®. Antes del tratamiento con TAXOL®, Pat-7 también recibió otros numerosos agentes quimioterapéuticos, incluidos carboplatino, citoxan, VP-16, ifosfamida y altretamina. Se tomó la biopsia tumoral tras el desarrollo de resistencia a TAXOL®.

El Compuesto 1 se administró a ratones atímicos portadores de tumores estatificados usando un programa de cada 2 días x 5. Una dosis óptima fue altamente activa, provocando 2,1 y 4,5 LCK en dos ensayos distintos (Tabla 6 y figura 4). Evaluado a la vez,, el paclitaxel IV dio 0,6 y 1,3 LCK, respectivamente, a su dosis y programa óptimos.

Para evaluar la actividad del Compuesto 1 en una segunda especie se implantó Pat-7 en ratas atímicas inmunocomprometidas y se administró el Compuesto 1 en un programa IV, cada 8 días x 2 (Tabla 6). A la dosis óptima de 3 mg/kg/inj., el Compuesto 1 era altamente activo, produjo 4 de 6 curaciones. En comparación, el paclitaxel produjo 2,2 LCK a su dosis óptima, y ninguna curación (n= 6).

2. *Xenoinjerto de carcinoma ovárico humano A2780Tax (tubulina mutada)*

5 A2780Tax es un modelo de carcinoma de ovarios humano resistente a paclitaxel. Se obtuvo de la línea A2780 parental sensible mediante coincubación de células con paclitaxel y verapamilo, un agente de inversión de MDR. Se ha demostrado que su mecanismo de resistencia no está relacionado con MDR y se atribuye a una mutación en el gen que codifica la proteína beta-tubulina [2].

El Compuesto 1 administrado a ratones portadores de tumores estadificados usando un programa de cada 2 días x 5 dio 2,5 LCK a su DMT (6,3 mg/kg/iny.). En comparación, el paclitaxel IV dio 0,8 LCK a su DMT. El Compuesto 1 es significativamente mejor que el paclitaxel en este ensayo (Tabla 6).

3. *Xenoinjerto de carcinoma de colon humano HCT116/VM46 (resistente a múltiples fármacos)*

10 HCT116/VM46 es un carcinoma de colon resistente a MDR desarrollado a partir de la línea parental HCT116 sensible. In vivo, en ratones atímicos, se ha demostrado de forma consistente que HCT116/VM46 es muy resistente al paclitaxel (Tabla 5). En 12 estudios consecutivos, el paclitaxel, a su DMT, provocó LCK bajas que variaron de 0-0,9 (mediana = LCK 0,35).

15 El tratamiento con el Compuesto 1 de ratones portadores de tumores HCT116/VM46 estadificados usando un programa de cada 2 días x 5 produjo efectos antitumorales significativos. A su dosis óptima (4,8-6,3 mg/kg/iny.) en 3 estudios distintos, el Compuesto 1 di 3,1, 1,3 y 1,8 LCK. En contraste, evaluado a la vez, el paclitaxel IV dio 0,4 y 0,7 LCK, respectivamente, a su DMT en los primeros dos ensayos.

4. *Pat-21, Modelo de cáncer de mama resistente a paclitaxel derivado clínicamente*

20 El Pat-21 es un modelo de tumor resistente a paclitaxel de primer pase establecido a partir de una biopsia tumoral de un paciente de cáncer de mama con enfermedad metastásica al que se le administró, pero no respondió, una terapia experimental consistente en 5 ciclos de TAXOL® en combinación con el agente de inversión de resistencia a múltiples fármacos dexverapamilo. Antes de la terapia con TAXOL®, el paciente también recibió quimioterapia consistente en adriamicina, citoxan, metotrexato y 5-FU. Se obtuvieron biopsias tumorales tras la suspensión de la terapia con TAXOL®.

25 Pat-21 crece a una velocidad lenta relativa en ratones atímicos, de modo que dobla su volumen aproximadamente cada 3 semanas. Para una evaluación de la eficacia antitumoral se administraron dos cursos del Compuesto 1 o paclitaxel a ratones portadores de tumores Pat-21 estadificados a aproximadamente 100 mg. Los dos cursos se separaron en un intervalo de 3 semanas. Cada curso consistió en 3 dosis administradas cada 4 días. El paclitaxel fue completamente inactivo contra este modelo, de modo que dio 0,3 LCK a su DMT de 36 mg/kg/iny. En contraste con ello, el Compuesto 1 fue significativamente activo, dando actualmente un valor de LCK de > 1,5 LCK a su dosis óptima de 10 mg/kg iny.

5. *Modelo de sarcoma murino M5076*

35 El M5076 es un fibrosarcoma de ratón que es refractario de forma inherente al paclitaxel *in vivo*. El Compuesto 1, analizado IV con un programa de cada 2 días x 5 frente a los tumores sc no estadificados, fue inactivo a su DMT de 8,4 mg/kg/iny., de modo que dio 0,5 y 0,7 LCK, respectivamente, en dos experimentos separados (Tabla 6). Analizado de forma concomitante, el paclitaxel IV administrado según su programa óptimo, también fue inactivo y dio 0,1 y 0,5 LCK respectivamente.

En un estudio aparte, el Compuesto 1 se administró mediante un programa de dosificación menos frecuente (cada 4 días x 3) y se demostró una mejor actividad antitumoral, de modo que dio 1,0 LCK a la DMT de 24 mg/kg/iny.

Tabla 5. Características del modelo tumoral

Tumor	Histología	Sensibilidad al paclitaxel	Mecanismo(s) de resistencia
Humano			
Pat-7	Ovarios	Resistente ¹	MDR, MRP ²
A2780Tax	Ovarios	Resistente	Mutación de tubulina
HCT116/VM46	Colon	Resistente	MDR
Pat-21	Mama	Resistente ¹	Desconocido
A2780	Ovarios	Sensible	-
HCT116	Colon	Sensible	-

LS174T	Colon	Sensible	-
Murino M5076	Fibrosarcoma	Resistente	Desconocido, no MDR

¹Resistencia clínica al TAXOL

²MIP= proteína relacionada con la resistencia a múltiples fármacos

Tabla 6 Actividad antitumoral preclínica del Compuesto 1 y Paclitaxel frente a tumores resistentes a paclitaxel					
Tumor	Nº export.	Compuesto 1			PACLITAXEL LCK ^{2,3}
		Reg., programa	DO ¹ (mg/kg)	LCK ² (curaciones/total)	
Tumores humanos en ratones atímicos					
Pat-7	R403	IV, c2dx5	4,8	2,1	0,6
	8	IV, c2dx5	6,3	4,5	1,3
	12	IV, c2dx5	6,3	2,1	
A2780Tax	12	IV, c2dx5	6,3	2,5	0,8
HCTVM4	32	IV, c2dx5	4,8	3,1	0,4
6	33	IV, c2dx5	4,8	1,3	0,7
	35	IV, c2dx5	6,3	1,8	NR ⁴
	35	IV, c4dx3	16	2,0	NR ⁴
Respuestas previas al paclitaxel en 12 estudios consecutivos			(0,4,0,7,0,4,0,3,0,3,0,0,0,2,0,1,0,9,0,9,0,3,0,3)		
Pat-21	R667	IV c4dx3 41,68	10	>1,5 ⁵	0,3
Tumores humanos en ratas atímicas					
Pat-7	15	IV c8dx2	3	>5(4,6)	2,2 (0/6)
Tumores murinos					
M5076	159	IV c2dx5	8,4	0,5	0,1
	162	IV c2dx5	8,4	0,7	0,5
	172	IV c4dx3	24	1,0	NR

¹DO, dosis óptima o dosis máxima tolerada (DMT).

²LCK, log de muerte celular. Cuando el 50 % o más de los animales tratados se curan, el valor de LCK se calcula en base a las mediciones del tumor de la última fecha disponible antes de declarar la curación y representa una estimación mínima (>). En dichos casos también se describen las tasas de curación.

³LCK son para la dosis óptima (la dosis varía de 24-36 mg/kg/inj.), o dosis más elevada analizada en caso de que sea inactivo.

⁴NR, no realizado.

⁵Estudio en progreso. Análisis provisional basado en los datos de medición del tumor la última fecha disponible (6/8/99) indica el retraso del crecimiento tumoral equivalente a al menos 1,5 LCK.

Modelos de tumor sensible a paclitaxel

1. Modelo de carcinoma de ovarios A2780

- 5 El A2780 es un modelo de carcinoma de ovarios humano de crecimiento rápido que es muy sensible al paclitaxel (Tabla 6). Ratones atímicos portadores de tumores estatificados se trataron con el Compuesto 1 usando el "programa optimizado con paclitaxel" de administración IV cada 2 días para un total de 5 inyecciones (cada 2 días x 5). A la dosis máxima tolerada (6,3 mg/kg/inj.), el compuesto 1 es muy activo, de modo que da > 4,8, 2 y 3,1 LCK en 3 estudios distintos. Evaluado a la vez, el paclitaxel IV incluido en los primeros dos estudios, dio 2 y 3,5 LCK, respectivamente, a su dosis óptima.
- 10

También se usó el A2780 en ratas atímicas. El Compuesto 1, analizado a su DMT (1,2 mg/kg/inj.) y administrado cada 2 días x 5, fue inactivo cuando se analizó (0,3 LCK). El paclitaxel IV analizado de forma concomitante fue altamente activo, proporcionó 5 de 7 curaciones en este estudio. En los estudios posteriores en ratones con los tumores A2780 se ha demostrado que una dosis menos frecuente del compuesto 1 se tolera mejor y da una actividad mejorada (véase la Tabla 6). Por tanto, la falta de actividad en ratas atímicas para el Compuesto 1 puede deberse al programa de tratamiento subóptimo empleado. Por ejemplo, en estudios posteriores usando los tumores Pat-7 resistentes a paclitaxel, se demostró que el compuesto 1 poseía una actividad antitumoral significativa cuando se administró a un programa de dosificación menos frecuente de cada 8 días x 2 (Tabla 6).

2. Modelo de carcinoma de colon humano HCT116

HCT116 es un modelo de carcinoma de colon humano que se ha demostrado que es muy sensible al paclitaxel *in vivo*. El Compuesto 1 administrado a ratones atímicos portadores de tumores HCT116 estadiados (- 100 mg) es muy activo, produce > 6,3 LCK y un gran número de curaciones a tres programas de tratamiento diferentes: cada 2 días x 5 dosis, cada 4 días x 3 y cada 8 días x 2 (Tabla 7). No obstante, estas actividades, aunque impresionantes, eran comparables, pero no superiores, a los resultados anteriores obtenidos para paclitaxel administrado a su dosis y programa óptimos.

3. LS174T.

LS174T es un modelo de carcinoma de colon humano que se sabe que es sensible al paclitaxel. El Compuesto 1, administrado cada 4 días x 3 produjo 2,3 LCK a su DMT de 16 mg/kg/inj. En comparación, el paclitaxel IV analizado de forma concomitante dio 2,0 LCK a su régimen óptimo de 36 mg/kg/inj., administrados cada 2 días para 5 dosis (Tabla 7).

Tabla 7 Actividad antitumoral preclínica del Compuesto 1 y Paclitaxel frente a tumores sensibles a paclitaxel

Tumor	Nº export.	Compuesto 1			Paclitaxel LCK ^{2,3}
		Reg., programa	DO ¹ (mg/kg)	LCK ² (curaciones/total)	
Tumores humanos en ratones atímicos					
A2780	89	IV, c2dx5	6,3	> 4,8 (3/7)	2
	92	IV, c2dx5	6,3	2	3,5
	111	IV, c2dx5	4,8	3,1	NR ⁴
	115	IV, c2dx5	6,3	2,4	NR
	115	IV, c4dx3	16	> 5,3	NR
HCT116	52	IV, c2dx5	6,3	> 6,3 (4/8)	NR
	52	IV, c4dx3	10	> 6,3 (5/8)	NR
	52	IV, c8dx2	24	> 6,3 (8/8)	NR
LS174T	R578	IV, c4dx3	16	2,3	2,0

¹DO, dosis óptima o dosis máxima tolerada (DMT).
²LCK, log de muerte celular. Cuando el 50 % o más de los animales tratados se curan, el valor de LCK se calcula en base a las mediciones del tumor de la última fecha antes de la curación y representa una estimación mínima de LCK (>). En dichos casos también se describen las tasas de curación.
³LCK son para la dosis óptima (la dosis varía de 24-36 mg/kg), o dosis más elevada analizada en caso de que sea inactivo.
⁴NR, no realizado.

Ejemplo 5 (Referencia):

Actividad antitumoral mediante la vía oral de administración

El hecho de que el Compuesto 1 es significativamente más estable a pH neutro que a un pH bajo proporcionado por el ímpetu para la evaluación del Compuesto 1 mediante administración oral (PO) en un vehículo tampón de pH (fosfato potásico 0,25M, pH 8,0). Usando un programa cada 2 días x 5, el Compuesto 1 fue muy activo por vía oral contra los modelos de carcinoma ovárico humano Pat-7. En dos estudios distintos, el Compuesto 1 oral dio 3,1 y 2,5 LCK a su DMT (Figura 5 y Tabla 8). En comparación, el paclitaxel IV analizado de forma concomitante produjo 1,3 y 1,2 LCK, respectivamente, a su dosis y programa óptimos.

En el modelo de carcinoma de colon humano HCT116, el Compuesto 1 administrado por vía oral curó siete de ocho ratones cuando se administró a una dosis de 90 mg/kg/adm., cada 2 días para 5 dosis. Obsérvese que este grado de actividad antitumoral fue equivalente al obtenido mediante el mejor régimen IV analizado de forma concomitante

(cada 8 días x 2, véase la Tabla 6).

Tabla 8 Actividad antitumoral del Compuesto 1 oral y Paclitaxel IV					
Tumor	Nº export.	Compuesto 1 (PO)			Paclitaxel (IV) LCK ^{2,3}
		Reg., programa	DO ¹ (mg/kg)	LCK ² (curaciones/total)	
Pat-7	8	PO, c2dx5	60	3,1	1,3
	9	PO, c2dx5	80	2,5	1,2
HCT116	52	PO, c2dx5	90	> 6,3 (7/8)	NR ⁴

¹DO, dosis óptima o dosis máxima tolerada (DMT).
²LCK, log de muerte celular. Cuando el 50 % o más de los animales tratados se curan, el valor de LCK se calcula en base a las mediciones del tumor de la última fecha antes de la curación y representa una estimación mínima de LCK (>). En dichos casos también se describen las tasas de curación.
³LCK son para la dosis óptima (la dosis varía de 24-36 mg/kg), o dosis más elevada analizada en caso de que sea inactivo.
⁴NR, no realizado.

Dependencia del programa

- 5 Se realizaron varios estudios para evaluar la dependencia del programa del Compuesto 1. En el primer estudio, usando los tumores A2780, el Compuesto 1 se administró a los ratones mediante dos programas diferentes: (1) el programa tradicional (optimizado para paclitaxel) cada 2 días x 5 y (2) el programa menos frecuente cada 4 días x 3. Aunque ambos programas eran activos, dando 2,4 y > 5,3 LCK, respectivamente, el programa de dosificación menos frecuente permite administrar un nivel de dosis más elevado (DMT= 16 mg/kg/inj.) y funcionó mucho mejor que el programa más frecuente (DMT= 6,3 mg/kg/inj.) (Figura 6 y Tabla 9).
- 10 En un segundo estudio, en el modelo de carcinoma de colon humano HCT116, se usaron tres programas de tratamiento diferentes. c2dx5, c4dx3, así como c8dx2. Todos los tratamientos fueron IV y los tumores se clasificaron hasta 100 mg al inicio del tratamiento. Los mejores resultados se obtuvieron con el programa de tratamiento c8dx2. A la dosis óptima de 24 mg/kg/inj., el Compuesto 1 produjo un 100% de curaciones (8 de 8 ratones). Los programas de c4dx3 y c2dx5 dieron curaciones en 5 de 8 y 4 de 8 ratones, respectivamente (Tabla 9).
- 15 En otros dos estudios, usando los tumores Pat-7 y HCT116/VM46, se comparó la eficacia de dos programas de tratamiento IV: c2dx5 y c4dx3. En ambos casos, los dos programas dan actividades antitumorales esencialmente equivalentes (Tabla 9).

Tabla 9. Dependencia de programa de la actividad antitumoral del Compuesto 1.				
Tumor	Nº export.	Compuesto 1		
		Reg., programa	DO ¹ (mg/kg)	LCK ² (curaciones/total)
A2780	115	IV, c2dx5	6,3	2,4 (0/8)
	115	IV, c4dx3	16	>5,3 (3/7)
HCT116	52	IV, c2dx5	6,3	> 6,3 (4/8)
	52	IV, c4dx3	10	> 6,3 (5/8)
	52	IV, c8dx2	24	> 6,3 (8/8)
Pat-7	12	IV, c2dx5	6,3	2,1
	12	IV, c4dx3	15	1,7
HCT116/VM46	35	IV, c2dx5	6,3	1,8
	35	IV, c4dx3	16	2,0

¹DO, dosis óptima o dosis máxima tolerada (DMT).
²LCK, log de muerte celular. Cuando el 50 % o más de los animales tratados se curan, el valor de LCK se calcula en base a las mediciones del tumor de la última fecha antes de la curación y representa una estimación mínima de LCK (>). En dichos casos también se describen las tasas de curación.

20 El Compuesto 1 ha mostrado claramente actividad antitumoral superior a paclitaxel en cinco tumores resistentes a paclitaxel:

5 - cuatro xenoinjertos de tumor humano y un tumor murino: el carcinoma ovárico Pat-7 resistente a paclitaxel derivado clínicamente; el carcinoma ovárico A2780Tax que es resistente a paclitaxel por la mutación de tubulina; el carcinoma de colon HCT116/VM46 MDR, el carcinoma de mama Pat-21 resistente a paclitaxel derivado clínicamente y el fibrosarcoma murino M5076. De nuevo, res xenoinjertos de tumor humano sensible a paclitaxel, el Compuesto 1 produjo actividad antitumoral equivalente al carcinoma ovárico A2780Tax:paclitaxel; carcinoma de colon humano HCT116 y LS174T. Además, el Compuesto 1 es activo por vía oral y produce una actividad antitumoral por vía oral que es equivalente a la producida mediante administración IV del fármaco en os xenoinjertos tumorales humanos diferentes.

Ejemplo 6 (Referencia):

10 Estudios farmacológicos del compuesto 1 solo y en combinación con otros agentes antineoplásicos en pacientes con cáncer avanzado

15 Dados los efectos citotóxicos del Compuesto 1 tanto in vivo como in Vitro, se están realizando ensayos clínicos de fase I para evaluar la citotoxicidad en paciente con cáncer avanzado. Se evaluó a los pacientes con cáncer ovárico peritoneal, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, melanoma y cáncer primario desconocido para determinar una respuesta objetiva. El Compuesto1 se administró en dosis crecientes que variaron de 7,4 mg/m² a 65 mg/m². Estos estudios revelaron la DMT. La dosis recomendada para los ensayos clínicos de Fase II es 50 mg/m² usando un programa cada 3 semanas.

20 El Compuesto 1 también se está evaluando en estudios de fase I en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. El Compuesto 1 se administrará a una dosis inicial de 30 mg/m² en combinación con carboplatino a 6 AUC usando el programa de cada 3 semanas. Se están realizando otros estudios para evaluar la eficacia de la administración combinada del Compuesto 1 a 30 mg/m² y doxorubicina a 50 mg/m² usando un programa de cada 3 semanas. También se están realizando regímenes quimioterapéuticos de combinación en los que el Compuesto 1 a 30 mg/m² se combina con CPT-11 a 150 mg/m².

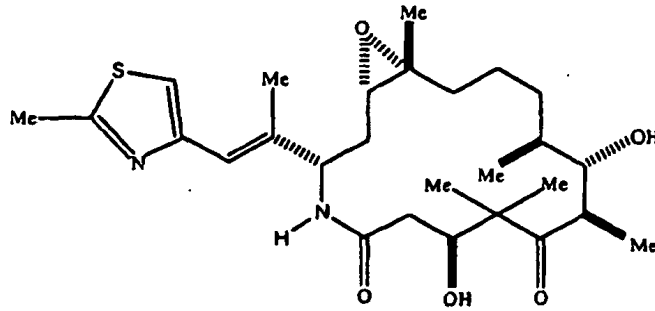
25 El Compuesto 1 también se está realizando en ensayos clínicos de fase II sobre pacientes de cáncer que no han respondido a regímenes de tratamiento usando taxanos, antraciclinas, platino y 5FU en combinación con CPT-11. En estos estudios, el Compuesto 1 se administrará usando un régimen de dosificación consistente en 50 mg/m² de infusión intravenosa durante 1 hora cada tres semanas para 18 ciclos (RP y SD) o 4 ciclos tras RC.

REFERENCIAS

- 30 1. Long BH, y col., Mechanisms of resistance to etoposide and teniposide in acquired resistant human colon and lung carcinoma cell lines. *Cancer Research*, 1991. 51: 5275-5284.
2. Giannakakou P, y col., Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J. Biol. Chem.*, 1997. 272(27): 17118-25.
3. Riss TL, y col. Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Molecular Biology of the Cell*, 1992. 3 (suppl.): 184a.
- 35 4. Stephens TC, Steel GG. The evaluation of combinations of cytotoxic drugs and radiation: Isobolograms and therapeutic synergism. In, *Rodent tumor models in experimental cancer therapy*, pp. 248. Ed. Robert F. Kallman. Pergamon Press, NY.
- 40 5. Long BH, Fairchild CR. Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G (1) phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telophase. *Cancer Research*, 1994. 54(16): 4355-4361.
6. Williams, RC, Lee, JC. Preparation of tubulin from brain. *Methods in Enzymology*, 1982. 85(Part D): 376-385.
7. Gehan, GA. A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly-censored samples. *Biometrika*, 1985. 52: 203-233.

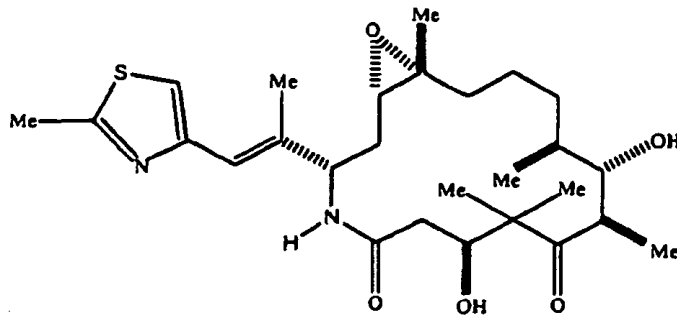
REIVINDICACIONES

1. Cisplatino y un compuesto que tiene la fórmula,



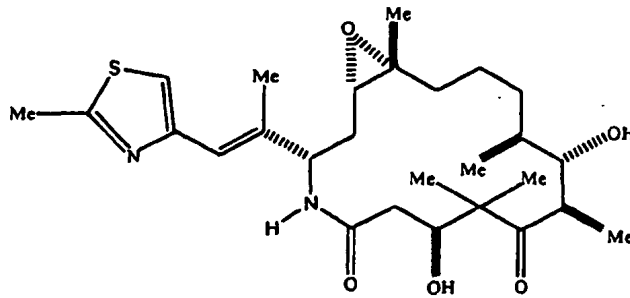
para uso en terapia.

5 2. Cisplatino y un compuesto que tiene la fórmula,



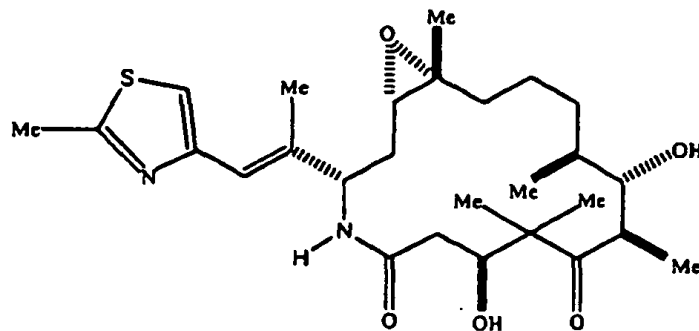
para uso en el tratamiento del cáncer.

3. Uso de cisplatino y un compuesto que tiene la fórmula,



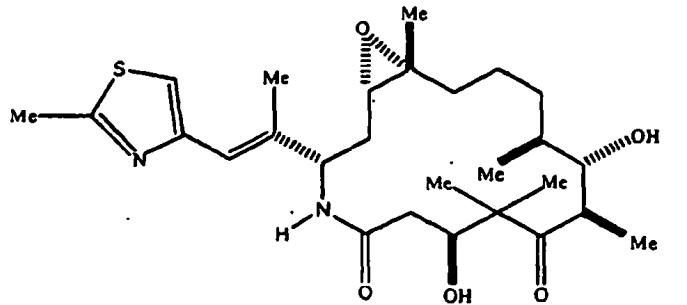
10 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

4. El anticuerpo C225 inmunoespecífico para el EGFR y un compuesto que tiene la fórmula,



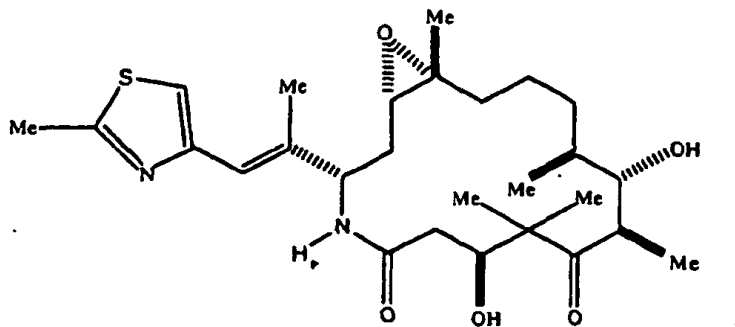
para uso en terapia.

5. El anticuerpo C225 inmunoespecífico para el EGFR y un compuesto que tiene la fórmula,



para uso en el tratamiento del cáncer.

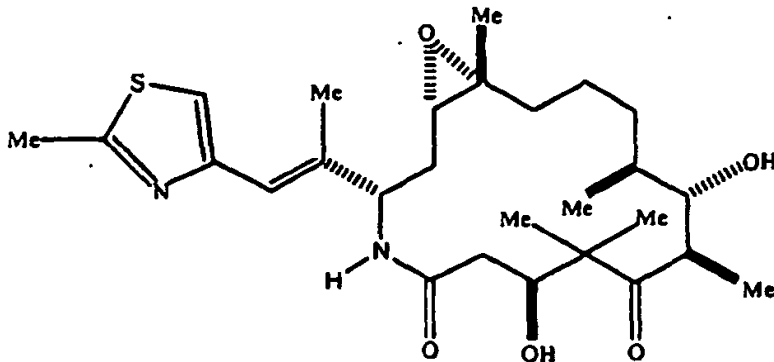
6. El anticuerpo C225 inmunoespecífico para el EGFR y un compuesto que tiene la fórmula,



5

para uso en el tratamiento de cánceres acelerados y metastásicos de la vejiga urinaria, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal y cáncer de mama.

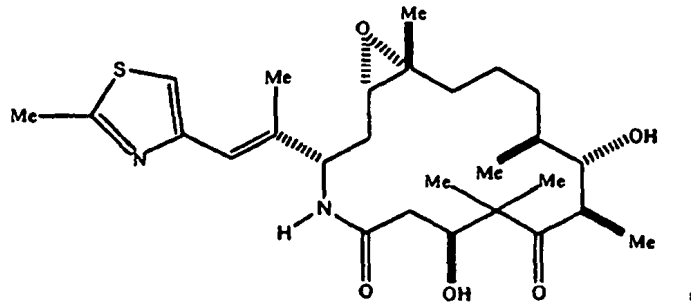
7. Uso del anticuerpo C225 inmunoespecífico para el EGFR y un compuesto que tiene la fórmula,



10 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

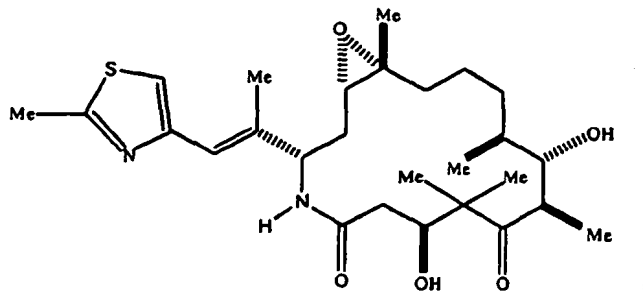
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el cáncer es cáncer acelerado y metastásico de la vejiga urinaria, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal o cáncer de mama.

15 9. Un inhibidor del VEGF seleccionado de un anticuerpo anti-VEGF, ZD6474 o SU6668, y un compuesto que tiene la fórmula,



para uso en terapia.

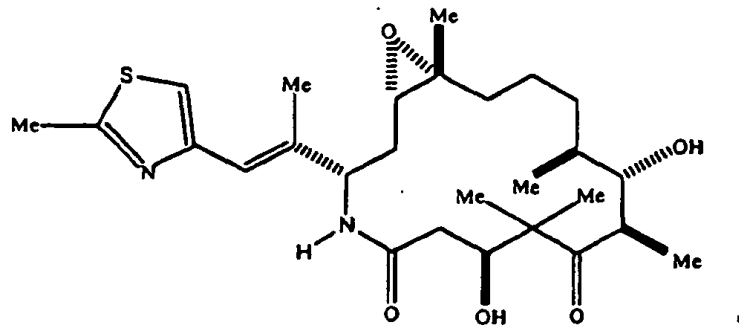
10. Un inhibidor del VEGF seleccionado de un anticuerpo anti-VEGF, ZD6474 o SU6668, y un compuesto que tiene la fórmula,



5

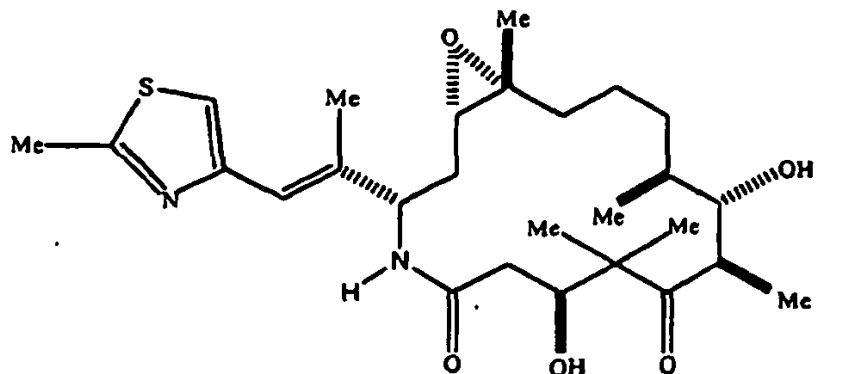
para uso en el tratamiento del cáncer.

11. Uso de un inhibidor del VEGF seleccionado de un anticuerpo anti-VEGF, ZD6474 o SU6668, y un compuesto que tiene la fórmula,



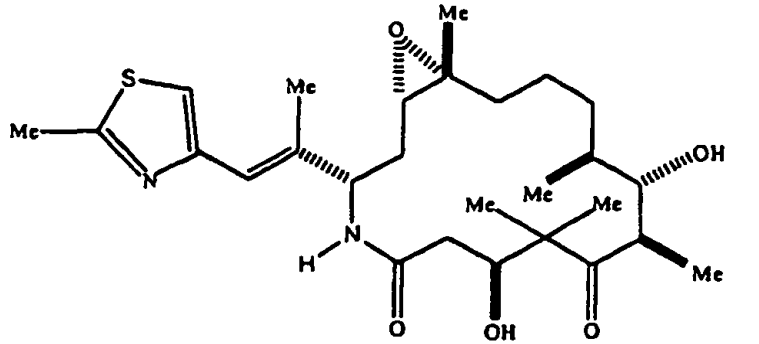
10 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

12. Capecitabina y un compuesto que tiene la fórmula,



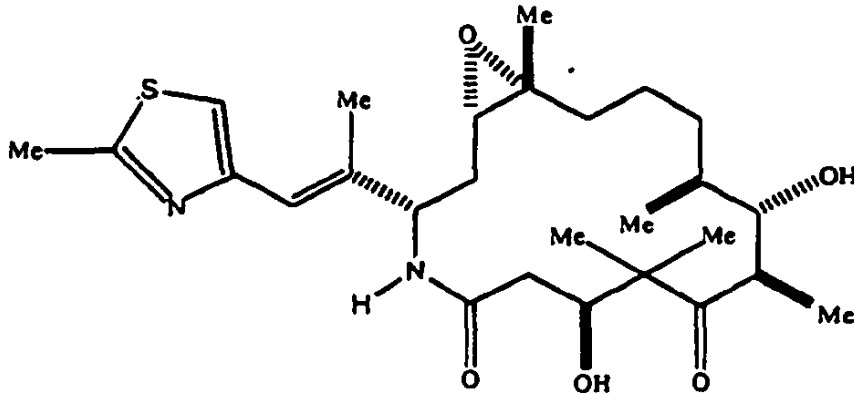
para uso en terapia.

13. Capecitabina y un compuesto que tiene la fórmula,



para uso en el tratamiento del cáncer.

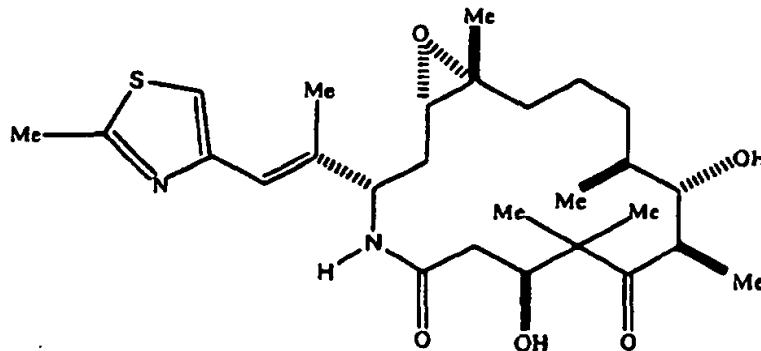
14. Uso de capecitabina y un compuesto que tiene la fórmula,



5

en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

15. Una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer que comprende un compuesto que tiene la fórmula,



10 y un agente quimioterapéutico seleccionado de cisplatino, anticuerpo C225 inmunoespecífico del EGFR, un inhibidor de VEGF seleccionado de un anticuerpo anti-VEGF, ZD6474 o SU6668, o capecitabina,

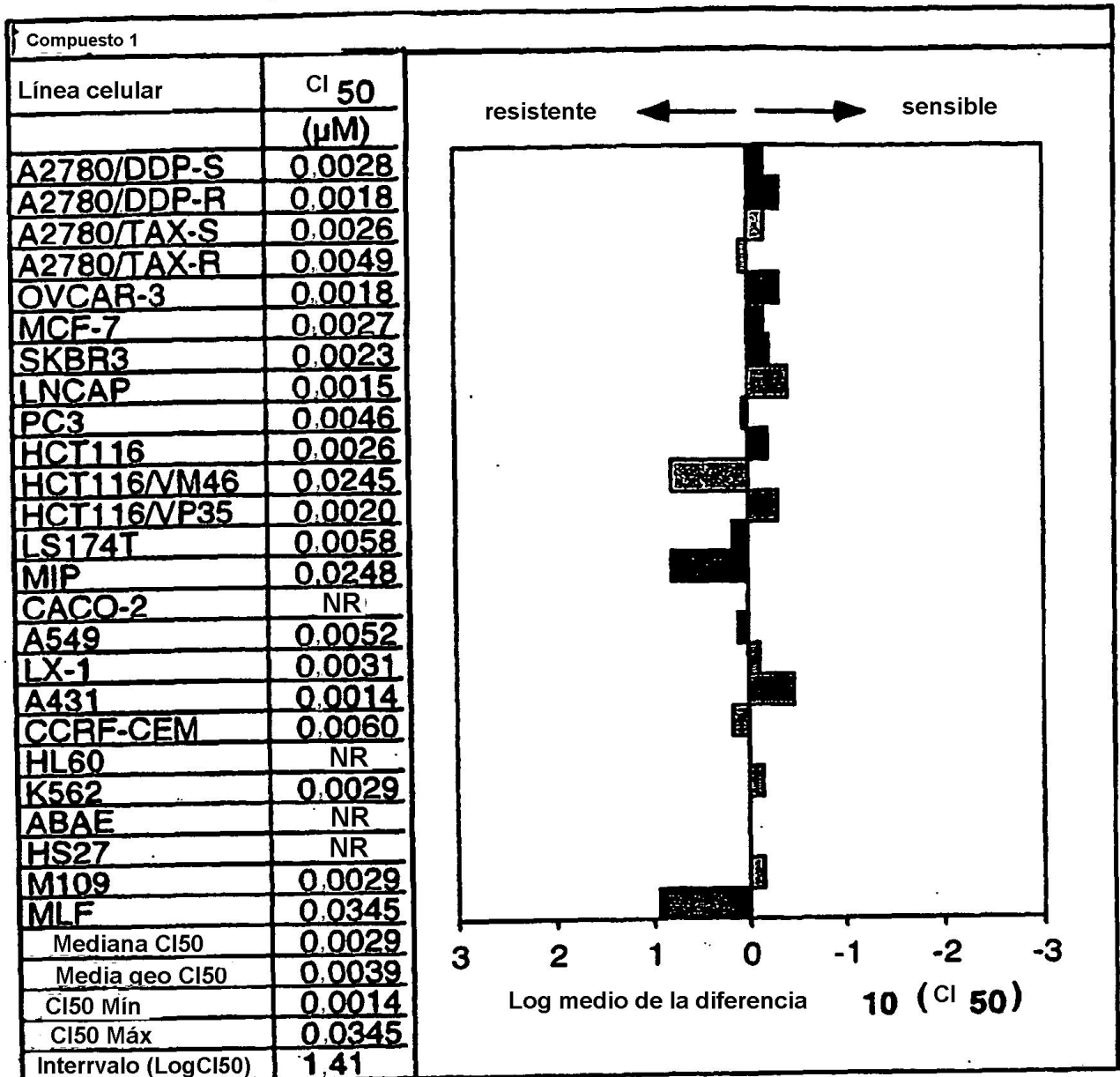


Figura 1

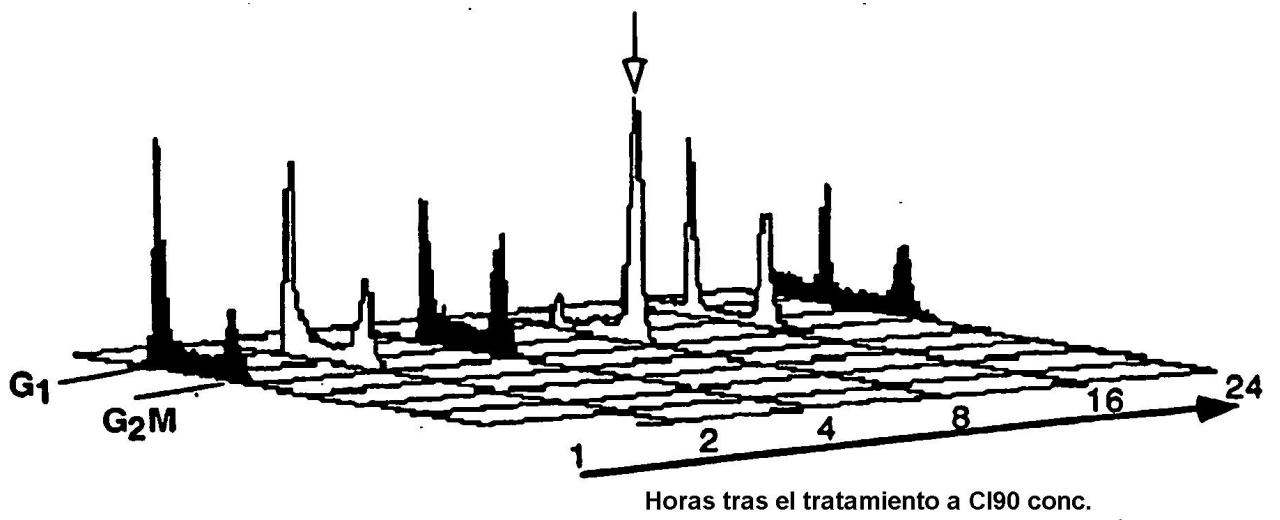


Figura 2

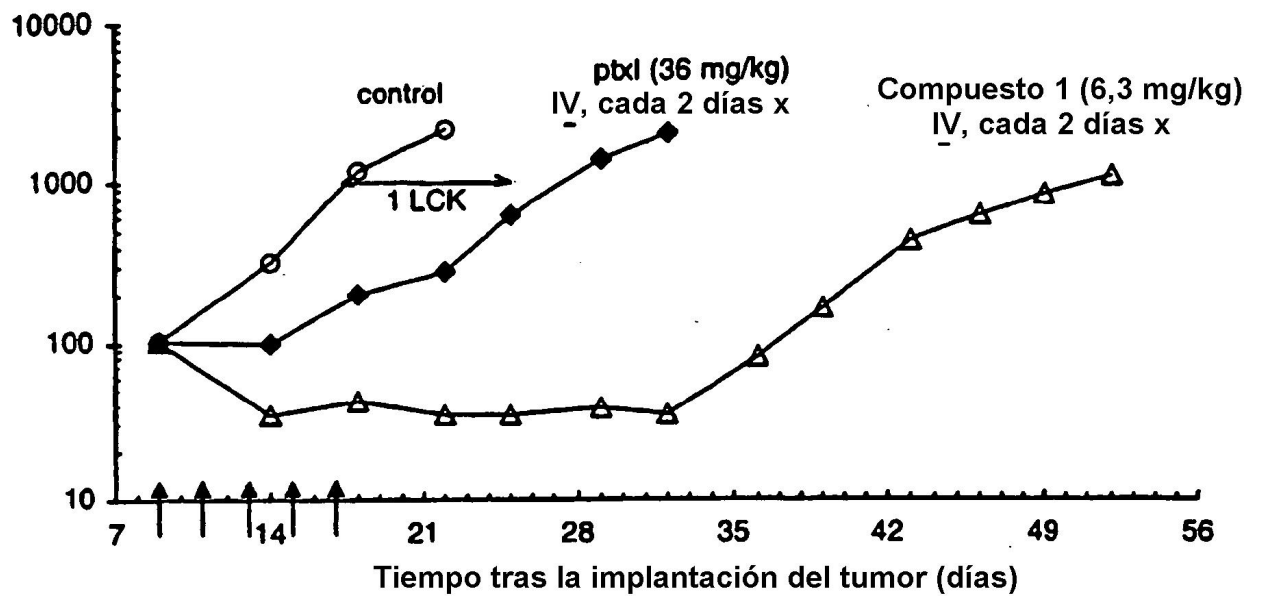


Figura 4

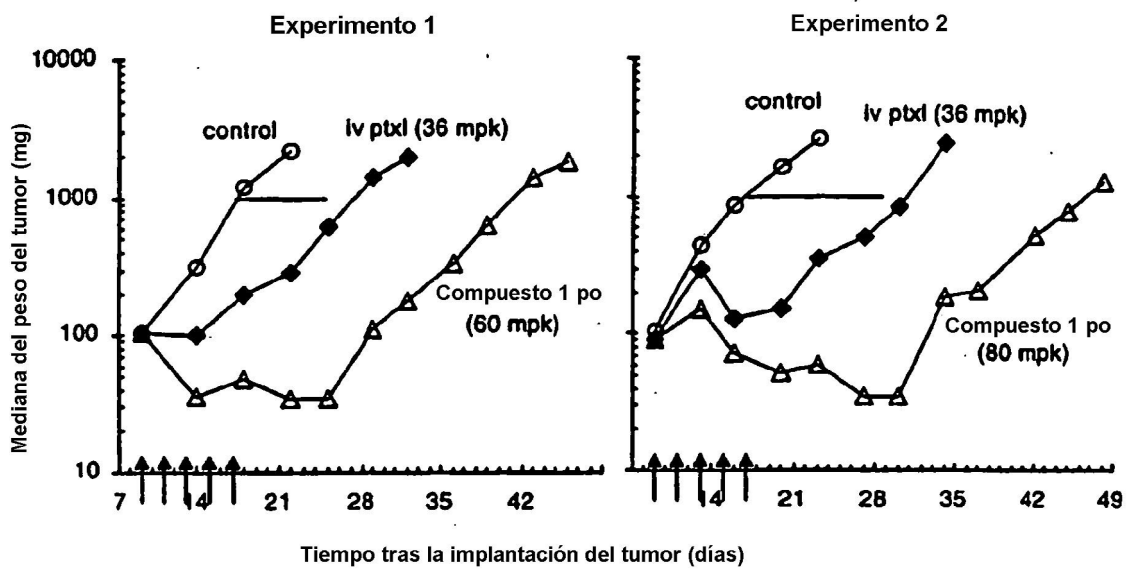


Figura 5A

Figura 5B

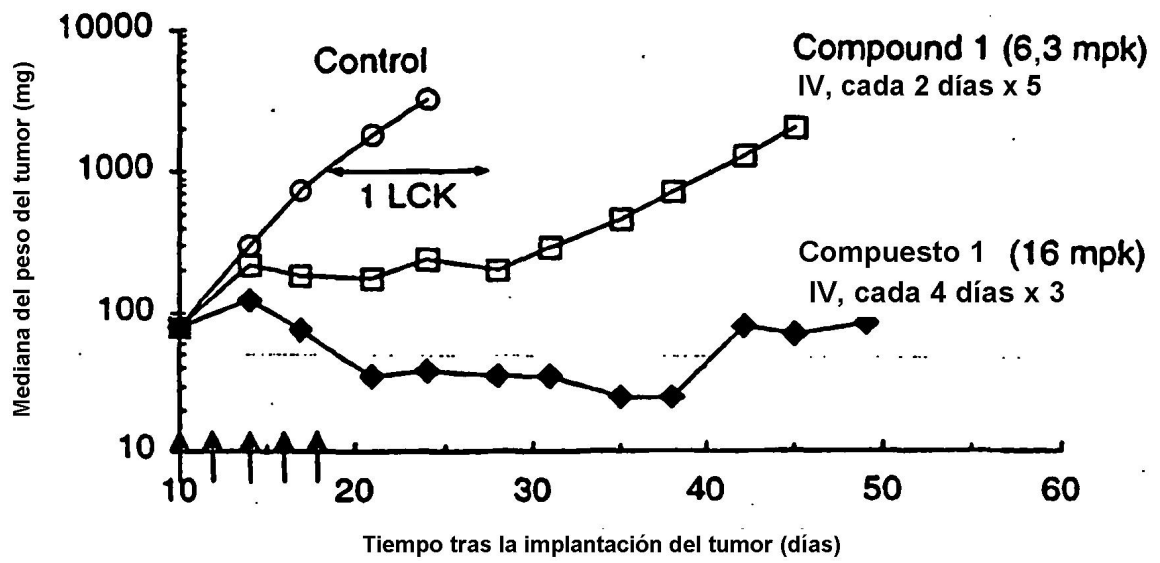


Figura 6