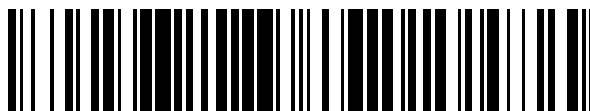


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 339**

51 Int. Cl.:

A61K 31/185 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2009 E 09736515 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2326320**

54 Título: **2,4-disulfonil fenil terc-butil nitrona para el tratamiento de gliomas**

30 Prioridad:

02.09.2008 US 93661 P

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

15.03.2013

73 Titular/es:

**OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)**

**825 N.E. 13th Street, MS 52
Oklahoma City, OK 73104, US**

72 Inventor/es:

**TOWNER, RHEAL, A. y
FLOYD, ROBERT, A.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 398 339 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

2,4-Disulfonil fenil *tert*-butil nitrona para el tratamiento de gliomas

Antecedentes de la invención

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de EE.UU. con número de serie 61/093.661, presentada el 2 de septiembre de 2008.

1. Ámbito de la invención

La presente invención se refiere de forma general a los campos de la oncología y de la quimioterapia. Más particularmente, concierne al uso de la 2,4-disulfonil fenil *tert*-butil nitrona (2,4-ds-PBN), sola o en combinación con quimio o radioterapia, para tratar gliomas.

2. Descripción de la técnica relacionada

Los gliomas son un grupo diverso de tumores cerebrales que se producen a partir de las células "gliales" normales del cerebro y/o sus células precursoras. El determinante más importante de supervivencia de los gliomas es el "grado" del glioma. Algunos determinantes secundarios de supervivencia son la edad en el diagnóstico, el estado de comportamiento y la extensión de la cirugía. Los pacientes con gliomas de grado bajo tienen un prolongado historial natural generalmente con largos tiempos de supervivencia, mientras que aquellos con gliomas de grado alto son mucho más difíciles de tratar con éxito y tienen tiempos de supervivencia más cortos. Todos los gliomas tienen signos y síntomas específicos que están relacionados principalmente con la ubicación y el tamaño del glioma.

Los gliomas del lóbulo temporal, por ejemplo, pueden provocar convulsiones, dificultad en el habla y/o pérdida de memoria. Los gliomas del lóbulo frontal pueden provocar convulsiones, cambios en el comportamiento, debilidad en las extremidades del lado opuesto del cuerpo y/o dificultad en el habla. Los gliomas occipitales pueden provocar pérdidas de visión. Los gliomas parietales pueden provocar pérdida de la orientación espacial, una sensación disminuida en el lado opuesto del cuerpo y/o incapacidad de reconocer objetos o personas familiares.

Los astrocitomas son tumores de glioma que se producen a partir de las células denominadas astrocitos o sus precursores. Los astrocitos son células del sistema nervioso central que apoyan la función neuronal. Los astrocitomas pueden clasificarse según sus características histológicas, que representan, en malignidad creciente, astrocitoma, astrocitoma anaplásico o glioblastoma multiforme. El astrocitoma anaplásico y el glioblastoma multiforme se consideran gliomas de grado alto, mientras que el astrocitoma se considera un glioma de grado bajo. Los tumores de grado alto crecen rápidamente y pueden infiltrar fácilmente y diseminarse por el cerebro. Los astrocitomas de grado bajo también pueden infiltrarse en el cerebro pero habitualmente están más localizados y crecen lentamente durante un largo periodo de tiempo. Los tumores de grado alto son mucho más agresivos y requieren una terapia muy intensa. La mayoría de los tumores astrocíticos en niños son de grado bajo, mientras que en adultos la mayoría son de grado alto. Los astrocitomas pueden aparecer en cualquier parte del cerebro y de la médula espinal, sin embargo la mayoría se localiza en los hemisferios cerebrales.

Los oligodendrogliomas también son gliomas. Se producen a partir de los oligodendrocitos y/o sus células precursoras. Los oligodendrocitos normales proporcionan la mielina, una sustancia grasa que recubre los axones nerviosos del cerebro y de la médula espinal y permite que los nervios conduzcan los impulsos eléctricos de una forma más eficaz. Los oligodendrogliomas se clasifican como oligodendroglioma de grado bajo (menos agresivo) y oligodendroglioma anaplásico (más agresivo). Más habituales que los oligodendrogliomas puros son los tumores de grado bajo y los anaplásicos, que son una mezcla de astrocitoma y oligodendroglioma ("oligoastrocitomas").

Los oligodendrogliomas anaplásicos y los oligoastrocitomas mixtos son más sensibles a la quimioterapia citotóxica que los astrocitomas. Una elevada tasa de respuesta a la quimioterapia PCV (procarbina (matulane), CCNU (lomustina), vincristina) ha hecho que el uso de este régimen, aunque no sea el cuidado estándar de estos tumores, sea al menos un tratamiento muy habitual. Los oligodendrogliomas de grado bajo también son sensibles a la quimioterapia, y puede usarse la PCV cuando comienzan a crecer tumores de grado bajo a pesar de una cirugía/terapia de radiación previa.

En 1983 se informó de que la cirugía más la terapia de radiación y la quimioterapia BCNU mejoraba significativamente la supervivencia de pacientes con glioma maligno, en comparación con los tratados con cirugía más terapia de radiación pero sin quimioterapia. En un estudio, tanto la procarbina como la estreptozotocina demostraron una eficacia similar a la de la BCNU. Otros estudios demostraron que la BCNU sola es tan efectiva como la BCNU seguida de procarbina, y que la PCNU no era mejor que la BCNU. En algunos estudios, se encontró que la combinación PCV era superior a la BCNU para gliomas anaplásicos, mientras que en otros estudios se consideran equivalentes.

Otra metodología implica el uso combinado de DFMO-PCV en el tratamiento de gliomas anaplásicos, extendiendo el estudio de Levin y col. (2000). Sorprendentemente, y en notable contraste con los resultados observados para el glioblastoma multiforme, la combinación de DFMO y PCV aumentó significativamente la supervivencia global de los

pacientes con gliomas anaplásicos. Es posible que una característica distintiva de la respuesta tumoral a la DFMO sea el nivel y la actividad de la enzima descarboxilasa de ornitina (ODC). Es probable que un factor que distinga el beneficio de la DFMO sea el nivel tumoral de la ODC; los pacientes con niveles relativamente menores de ODC parecen responder mejor a las combinaciones DFMO y DFMO-nitrosourea. Esta conclusión se basa en observaciones publicadas que demuestran que (1) los niveles de ODC se correlacionan directamente con el grado de malignidad del glioma (Scalabrino y col. 1982; Scalabrino y Ferioli, 1985; Ernestus y col., 1992; 1996); (2) el hecho de que no se haya observado actividad DFMO (+/- metilglioxal bisguanilhidrazona) en glioblastomas multiformes y se haya observado mejor en gliomas anaplásicos de grado intermedio (Levin y col., 1992; 1995) con menores niveles de ODC; y (3) en combinación con una nitrosourea, no se observó actividad en glioblastomas multiformes y se observó mejor en gliomas anaplásicos de grado intermedio (Prados y col., 1989; Levin y col., 2000 con menores niveles de ODC.

Los inventores han demostrado la eficacia de la fenil-terc-butil-nitrona (PBN) como un potencial fármaco anti-glioma en el pretratamiento de un modelo de implantación de glioma C6 en rata (Doblas y col., 2008). Los resultados de la RM de ratas no tratadas demostraron la invasividad difusa de los gliomas C6, con una cierta angiogénesis asociada. Se encontró que la administración de PBN como pretratamiento inducía claramente una disminución en la tasa de crecimiento y la regresión del tumor, así como que evitaba la angiogénesis. Sin embargo, el postratamiento con PBN tenía poco efecto sobre la regresión tumoral en comparación con el pretratamiento. Los hallazgos de la RM rivalizaban con los de las evaluaciones por inmunotinción de los marcadores de la histología y la angiogénesis.

Además de los ensayos clínicos controlados basados en supervivencia, se han ensayado otros muchos agentes en estudios basados en respuestas de pacientes con glioma. A pesar de ello, hay una necesidad de terapias eficaces y mejoradas para los gliomas anaplásicos.

Resumen de la invención

Por lo tanto, según la presente invención, se prevé un tratamiento de un glioma en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto con glioma una dosis del derivado 2,4-disulfonilo de la fenil-terc-butil nitrona eficaz para inhibir el crecimiento de dicho glioma. El sujeto humano puede tener un glioma recurrente o metastásico, o haber fracasado previamente una o más terapias anti-glioma. La dosis eficaz puede ser desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal por día. La administración puede ser mediante una administración con la dieta, tal como mediante el complemento de un componente alimenticio. La cantidad eficaz es desde aproximadamente el 0,005 % p/p hasta aproximadamente el 0,1 % p/p de la dieta que se está administrando. El glioma puede ser un astrocitoma, un oligodendroglioma o un glioblastoma multiforme. El procedimiento puede también comprender adicionalmente una terapia anti-glioma secundaria, tal como quimioterapia, incluyendo lomustina, vincristina, matulane, PCV, BCNU, CCNU y/o DFMO, radiación o cirugía. El tratamiento puede comprender inhibir la vascularización, el crecimiento o la diseminación de un glioma, reducir la carga tumoral o evitar la metástasis. El sujeto puede ser un sujeto animal no humano o un ser humano.

En otra forma de realización, se prevé un tratamiento para inhibir el desarrollo de un glioma que comprende (a) identificar un sujeto con riesgo de desarrollar un glioma y (b) administrar a dicho sujeto una dosis del derivado 2,4-disulfonilo de la PBN, o fenil-terc-butil nitrona, eficaz para inhibir el desarrollo de dicho glioma. El sujeto puede tener antecedentes familiares de cáncer, o puede haber sido expuesto a un entorno carcinógeno. Los factores de riesgo específicos del glioma incluyen la exposición a compuestos N-nitroso o a radiación X. La dosis eficaz es desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal por día. La administración puede ser mediante una administración con la dieta, tal como mediante el complemento de un componente alimenticio, una administración oral en forma de una píldora o en forma líquida, o mediante una inyección intravenosa. La cantidad eficaz puede ser desde aproximadamente el 0,005 % p/p hasta aproximadamente el 0,1 % p/p de la dieta que se está administrando. El glioma puede ser un astrocitoma, un oligodendroglioma o un glioblastoma multiforme. El sujeto puede ser un sujeto animal no humano o un ser humano.

En otra forma de realización más, se prevé un tratamiento para inhibir la reaparición de gliomas que comprende administrar a un sujeto que previamente ha tenido un glioma una dosis del derivado 2,4-disulfonilo de la PBN, o fenil-terc-butil nitrona, eficaz para inhibir el desarrollo de dicho glioma. El glioma puede ser un astrocitoma, un oligodendroglioma o un glioblastoma multiforme. La dosis eficaz puede ser desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal por día. La administración puede ser mediante una administración con la dieta, tal como mediante el complemento de un componente alimenticio, una administración oral en forma de una píldora o en forma líquida, o mediante una inyección intravenosa. La cantidad eficaz es desde aproximadamente el 0,005 % p/p hasta aproximadamente el 0,1 % p/p de la dieta que se está administrando. El sujeto puede ser un sujeto animal no humano o un ser humano. El procedimiento puede comprender adicionalmente a administrar un segundo agente que inhiba la aparición de gliomas. El procedimiento también puede comprender adicionalmente el cribado de la formación de gliomas en dicho sujeto.

Se contempla que puede implementarse cualquier procedimiento o composición descrito en este documento con respecto a cualquier otro procedimiento o composición descrito en este documento.

El uso de la palabra "un" o "uno" cuando se usa junto con el término "comprende" en las reivindicaciones y/o la

memoria descriptiva, puede significar "uno," pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

Se contempla que puede ser implementada cualquier forma de realización analizada en esta memoria descriptiva con respecto a cualquier procedimiento o composición de la invención, y viceversa. Adicionalmente, las composiciones y los kits de la invención pueden usarse para conseguir los procedimientos de la invención.

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente al error del dispositivo, empleándose el procedimiento para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos en estudio.

Los términos "comprende" (y cualquier forma de comprender, tal como "comprenden" y "que comprende"), "tiene" (y cualquier forma de tener, tal como "tienen" y "que tienen"), "contiene" (y cualquier forma de contener, tal como "contienen" y "que contienen"), e "incluye" (y cualquier forma de incluir, tal como "incluyen" y "que incluyen") son verbos de conexión abiertos. Como resultado, un dispositivo o un procedimiento que "comprende", "tiene", "contiene" o "incluye" uno o más elementos posee esos uno o más elementos, pero no se limita únicamente a poseer esos uno o más elementos sub etapas. Asimismo, un elemento de un dispositivo o un procedimiento que "comprende", "tiene", "contiene" o "incluye" una o más características posee esas una o más características, pero no se limita únicamente a poseer esas una o más características.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y están incluidos para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede comprenderse mejor mediante referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las formas de realización específicas presentadas en este documento.

FIGS. 1A-C: imágenes de RM (corte axial ponderado en T1 de la región del mesencéfalo) de glioma C6 en los días 10 (FIG. 1A), 15 (FIG. 1B) y 18 (FIG. 1C) tras la inyección de células. Nótese el tumor destacado por las flechas.

FIG. 2-1(a) - 2-2(d): tinción de H&E (1) e inmunotinción del factor von Willebrand (2) de un glioma C6 a los 23 días. Se presentan las áreas de tejido normal (x40; a), de glioma (x40; b), de necrosis (x40; c) y de infiltración (x10; d) (Doblas y col., 2008).

FIG. 3: nitrona parental, PBN, y derivados de sulfonilo, 2-S-PBN y 2,4-ds-PBN.

FIG. 4: imágenes de RM de ratas tratadas con 2,4-ds-PBN- y no tratadas con gliomas C6 (post-tumor >15 días). Los tumores son regiones hiperintensas (destacadas). Imágenes en el día 16 (d16), d20 y d25.

FIG. 5: (cuadro izquierdo) volúmenes tumorales medidos a partir de imágenes de RM de ratas con gliomas C6 tratadas con 2,4-ds-PBN (18 mg/kg/día en el agua de bebida) en comparación con ratas no tratadas. (Cuadro derecho) supervivencia porcentual de ratas con gliomas C6 tratadas con 2,4-ds-PBN en comparación con ratas no tratadas.

FIG. 6: inmunotransferencias Western de células C6 de rata con concentraciones crecientes de 2,4-ds-PBN. Se muestran niveles crecientes de los factores apoptóticos pro-caspasa 3 y pro-caspasa 9, relativos a la actina.

Descripción de formas de realización ilustrativas

1. La presente invención

El pronóstico de pacientes diagnosticados de glioblastoma multiforme es muy malo debido a la dificultad de un diagnóstico temprano y preciso y a la ausencia de compuestos terapéuticos actualmente eficaces. Usando un modelo de glioma aplicado previamente al ensayo de las PBNs y derivados no sulfonilo de las mismas, los inventores examinaron el efecto de un compuesto de nitrona, la 2,4-ds-PBN que es un análogo estructural de la PBN. Los resultados de resonancia magnética de ratas post-tratadas con 2,4-ds-PBN indicaron una aparente disminución en el volumen de tumor y un retraso en la tasa de crecimiento tumoral. El post-tratamiento con 2,4-ds-PBN también fue significativamente eficaz aumentando la tasa de supervivencia.

Este resultado era en cierto modo inesperado y sorprendente ya que se sabe que los derivados sulfonados de la PBN no son capaces de atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE). Previamente se ha encontrado que la PBN, la nitrona parental, penetra fácilmente en la BHE (Wang & Shuaib, 2007). La 2,4-disulfonil PBN (2,4-ds-PBN) está estructuralmente relacionada con el compuesto parental PBN, pero contiene dos grupos sulfonilo que la hacen mucho más soluble en agua. Como resultado del incremento en la solubilidad en agua, la 2,4-disulfonil PBN no puede atravesar fácilmente la BHE, en comparación con la PBN (Wang & Shuaib, 2007). Idealmente, los fármacos que van a usarse como terapia anti-glioma necesitan pasar las uniones endoteliales de la BHE para alcanzar la mayoría de las células tumorales (Cao y col., 2005). Es posible que los gliomas malignos hayan adquirido la habilidad de degradar activamente las uniones estrechas secretando factores solubles, conduciendo finalmente a una alteración de la BHE en el tejido cerebral invadido (Schneider y col., 2004). No obstante, nunca se había pensado que la 2,4-disulfonil PBN alcanzaría el tejido del glioma en cantidades suficientes como para tener algún efecto terapéutico. Por ejemplo, Renovis Pharmaceuticals, administró la 2,4-disulfonil PBN como un agente terapéutico anti-infarto mediante una administración i.v. para concentrar este compuesto en el tejido cerebral (Shuaib

y col., 2007).

Estos y otros aspectos de la invención se describen con detalle a continuación.

2. Estrato de glioma anaplásico

A. Características clínicas

5 Los gliomas anaplásicos son gliomas infiltrantes de grado intermedio - clasificados entre el glioma pequeño (localizado, de crecimiento lento) y el glioblastoma multiforme (de crecimiento rápido y muy invasivo). Los astrocitomas anaplásicos (AA) son tumores que se producen a partir de las células cerebrales denominadas astrocitos y/o sus precursores. Los astrocitos son células de apoyo del sistema nervioso central. La mayoría de los tumores astrocíticos en niños son de grado bajo, mientras que en adultos la mayoría son de grado alto. Estos tumores pueden aparecer en cualquier parte del cerebro y de la médula espinal.

10 Los oligodendrogliomas son gliomas derivados a partir de oligodendrocitos y/o de sus precursores. Los oligodendrocitos juegan un papel en la estructura y la función de las neuronas mielinizadas del cerebro. Los oligodendrogliomas anaplásicos (AO) son más agresivos que los oligodendrogliomas, pero también son más sensibles a la quimioterapia que los astrocitomas anaplásicos. Una elevada tasa de respuesta al uso de la quimioterapia con PCV (procarbina, CCNU, vincristina) ha conducido al uso habitual de la quimioterapia con PCV antes de la terapia de radiación, después de la terapia de radiación y/o en la reaparición y progresión de tumores. Otro glioma aparece como una mezcla histológica de ambas formas tumorales de oligodendroglioma y astrocitoma, y se denomina oligoastrocitoma. Aunque el oligoastrocitoma puede ser de grado bajo, la mayoría de los oligoastrocitomas mixtos son oligoastrocitomas anaplásicos (AOA).

20 El último subgrupo de gliomas son los ependimomas. Un subtipo de ependimomas malignos es el ependimoma anaplásico (AE); estos tumores se producen a partir de las células ependimarias y/o sus precursores, que revisten las vías de paso del líquido cefalorraquídeo, denominadas ventrículos. Estos tumores se clasifican en supratentoriales (en la parte superior de la cabeza) o infratentoriales (en la parte posterior de la cabeza).

25 Las características químicas y los síntomas producidos por los gliomas dependen de la ubicación del tumor y de la edad del paciente. La ubicación más habitual de los gliomas es en los hemisferios cerebrales de adultos y en el cerebelo, el tronco encefálico, el hipotálamo y el tálamo en niños. Los gliomas de médula espinal son mucho menos habituales que los gliomas cerebrales. Los pacientes con estos tumores tienen síntomas que varían dependiendo de la ubicación en el cerebro o en la médula espinal. Pueden producir síntomas de cefaleas, convulsiones, náuseas y vómitos, debilidad en las extremidades, cambios sensoriales unilaterales, cambios en la personalidad e inseguridad al caminar.

B. Clasificaciones

35 **Astrocitoma anaplásico.** Las características histológicas de los astrocitomas anaplásicos son similares a las de los astrocitomas de grado bajo, pero estas características son más abundantes y exageradas. Estos tumores son de grado III según la OMS (Kleihues y col., 1993; Kleihues y Cavenee, 2000). La celularidad está más aumentada, y que son pleomorfismos nucleares y celulares. Estas características pueden ser extremas, con células consecutivas y extraños núcleos hiper cromáticos. El citoplasma puede ser escaso, con lobulación nuclear y agrandamiento, que indica anaplasia. La actividad mitótica se reconoce fácilmente en la mayoría de los astrocitomas anaplásicos pero inexplicablemente puede estar ausente en áreas con gemistocitos.

40 El nivel de anaplasia en este grado es amplio, mostrando algunos ejemplos una baja celularidad y pleomorfismo con unas pocas figuras mitóticas, y siendo otras muy celulares y pleomorfas con frecuentes mitosis, pareciendo únicamente la necrosis requerida para un diagnóstico histológico de glioblastoma. Por esta razón, es útil tener un indicador más objetivo de comportamiento, y se han usado algunos marcadores de proliferación celular en un intento de predecir el pronóstico de forma más precisa. Los marcadores más usados en este área han sido anticuerpos contra bromodesoxiuridina (BrdU) y Ki-67 (Davis y col., 1995). La incorporación celular de la BrdU es un marcador específico de la fase de síntesis de ADN del ciclo celular, mientras que el anticuerpo Ki-67 marca un antígeno que está presente en todas las fases del ciclo celular excepto en G₀. Ambos anticuerpos pueden identificarse mediante una tinción inmunohistoquímica de secciones tisulares incluidas en parafina. Como una generalización, una mayor tasa de marcaje de los astrocitomas anaplásicos está asociada con un mal pronóstico (Hoshino y col., 1993; Davis y col., 1995; Lamborn y col., 1999).

50 **Glioblastoma multiforme.** El glioblastoma, también conocido como glioblastoma multiforme, es el glioma con el mayor grado de malignidad, grado IV de la OMS (Kleihues y Cavenee, 2000). Representan del 15 % al 23 % de los tumores intracraneales y aproximadamente el 50 % - 60 % de los astrocitomas. Se considera que la mayoría de los ejemplos aparecen generalmente a partir de astrocitos porque puede identificarse la proteína ácida fibrilar glial en el citoplasma celular. Sin embargo, algunos ejemplos aparecen aparentemente a partir de otros linajes gliales, tales como los oligodendrocitos. El glioblastoma es el astrocitoma de aparición más frecuente. Las autopsias y los estudios de biopsias en serie han demostrado que algunos astrocitomas progresan a través de los grados de malignidad con la transformación de grado bajo a astrocitoma anaplásico a glioblastoma (Muller y col., 1977). Pero

debido a que parece que algunos ejemplos de glioblastoma aparecen rápidamente en pacientes por lo demás normales, y se reconocen cuando son pequeños, se cree que esta variedad de glioblastoma también puede aparecer directamente a partir de la transformación maligna de células precursoras de astrocitos sin pasar a través de grados menores de malignidad (Kleihues y Ohgaki, 1997; 1999).

La necrosis tumoral es la mayor característica que distingue al glioblastoma del astrocitoma anaplásico (Nelson y col., 1983; Burger y col., 1985; 1991). Otra característica microscópica que es distintiva y diagnóstica es la presencia de cambios vasculares proliferativos dentro del tumor. Estos cambios pueden aparecer en las células endoteliales (hiperplasia o proliferación endotelial vascular) o en las células de la propia pared vascular (proliferación de las células vasculares del muro). Ambos tipos de cambios se consideran a veces conjuntamente como proliferación microvascular. La celularidad de los glioblastomas es habitualmente extremadamente alta. Las células individuales pueden ser pequeñas, con una elevada proporción entre núcleo citoplasma, o muy grandes y extrañas, con abundante citoplasma eosinófilo. Estas mismas células pequeñas pueden parecer condensadas en filas alrededor de áreas necróticas del tumor, formando las características pseudopalisadas. Los tumores de glioblastoma son propensos a infiltrar ampliamente el cerebro, diseminándose incluso en ubicaciones distantes y dando la apariencia de un glioma multifocal. Algunos ejemplos son verdaderamente multifocales (es decir, que aparecen simultáneamente en múltiples sitios primarios), mientras que muchos de estos tumores multifocales muestran una conexión histológica cuando se examina todo el cerebro en la autopsia.

Oligodendrogliomas. Al igual que los astrocitomas, los oligodendrogliomas mimetizan la histología de su supuesta célula de origen. También aparecen principalmente en la sustancia blanca, pero tienden a infiltrar la corteza cerebral más que los astrocitomas con un grado similar de malignidad. Al igual que los astrocitomas, se han usado los esquemas de clasificación de la malignidad histológica para los oligodendrogliomas, pero estos no se correlacionan tan bien con el pronóstico como los usados para los astrocitomas (Burger y col., 1987; Bigner y col., 1998; Daumas-Duport y col., 1997). Muchas de las características histológicas usadas para clasificar los oligodendrogliomas son similares a las usadas para los astrocitomas: celularidad, pleomorfismo, actividad mitótica, cambios vasculares y necrosis. Los oligodendrogliomas de grado inferior pueden tener microquistes. Los oligodendrogliomas de todos los grados histológicos tienden a infiltrar fácilmente la corteza y a formar agregados de células neoplásicas en la región subpial, alrededor de las neuronas y alrededor de los vasos sanguíneos. En general, las células de los oligodendrogliomas tienen núcleos de redondos regulares y bordes citoplasmáticos definidos con un aclaramiento del citoplasma. Otra característica bastante distintiva y diagnósticamente útil es el patrón vascular de los oligodendrogliomas, denominado vasos en "tela de gallinero", que pueden dividir el tumor en pequeños lóbulos. Con una creciente anaplasia, los oligodendrogliomas pueden llegar a ser muy celulares y pleomórficos, aproximándose a la apariencia de un glioblastoma multiforme con presencia de necrosis. Aunque es correcto clasificar éstos como oligodendrogliomas anaplásicos, algunos usarían el término glioblastoma una vez identificada la necrosis en cualquier neoplasma glial de grado alto. Una justificación para separar los oligodendrogliomas anaplásicos de los glioblastomas astrocíticos es el ligeramente mejor pronóstico del primero, incluso en su mayor grado de malignidad. Algunos autores han informado de que un índice de marcaje de MIB-1 de >3 % - 5 % predice un pronóstico peor en los oligodendrogliomas (Heegard y col., 1995; Kros y col., 1996; Dehghani y col., 1998).

Oligoastrocitomas. Muchos, si no la mayoría, de los oligodendrogliomas aparecen con una mezcla celular regional o íntima de astrocitoma. Para el diagnóstico del glioma mixto, la proporción de cada uno debe ser sustancial, pero otros autores difieren en sus opiniones con respecto a las cifras exactas; habitualmente una mezcla con un intervalo del 10 % al 25 % del elemento menor se usa para diagnosticar un glioma mixto. Los oligoastrocitomas y los oligoastrocitomas anaplásicos se corresponden con el grado II o con el grado III de la OMS, respectivamente (Kleihues y Cavenee, 2000). Las características histológicas de la anaplasia pueden estar presentes en cualquier componente y afectarán negativamente al pronóstico. Dichas características incluyen un notable pleomorfismo celular, una elevada celularidad y una elevada tasa mitótica. También puede observarse proliferación microvascular y necrosis. No se ha demostrado que el pronóstico y la respuesta a la terapia dependan de la proporción entre el componente oligodendroglioma y el astrocítico (Shaw y col., 1994), aunque paradójicamente, el LI de la BrdU del componente oligodendroglioma es más predictivo para la supervivencia que el componente astrocítico (Wacker y col., 1994) y las progresiones tumorales muy avanzadas están dominadas por el componente astrocítico.

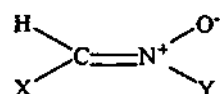
3. Fenil N-terc-butil nitrona (PBN)

A. PBN

El compuesto fenil N-terc-butil nitrona (PBN) se sintetizó por primera vez en los años 50, pero en 1968 se descubrió que era muy útil para atrapar y estabilizar radicales libres en reacciones químicas, y por lo tanto se denominó *spin-trap* (capturador de radicales libres) (Janzen, 1971). Aunque la PBN es el prototipo de *spin-trap*, se han sintetizado otras muchas nitronas y han resultado útiles para atrapar y caracterizar radicales libres en reacciones químicas. Estos *spin traps* se usaron inicialmente en reacciones químicas, pero a mediados de los 70 comenzaron a usarse para capturar radicales libres en sistemas bioquímicos y biológicos (Floyd y col., 1977; Poyer y col., 1978). Los estudios farmacocinéticos han demostrado que la PBN se distribuye fácil y rápidamente prácticamente igual en todos los tejidos, tiene una semivida en ratas de aproximadamente 132 minutos y se elimina principalmente con la orina. Se han realizado relativamente pocos estudios del metabolismo, pero se sabe que en el hígado se produce una cierta hidroxilación del anillo (principalmente en la posición *para*) del compuesto.

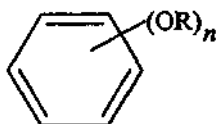
Novelli fue el primero en demostrar que la PBN podría usarse para proteger animales experimentales de un choque séptico (Novelli y col., 1986), y de hecho esto fue posteriormente confirmado por otros grupos (Pogrebniak y col., 1992). El uso de la PBN y derivaciones como agentes farmacológicos comenzó después de los descubrimientos de 1988 que demostraron que la PBN tenía actividad neuroprotectora en modelos experimentales de infarto cerebral (Floyd, 1990; Floyd y col., 1996; Carney y col., 1991). Estos resultados se repitieron y se extendieron (véase Clough-Helfman y col., 1991; Cao y col., 1994; Folbergrova y col., 1995; Pahlmark y col., 1996). Otros inventores han resumido el amplio esfuerzo de investigación farmacológica neuroprotectora de la PBN y sus derivados (Floyd, 1997; Hensley y col., 1996). Además de las enfermedades neurodegenerativas, se ha demostrado que la PBN protege en otros estados patológicos en los que hay implicados procesos mediados por ROS, incluyendo la diabetes y otros muchos estados. La base mecanística de por qué la PBN y algunos de sus derivados son neuroprotectores en infartos experimentales y otros muchos modelos neurodegenerativos todavía no ha sido completamente elucidada. Sin embargo, es claro que su acción no puede explicarse simplemente por su capacidad de atrapar radicales libres.

La fórmula general de las PBN es

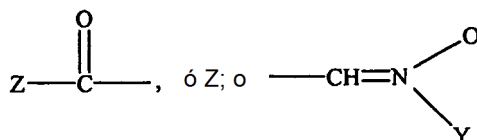


en la que:

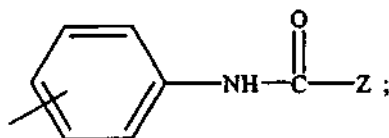
X es fenilo o



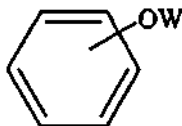
R es H,



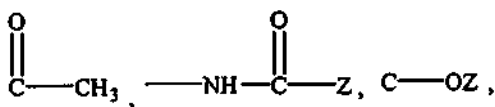
y n es un número entero de 1 a 5; o



Y es un grupo terc-butilo qué puede estar hidroxilado o acetilado en una o más posiciones; fenilo; o



en la que W es



o Z; y Z es un grupo alquilo lineal o ramificado de C₁ a C₅.

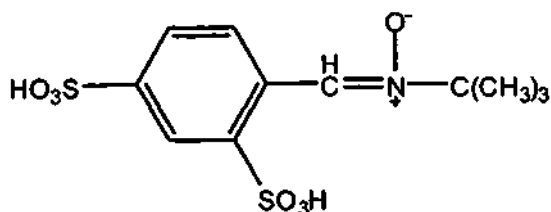
B. Las PBN en el cáncer

La patente de EE.UU. 5.569.902 describe el uso de agentes capturadores de radicales libres de nitrona para el tratamiento del cáncer. Específicamente, se describe la PBN y los compuestos relacionados como útiles en la preparación de una dieta anticarcinógena y la preparación de dichas dietas complementadas. Aquellos sujetos que más probablemente reciban beneficiosamente las nitronas incluirían: (1) aquellos cuyas pruebas pretumorales indiquen una elevada probabilidad de presencia de tumores, (2) aquellos expuestos a entornos carcinógenos muy potentes y cuya probabilidad de progresión tumoral es alta, y (3) aquellos cuya predisposición genética hace que su probabilidad de desarrollar tumores sea alta.

La patente de EE.UU. 2007/0032453 describe el efecto de las fenil N-terc-butil nitronas (PBNs) anti-inflamatorias sobre los gliomas usando técnicas de imagen por RM. La propia PBN fue capaz de controlar el desarrollo tumoral cuando se proporcionó a un sujeto antes, en el momento de o después, de la implantación de un tumor. Por lo tanto, se propuso usar la PBN, y los agentes capturadores de radicales libres o relacionados con nitronas, como agentes terapéuticos para los gliomas.

C. 2,4-disulfonil fenil N-terc-butil nitrona (2,4-ds-PBN)

La patente de EE.UU. 5.488.145 describe la 2,4-disulfonil fenil N-terc-butil nitrona y sus sales farmacéuticamente aceptables. Estos materiales se describieron como agentes farmacéuticos útiles para la administración oral o intravenosa a pacientes que padecían de oxidación aguda en el sistema nervioso central, como sucede en un infarto, o por la oxidación gradual del sistema nervioso central, que puede mostrarse como una pérdida de función progresiva del sistema nervioso central.

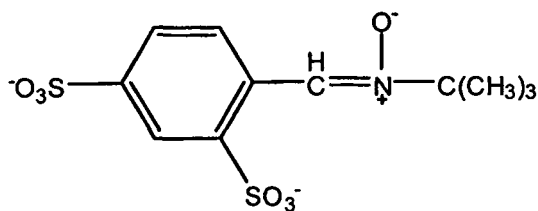
**2,4-disulfonil PBN**

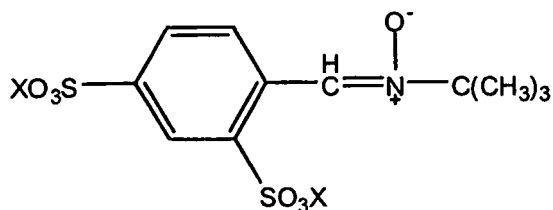
Se esperaba que los dos grupos sulfonato de la 2,4-disulfonil PBN mostraran una mejor solubilidad en agua, pero también se esperaba que mostraran un peor transporte a través de la barrera hematoencefálica debido a su carácter lipófilo. Sin embargo, cuando se elaboró el presente compuesto y se ensayó *in vivo*, mostró un inesperado aumento en su eficacia en comparación con la PBN. Este aumento en la eficacia se produjo junto con un aumento en la potencia en comparación con la PBN. En contraste directo con este notable aumento en la potencia y la eficacia, hubo una notable y significativamente alta disminución en la toxicidad en comparación con la PBN.

Estos resultados fueron inesperados porque, en la bibliografía general sobre la relación entre estructura y actividad dentro de familias específicas definidas de compuestos, la potencia terapéutica normalmente varía junto con la toxicidad. Por lo tanto, los compuestos más relacionados mantienen su proporción entre potencia terapéutica y toxicidad. Por el contrario, el compuesto de esta invención se desvía de esta esperada relación cuando su potencia aumenta y su toxicidad disminuye con respecto a análogos estrechamente relacionados.

Consecuentemente, en un aspecto, la invención proporciona el compuesto PBN-disulfonilo y sus sales farmacéuticamente aceptables. En un segundo aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas administrables por vía intravenosa y por vía oral que tienen este compuesto o su sal como principio activo.

La 2,4-ds PBN puede existir a mayores pH en forma de una sal ionizada:





en las que X es un catión farmacéuticamente aceptable. Muy habitualmente, este catión es un material monovalente tal como sodio, potasio o amonio, pero también puede ser un catión multivalente solo o en combinación con un anión monovalente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, calcio con un anión cloruro, bromuro, yoduro, hidroxilo, nitrato, sulfonato, acetato, tartrato, succinato, palmoato o similares; magnesio con dichos aniones; cinc con dichos aniones o similares. Cuando se ilustran estas combinaciones de un catión polivalente y un anión monovalente en fórmulas estructurales en este documento, el anión monovalente se identifica como "Y."

De entre estos materiales, los más preferidos son el ácido libre y las sales simples de sodio, potasio o amonio, siendo también preferidas las sales de calcio y de magnesio, pero un poco menos.

La 2,4-ds PBN puede prepararse mediante una secuencia de reacción en dos etapas. En la primera etapa se convierte el comercialmente disponible butilnitrato terciario de (2-metil-2-nitropropano) en la correspondiente n-hidroxilamina usando un catalizador adecuado tal como un catalizador ácido activado de cinc/ácido acético, o un catalizador de amalgama de aluminio/mercurio. Esta reacción puede llevarse a cabo en entre 0,5 y 12 horas, y especialmente aproximadamente entre 2 y 6 horas o así, a una temperatura de aproximadamente 15-100°C en un medio de reacción líquido tal como una mezcla de alcohol/agua en el caso del catalizador de cinc, o una mezcla de éter/agua en el caso del catalizador de amalgama de aluminio.

En la segunda etapa, la recién formada hidroxilamina se hace reaccionar con ácido 4-formil-1,3-bencenodisulfónico, normalmente con un ligero exceso de la amina que se va a usar. Esta reacción puede llevarse a cabo en unas condiciones de temperatura similares.

Esta reacción se completa generalmente en entre 10 y 24 horas.

El producto así formado es el ácido libre, y está caracterizado por un peso molecular de 89 g/mol. Es un material pulverulento blanco que se descompone con calor. Está caracterizado por una solubilidad en agua de más de 1 g/ml y un espectro de RMN-¹H en D₂O de 8,048 ppm (dd, 8,4, 1,7 Hz); 8,836 ppm (d, 8,4 Hz); 8,839 ppm (d, 1,7 Hz); 8,774 ppm (s).

Las diversas sales pueden formarse fácilmente mezclando el ácido libre en un medio acuoso con dos equivalentes de la base apropiada, por ejemplo, KOH para la sal potásica, y similares.

Una síntesis se basa en el trabajo de R. H. Hinton y E. G. Janzen (J. Org. Chem. 57: 2646 - 2651, 1992). Implica la condensación de un aldehído con una hidroxilamina. La hidroxilamina es inestable y se prepara fresca el día de su uso usando un catalizador de cinc activado. La síntesis es como sigue.

Tabla 1 - Sustancias químicas requeridas previamente

1. Etanol al 95 %
2. 2-Metil-2-nitropropano
3. Polvo de cinc
4. Ácido acético glacial
5. Éter dietílico
6. Cloruro sódico saturado
7. Sulfato magnésico, anhidro, sólido
8. Ácido 4-formil-1,3-bencensulfónico (PM 310,21 g/mol), sal disódica, hidrato
9. Metanol
10. Diclorometano

Tabla 2 - Preparación de la N-t-butilhidroxilamina

1. Se equipa un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 500 ml con una barra de agitación magnética, un adaptador para termómetro, un termómetro y un embudo de adición.
2. Se añadió etanol al 95 % (350 ml) al matraz y se enfrió hasta 10°C en un baño de hielo.
3. Se añadieron 2-metil-2-nitropropano (6,18 g, 0,060 mol) y polvo de cinc (5,89 g, 0,090 mol) en porciones individuales.
4. Se puso ácido acético glacial (10,8 g, 0,180 mol) en el embudo de adición y se añadió gota a gota con agitación vigorosa a una velocidad tal que se mantuviera la temperatura por debajo de 15°C.

5. Se retiró el baño de hielo y la mezcla se agitó durante 3 h a temperatura ambiente.
6. El disolvente se depuró de la mezcla, dejando t-butilhidroxilamina, acetato de cinc y agua.
7. Se añadió diclorometano (50 ml) y la mezcla se filtró a través de un embudo de Buchner.
8. La torta de acetato de cinc que quedó sobre el papel de filtro se lavó con 2 x 25 ml de diclorometano.
- 5 9. Se separó el agua del filtrado en un embudo de separación y la capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico.
10. El sulfato magnésico se eliminó filtrando a través de papel de filtro estriado, después se depuró el diclorometano mediante evaporación rotatoria.
- 10 11. El producto (rendimiento del 100 % = 5,34 g), un líquido viscoso, se disolvió en metanol (50 ml) para su uso a continuación.

Tabla 3 - Preparación de la 2,4-disulfonilfenil-N-t-butilnitrona

1. Se preparó un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 250 ml con una barra de agitación magnética, un tubo de dispersión de gas, un embudo de adición y un condensador de Friedrichs enfriado con agua helada recirculante.
- 15 2. Al matraz se añadieron 200 ml de metanol, ácido 4-formil-1,3-bencendisulfónico (9,31 g, 30 mmol) y N-t-butilhidroxilamina (25 ml de la disolución en metanol de la parte A, 30 mmol teóricos).
3. La reacción se calentó a reflujo con un revestimiento calefactor mientras se burbujeaba la reacción con nitrógeno, con agitación.
4. La mezcla se puso a reflujo durante 2 horas.
- 20 5. Se añadió el resto de la hidroxilamina anterior.
6. Se continuó el reflujo con burbujeo de nitrógeno durante al menos 18 horas, pero no más de 24 horas.
7. La mezcla de reacción caliente se filtró en un embudo de Buchner, y el sólido se lavó con metanol caliente.
8. El metanol se depuró mediante evaporación rotatoria hasta un aceite amarillo viscoso.
9. Se añadió etanol:acetona 1:1 caliente (200 mL) y la mezcla se calentó para disolver el aceite.
- 25 10. La disolución se enfrió hasta cristalizar el producto.
11. El producto se recogió en un embudo de Buchner y se secó a vacío hasta el día siguiente.
12. La reacción da normalmente un rendimiento del 75 % de I, un polvo blanco.

Asimismo, en la técnica anterior se desvelan otros procedimientos de síntesis.

4. Tratamientos combinados

- 30 En una forma de realización, la 2,4-ds-PBN puede usarse junto con otra terapia para gliomas, tal como radiación, PCV, DFMO, CCNU o BCNU. Estas composiciones serían proporcionadas en una cantidad eficaz combinada para destruir o inhibir la proliferación celular. Este proceso puede implicar poner en contacto las células con los agentes al mismo tiempo. Esto puede conseguirse poniendo en contacto la célula con una única composición o formulación farmacológica que incluya ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en las que una composición incluye la 2,4-ds-PBN y la otra incluye el segundo agente.
- 35

Alternativamente, la terapia con 2,4-ds-PBN puede preceder o seguir al tratamiento con el otro agente en intervalos que varían desde minutos hasta semanas. En las formas de realización en las que el otro agente y la 2,4-ds-PBN se aplican por separado a la célula, tejido u organismo, generalmente habría que asegurarse de que no pase un periodo de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de forma que los agentes todavía serían capaces de ejercer un efecto combinado ventajosamente sobre la célula. En dichos casos, se contempla que se ponga en contacto la célula con ambas modalidades en aproximadamente 12 - 24 h el uno del otro, y más preferiblemente, en aproximadamente 6 - 12 h el uno del otro. En algunas situaciones, puede ser deseable prolongar el periodo de tiempo de tratamiento significativamente, sin embargo, con un lapso de varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7) hasta varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las respectivas administraciones.

- 45 Se contemplan múltiples administraciones de cada agente. Por ejemplo, si la terapia con 2,4-ds-PBN es "A" y el agente de terapia secundaria es "B," se contempla lo siguiente:

A/B/A	B/A/B	B/B/A	A/A/B	A/BB	B/A/A	A/B/B/B	B/A/B/B
B/B/B/A	B/B/A/B		A/A/B/B	A/B/A/B		A/B/B/A	BB/A/A
B/A/B/A	B/A/AB		A/A/A/B	B/A/A/A		AB/A/A	A/A/B/A

- 50 Se evaluarán los pacientes para comprobar los cambios morfológicos considerados independientes del tumor, y se clasificarán usando los criterios de toxicidad habituales de NCI (neurotoxicidad). Aparte de las pruebas de audiometría de la línea base, se realizan repetidas pruebas de audiometría para comprobar la ototoxicidad a discreción del médico para los pacientes que tengan signos de pérdida de audición o de progresión de la pérdida de audición mediante un examen neurológico. Además se realiza un recuento sanguíneo quincenal, y se realizan pruebas de creatinina sérica, fosfatasa alcalina, bilirrubina y alanina aminotransferasa antes de cada ciclo. Las dosis pueden modificarse durante el curso del tratamiento, basándose principalmente en los recuentos de neutrófilos y de plaquetas (vincristina, lomustina y matulane) o en la ototoxicidad (DFMO). Ocasionalmente se requieren reducciones en la dosis de DFMO debido a la diarrea.
- 55

A. PCV

La PCV es una terapia de combinación de fármacos que emplea tres agentes diferentes - un derivado de hidracina, matulane, una nitrosourea, lomustina y un agente de interacción con la tubulina, vincristina. Se ha usado en varios ensayos clínicos, muy notablemente por el inventor para evaluar su efecto sobre tumores de glioma y de

5 bulboblastoma de grado alto. El principal efecto secundario observado con la PCV era la mielotoxicidad limitante de la dosis. Cada uno de los componentes de la PCV se describe a continuación.

Debería mencionarse que la presente invención podría incluir el uso de BCNU en lugar de CCNU (lomustina) dado que ambas son nitrosoureas. También se contempla que podría usarse CCNU y procarbicina o BCNU y procarbicina, sin vincristina, dado que la vincristina habitualmente se considera como el menos activo de los

10 fármacos de la combinación de PCV.

Tanto las hidracinas como las nitrosoureas son agentes alquilantes. Como grupo, los agentes alquilantes forman aductos químicos covalentes con las moléculas celulares de proteínas, ADN y ARN, y con aminoácidos menores, glutatión y compuestos químicos similares. Generalmente, estos agentes alquilantes reaccionan con un átomo nucleófilo en un constituyente celular, tal como un grupo amino, carboxilo, fosfato, sulfhidrilo de los ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos o glutatión. El mecanismo y el papel de estos agentes alquilantes en la terapia oncológica no es bien comprendido. Además de las hidracinas y las nitrosoureas, los agentes alquilantes incluyen: triacenos tales como dacarabina y temozolomida, mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, ciclofosfamida, isofamida, mecloretamina, melfalano, mostaza de uracilo; aciridina tal como tiotepa; ésteres de metansulfonato tales como busulfano; complejos de platino tales como cisplatino, carboplatino; alquilantes biorreductores, tales como mitomicina y altretamina. Cualquiera de estos compuestos puede usarse conjuntamente o individualmente, en combinación con los compuestos de la presente invención.

15

20

i. Hidracina y derivados de triaceno

La hidracina y los derivados de triaceno son similares a las nitrosoureas porque se descomponen espontáneamente o se metabolizan para producir iones de alquil carbonio, que alquilan el ADN. Esta clase de compuestos incluyen matulane, dacarabina y temozolomida.

25

El principio activo del matulane es el clorhidrato de procarbicina (N-isopropil-alfa-(2-metilhidracin)-p-toluamida, monoclorhidrato). Está disponible en Roche Laboratories, Inc. Fue aprobado en 1969 para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin. La forma típica es una cápsula oral que contiene 50 mg de procarbicina en forma de clorhidrato. Las dosis varían dependiendo de si se usa la procarbicina como un fármaco de combinación con otros fármacos antineoplásicos o como un único agente terapéutico. Una directriz sugerida por el PDR para el uso del agente individual es de 100 mg dos veces al día durante 14 días.

30

El modo exacto de las acciones del matulane no está claro. Hay algunas pruebas de que el fármaco actúa inhibiendo la síntesis de proteínas, ARN y ADN. Principalmente es metabolizado en el hígado y en los riñones, y parece ser auto-oxidado al derivado azo con la liberación de peróxido de hidrógeno. El derivado azo isomeriza a la hidrazona, y después de la hidrólisis, se divide o en un derivado de bencilaldehído y metilhidracina. La metilhidracina se degrada adicionalmente a CO₂ y CH₄, y posiblemente hidracina, mientras que el aldehído es oxidado al ácido, que es excretado en la orina.

35

El matulane muestra una actividad inhibidora de la monoamino oxidasa (IMAO), por lo que debería seguirse una dieta restringida en alimentos con un elevado contenido en tiramina. Los fármacos que deben evitarse durante la terapia incluyen antihistamínicos, simpaticomiméticos, barbitúricos, narcóticos, agentes hipotensores o fenotiacinas, y alcohol etílico. Algunos alimentos también deben evitarse durante el tratamiento con procarbicina, tales como quesos añejos, chocolates, frutos secos y plátanos, ya que teóricamente podrían dar lugar a una complicación hipertensiva en algunos pacientes. También puede producirse una toxicidad inaceptable si se usa el matulane en pacientes con un deterioro de la función renal y/o hepática. El tratamiento podría restringirse en el caso de signos o síntomas del sistema nervioso central tales como parestesias, neuropatías o confusión; neutropenia (recuento absoluto de neutrófilos por debajo de 1.500/ml), trombocitopenia (plaquetas por debajo de 100.000/ml), reacciones de hipersensibilidad, ulceraciones o puntos persistentes de dolor alrededor de la cavidad oral, diarrea o heces blandas, hemorragias o tendencia al sangrado.

40

45

Algunas reacciones adversas pero esperadas incluyen leucopenia, neutropenia, anemia y trombocitopenia. Algunos efectos secundarios agudos referidos habitualmente son náuseas y vómitos durante o poco después de la administración de la dosis.

50

ii. Nitrosoureas

Las nitrosoureas representan un grupo de agentes terapéuticos alquilantes. Esta clase de compuestos incluye lomustina, carmustina, semustina, esteptozocina y nimustina.

55

(a) Lomustina

La lomustina es un agente alquilante sintético, también conocido como CCNU, con el nombre químico de 1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea. Fue aprobada en 1977 para el tratamiento de tumores cerebrales y de la enfermedad de Hodgkin. Está disponible en Bristol Myers Squibb como cápsulas orales, disponibles en formas de 10 mg, 40 mg y 100 mg. Las dosis pueden variar dependiendo de si se usa la lomustina como un único agente o en una combinación además de otros agentes quimioterápicos. Como agente único en pacientes no tratados previamente, la dosis recomendada por el PDR es de 130 mg como una única dosis oral cada 6 semanas. La lomustina atraviesa la barrera hematoencefálica.

Se cree que la CCNU alquila el ADN y el ARN. Tiene resistencias cruzadas con otras nitrosoureas y con algunos, pero no todos, los agentes alquilantes. También puede inhibir varios procesos enzimáticos claves mediante la carbamoylación de aminoácidos de las proteínas.

Los efectos secundarios tóxicos más habituales y graves son una supresión de la médula ósea que conduce a trombocitopenia y leucopenia, que puede contribuir a hemorragias e infecciones. La toxicidad en la médula ósea es acumulativa, y por lo tanto deben considerarse ajustes de la dosis sobre la base de los recuentos sanguíneos en el punto más bajo procedentes de dosis previas.

(b) Carmustina

La carmustina, también conocida como BCNU, con el nombre químico de N,N'-bis(2-cloroetil)-N-nitrosourea, es un agente alquilante de nitrosourea aprobado por la FDA en 1977. La carmustina se ha usado durante muchos años para el tratamiento de tumores cerebrales primarios, y se usa para el tratamiento de gliomas. La carmustina está disponible en Bristol Meyers Squibb en envases que contienen viales 10 mg de carmustina y 3 ml de diluyente estéril para su administración mediante inyección i.v. Como un único agente, la carmustina se administra aproximadamente a 150-200 mg/m² cada 6 semanas. En regímenes de combinación, la carmustina puede administrarse a una dosis similar a la de la lomustina. Un modo alternativo de administración es mediante obleas implantadas directamente en el sitio del tumor (Gliadel® Wafer).

Los potenciales efectos secundarios incluyen supresión de la médula ósea, anemia, diarrea, disminución de los recuentos de leucocitos y plaquetas, toxicidad pulmonar y dificultades en la deglución.

iii. Agentes de interacción con la tubulina

Los agentes de interacción con la tubulina interfieren en la división celular uniéndose a sitios específicos en la tubulina, una proteína que polimeriza para formar los microtúbulos celulares. Los microtúbulos son unidades estructurales críticas de la célula. Cuando los agentes de interacción se unen a la proteína, la célula no puede formar los microtúbulos adecuadamente. Los agentes de interacción con la tubulina incluyen vincristina y vinblastina, ambos alcaloides, y los taxanos, tales como paclitaxel y docetaxel.

La vincristina está disponible como Oncovin™ en Eli Lilly & Company y como sulfato de vincristina en Faulding. También denominada vincalécoblastina, un 22-oxo-, sulfato (1:1) (sal), la sal de un alcaloide obtenida a partir de una hierba con flor habitual, la planta de la vinca. Se administran mediante inyección intravenosa. Fue aprobada en 1963 etiquetada para sarcoma de Ewing, rabdomiosarcoma, tumor de Wilm, neuroblastoma, enfermedad de Hodgkin y leucemia.

El mecanismo de acción todavía se está investigando; sin embargo, hay indicios de que está implicada en la inhibición de la formación de microtúbulos en el haz mitótico, dando como resultado una detención de las células en división en la metafase. El hígado es el principal órgano excretor. La mayoría de una dosis intravenosa de vincristina es excretada en la bilis tras una rápida unión a tejidos. La vincristina no parece atravesar la barrera hematoencefálica.

Se ha informado de que la vincristina reduce los niveles sanguíneos de medicamentos anticonvulsivos y aumenta la actividad convulsivante. La reacción adversa más habitual es la pérdida de pelo. Aparece leucopenia, dolor neurítico y estreñimiento, pero habitualmente durante menos de 7 días.

B. DFMO

Hay numerosos tipos de cánceres muy proliferativos asociados con un incremento de los niveles de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en los tejidos tumorales y en la sangre y la orina de mamíferos con cáncer. Los estudios han demostrado que esto puede estar relacionado con un aumento en la síntesis de poliaminas por la enzima limitante de la velocidad, la descarboxilasa de ornitina (ODC). La ruta sintética de la poliamina comienza con la L-ornitina. Este aminoácido natural, aunque normalmente no está incorporado en las proteínas, es parte del ciclo de la urea que metaboliza arginina a ornitina y urea. La ornitina es convertida por la descarboxilasa de ornitina (ODC) en putrescina y CO₂ y se considera que es la etapa limitante de la velocidad en la producción de poliaminas. Con la adición de la propilamina donada desde la S-adenosilmetionina, la putrescina es convertida en espermidina. La espermidina es convertida entonces en espermina por la sintetasa de espermina, de nuevo en asociación con la

descarboxilación de la S-adenosilmetionina. La putrescina, la espermidina y la espermina representan tres poliaminas importantes en los tejidos de mamíferos. Las poliaminas se encuentran en los tejidos animales y en microorganismos, y se sabe que juegan un importante papel en el crecimiento y la proliferación celular. Aunque no se conoce el mecanismo exacto del papel de las poliaminas en el crecimiento y la proliferación celular, parece que las poliaminas pueden facilitar los procesos macromoleculares tales como la síntesis de ADN, ARN o proteínas. Se sabe que los niveles de poliaminas están altos en los testículos, la próstata ventral y el timo, en lesiones psoriáticas de la piel y en otras células que experimentan procesos de crecimiento rápido.

También se sabe que la rápida proliferación del tejido tumoral está marcada por una elevación anormal de los niveles de poliaminas. Así, las poliaminas también pueden jugar un importante papel en el mantenimiento del crecimiento tumoral. Por lo tanto, los inhibidores de la ODC, tales como la DFMO, pueden ejercer su efecto terapéutico bloqueando la formación de las poliaminas, y ralentizando, interrumpiendo o deteniendo así la proliferación o la metástasis del tejido tumoral.

La DFMO (α -difluorometilornitina, eflornitina, Ornidil®) es un análogo estructural del aminoácido L-ornitina y tiene una fórmula química $C_6H_{12}N_2O_2F_2$ - la DFMO puede emplearse en los procedimientos de la invención como una mezcla racémica (50/50) de los enantiómeros D y L, o como una mezcla de los isómeros D y L en la que el isómero D está enriquecido con respecto al isómero L, por ejemplo, el 70 %, 80 %, 90 % o más en peso del isómero D con respecto al isómero L. La DFMO empleada también puede estar sustancialmente exenta del enantiómero L.

El efecto tóxico limitante de la dosis de la DFMO es la trombocitopenia (anormalmente pocas plaquetas en sangre), que se produce en aproximadamente el 50 % de los pacientes, leucopenia (anormalmente pocos leucocitos) o anemia. Este efecto tóxico es relativamente perjudicial y reversible, y cesa al retirar el fármaco.

Se ha evaluado el efecto de un inhibidor de la ODC para el control de la tasa de crecimiento de tejido tumoral de proliferación rápida en modelos tumorales animales estándar. Por ejemplo, se ha demostrado el efecto antitumoral de la DFMO en los siguientes modelos animales tumorales: leucemia L1210 en ratones, tumor EMT6 en ratones Balb/C, tumores mamarios inducidos por 7,12-dimetilbenzantraceno (inducidos por DMBA) en ratas y hepatoma de Morris por DFMO 7288C o 5123 en ratas Buffalo. Además, se ha demostrado el efecto antitumoral de la DFMO en combinación con diversos agentes citotóxicos como sigue: (a) en combinación con vindesina o adriamicina en ratones con leucemia L1210, en hepatoma de Morris 7288C en ratas Buffalo y en tumor EMT6 en ratones, (b) en combinación con arabinósido de citosina en leucemia L1210 en ratones, (c) en combinación con metotrexato en leucemia L1210 en ratones, (d) en combinación con ciclofosfamida en tumor EMT6 en ratones y en tumor inducido por DMBA en ratones, (e) en combinación con BCNU en el tumor cerebral glioma 26 en ratones, y (f) en combinación con MGBG en leucemia L1210 en ratones, en hepatoma de Morris 7288C en ratas Buffalo, en leucemia linfocítica P388 en ratones, y en sarcoma S-180 en ratones.

Aunque la DFMO puede efectivamente bloquear la biosíntesis de putrescina en el tumor, el efecto antitumoral resultante es la citostasis, no la citotoxicidad. Por ejemplo, la DFMO reduce la tasa de crecimiento de un sarcoma MCA, pero no produce la regresión del tumor. Este hallazgo es coherente con los informes de otros investigadores que demostraron que la DFMO es un agente citostático. Sin embargo, algunos estudios indican que puede existir un papel significativo para los agentes de DFMO que permitan el futuro desarrollo de regímenes quimioterapéuticos de combinación que incorporen la DFMO.

La promesa inicial de la DFMO como inhibidor terapéutico de la ODC para su uso en el tratamiento de diversas neoplasias se ha debilitado un poco porque, aunque de hecho la DFMO inhibe irreversiblemente la actividad de la ODC, las células tratadas *in vivo* con DFMO aumentan significativamente su captación de putrescina exógena, según se describe en la patente de EE.UU. 4.925.835. Los mecanismos de transporte intercelular de la célula realizan una "maniobra evasiva" alrededor de la actividad de la ODC deteriorada por la DFMO, importando la putrescina desde el medio extracelular. Por lo tanto, el efecto de la DFMO *in vivo* es bastante menor que *in vitro*. Por lo tanto, aunque el tratamiento con DFMO inhibe efectivamente la neogénesis intracelular de putrescina, también produce un aumento en la captación de putrescina extracelular, compensando así su efecto inhibidor de la ODC.

Este problema se ve exacerbado por el hecho de que la putrescina está presente en muchos alimentos habituales, tales como el zumo de pomelo, que contiene aproximadamente 400 ppm de putrescina. Esto hace prácticamente imposible proporcionar a un paciente una dieta nutricionalmente eficaz que esté exenta de putrescina. Por lo tanto, las células tratadas con DFMO son capaces de importar suficientes cantidades de putrescina extracelular para ayudar a la división celular.

Las estrategias para hacer más aceptable la DFMO en pacientes humanos se describen en la patente de EE.UU. 4.859.452. Se describen formulaciones de DFMO que incluyen aminoácidos esenciales en combinación con arginina u ornitina para ayudar a reducir la toxicidad inducida por la DFMO.

C. Radiación

Algunos factores que provocan daños en el ADN y que han sido usados ampliamente para la terapia oncológica incluyen lo que habitualmente se conoce como rayos γ , rayos X y/o la administración dirigida de radioisótopos a células tumorales. También están contempladas otras formas de factores de daños al ADN, tales como microondas

y radiación UV. Es muy probable que todos estos factores efectúen amplio rango de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y en la reparación del ADN, y en el ensamblaje y el mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para los rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens para periodos prolongados de tiempo (de 3 a 4 semanas), hasta dosis individuales de 2.000 a 6.000 roentgens. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, de la fuerza y del tipo de radiación emitida y de la captación por las células neoplásicas. Los términos "contactada" y "expuesta", cuando se aplican a una célula, se usan en este documento para describir el proceso mediante el cual un constructo terapéutico y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico son suministrados a una célula objetivo o son colocados directamente en yuxtaposición con la célula objetivo. Para conseguir la destrucción o la estasis celular, ambos agentes son suministrados a una célula en una cantidad combinada eficaz para destruir la célula o evitar que se divida.

D. Cirugía

Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer experimentaron cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, diagnóstica o de clasificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa como tratamiento del cáncer puede usarse junto con otras terapias, tales como el tratamiento de la presente invención, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas. La cirugía curativa incluye la resección, en la que todo o parte del tejido canceroso se elimina, extirpa y/o destruye físicamente. La resección del tumor se refiere a la eliminación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección del tumor, el tratamiento por cirugía incluye la cirugía por láser, la criocirugía, la electrocirugía y la cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). Adicionalmente se contempla que la presente invención pueda usarse junto con la eliminación de cánceres superficiales, precánceres o cantidades menores de tejido normal.

5. Formulaciones farmacéuticas

La presente invención desvela numerosas composiciones, que en ciertos aspectos de la invención, son administradas a animales. Por ejemplo, serán formulados para su administración la 2,4-ds-PBN, así como varios agentes quimioterapéuticos secundarios. Cuando se contemplan aplicaciones clínicas será necesario preparar composiciones farmacéuticas de estos compuestos y composiciones en una forma apropiada para la aplicación pretendida. Generalmente, esto implicará la preparación de composiciones que estén esencialmente exentas de pirógenos, así como de otras impurezas que podría ser perjudiciales para los seres humanos o los animales.

Generalmente se desearía emplear las sales y tampones apropiados para hacer que los agentes sean adecuados para su introducción en un paciente. Las composiciones acuosas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz del agente, disuelta o dispersada en un portador o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas ni otras reacciones adversas cuando se administran a un animal o a un ser humano. Según se usa en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cualesquiera de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes con sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la materia. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o células de la presente invención, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. En las composiciones también pueden incorporarse principios activos complementarios, tales como otros agentes antineoplásicos.

Las disoluciones de los principios activos como base libre o sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropil celulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, mezclas de los mismos y en aceites. En unas condiciones de almacenamiento y uso ordinarias, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Los vehículos intravenosos incluyen fluidos y reponedores de nutrientes. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes del fármaco se ajustan según parámetros bien conocidos.

Una cantidad eficaz de los agentes se determina basándose en el objetivo pretendido. El término "dosis unitaria" se refiere a una unidad físicamente pequeña adecuada para su uso en un sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la composición terapéutica, calculada para producir la respuesta deseada en asociación con su administración, es decir, la vía apropiada y el régimen de tratamiento. La cantidad que se va a administrar, tanto según el número de tratamientos como la dosis unitaria, dependerá del sujeto que se va a tratar, del estado del sujeto y de la protección deseada. Las cantidades precisas de la composición terapéutica también dependen del juicio del médico, y son peculiares para cada individuo.

A. Administración enteral

Los compuestos activos de la presente invención pueden formularse ventajosamente para su administración enteral, por ejemplo, formulados para su administración oral. Las formas farmacéuticas pueden incluir aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de composiciones

ingeribles, incluyendo comprimidos, píldoras y cápsulas. También se contempla que los agentes de la presente invención puedan proporcionarse en forma de un aditivo alimentario e incorporarse en un programa dietético diario. Todas estas formas se eligen generalmente para que sean estériles y estables en las condiciones de elaboración y de almacenamiento.

- 5 Los compuestos activos pueden formularse en una composición en forma neutra o de una sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o con ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

- 10 El portador también puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, para el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede llevarse a cabo mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes de isotonicidad, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

- 20 Las disoluciones estériles inyectables se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización por filtración. Generalmente las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos particulares de preparación son técnicas de secado a vacío y de liofilización, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado, a partir de una disolución previamente filtrada estéril de los mismos.

B. Otras vías de administración

- 30 Además de los compuestos formulados para su administración enteral, se contemplan formulaciones parenterales tales como la inyección intravenosa o intramuscular. La administración también puede ser nasal, bucal, rectal, vaginal o tópica. Alternativamente, la administración puede ser mediante inyección intradérmica, subcutánea o intraperitoneal. También se contempla la perfusión continua a través de un catéter. Dichas composiciones se administrarían normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables, descritas más arriba.

6. Ejemplos

- 35 Los siguientes ejemplos están incluidos para demostrar formas de realización particulares de la invención. Los expertos en la materia debería apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto, puede considerarse que constituyen específicamente modos contemplados para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían apreciar, a la luz de la presente desvelación, que pueden realizarse muchos cambios en las formas de realización específicas que se desvelan, y aun así obtener un resultado parecido o similar sin desviarse del espíritu y el ámbito de la invención.

Ejemplo 1

- 45 Los inventores usaron un procedimiento de implantación de células de glioma C6 de rata, ampliamente aceptado en el campo de investigación de los gliomas, como un buen modelo de gliomas. Para inducir el glioma en ratas, se inyectaron células de glioma C6 de rata (se inyectaron 10^6 células en $10 \mu\text{l}$ en la corteza cerebral de ratas Fischer 344 macho. Quince días después se administró por vía oral la 2,4-ds-PBN a través del agua de bebida (0,015 %, 17,5 mg/kg). La eficacia de la 2,4-ds-PBN se evaluó según los patrones de crecimiento y tasas de crecimiento del tumor usando procedimientos con imágenes por resonancia magnética (RM) (imágenes ponderadas en T1/T2) durante el transcurso de un mes.

- 50 Las FIGS. 1A - C muestran un ejemplo del desarrollo progresivo de un glioma de rata en los días 10 (FIG. 1A), 15 (FIG. 1B) y 18 (FIG. 1C) después de la implantación intracerebral de células de glioma C6 de rata. También se realizaron evaluaciones histológicas para el modelo de glioma C6 de rata. Las FIGS. 2-1(a) - 2-2(c) muestran cortes histológicos representativos de regiones asociadas con el glioma, y de tejido de control comparativo en el lado contralateral. Los datos de inmunohistoquímica para el factor de von Willebrand indican que hay presente una proliferación de células endoteliales en los centros necróticos (FIG. 2-2c), y se revelan pequeños vasos sanguíneos en otras partes del glioma (FIG. 2-2b), mientras que no hay presencia de nueva vasculatura en el corte de control (FIG. 2-2a), lo que indica la presencia de angiogénesis asociada a la formación del glioma.

La FIG. 4 representa una serie de imágenes por RM tomadas durante un periodo de 25 días para un grupo de control no tratado, y datos representativos (mejor caso, efecto intermedio y peor caso) para ratas tratadas con 2,4-ds-PBN (a través de la administración con el agua de bebida a una dosis de 17 mg/kg/día). Los estudios de la 2,4-ds-PBN indicaron que se observó un efecto similar al observado para la PBN, donde los volúmenes del tumor de glioma C6 estaban significativamente disminuidos (disminución >15 veces; n = 15 para ratas tratadas con 2,4-ds-PBN, y n = 5 para las ratas no tratadas) en ratas tratadas con 2,4-ds-PBN (véase la FIG. 5). Las ratas tratadas con 2,4-ds-PBN consiguieron una supervivencia >80 % durante el periodo de estudio de 40 días (n = 15), en comparación con las ratas no tratadas (n = 5). No se observaron efectos secundarios durante el periodo de tratamiento. Los principales signos de efectos adversos que se monitorizaron incluían pérdida de peso, alteraciones en la piel y cambios en el comportamiento y en la postura. No se detectaron efectos tóxicos (examen macroscópico de tejidos/órganos durante las necropsias y valoración histológica). La FIG. 6 ilustra uno de los posibles mecanismos de la 2,4-ds-PBN, en el que en células C6, se encuentra que es pro-apoptótico según aumenta la concentración.

Sin embargo, los estudios también demostraron que la PBN inhibía significativamente la proliferación celular de una forma dependiente de la concentración, pero por el contrario, las 2,4-ds-PBN y S-PBN mostraron un efecto pequeño. Los inventores examinaron entonces las expresiones de las proteínas iNOS y VEGF en las células C6 tratadas con la 2,4-ds-PBN. El tratamiento con la 2,4-ds-PBN (100 μ M) disminuyó significativamente la expresión de iNOS (disminución de aproximadamente el 75 %) en comparación con la PBN (disminución del 5 % a 100 μ M), y la expresión del VEGF se redujo en un 50 % cuando las células se trataron con 2,4-ds-PBN 5 mM. Estos resultados sugieren que la supresión tumoral por parte de la 2,4-ds-PBN depende de la disminución en la angiogénesis, la disminución en iNOS, así como del aumento de la apoptosis más que de la inhibición del crecimiento celular. El efecto de cada compuesto de nitrona sobre las células mostró la misma tendencia que en el modelo de rata, sugiriendo que el modelo celular puede replicar *in vivo* el mecanismo de regresión tumoral en este modelo. A partir de estos estudios puede concluirse que la 2,4-ds-PBN disminuye significativamente los volúmenes tumorales, así como que incrementa la probabilidad de supervivencia del sujeto.

Referencias

Las siguientes referencias proporcionan procedimientos ejemplares u otros detalles complementarios de los establecidos en este documento.

Publicación de Patente de EE.UU. 2007/0032453

Patente de EE.UU. 5.569.902

Patente de EE.UU. 5.488.145

Bigner y col., en: Pathology of Tumors of the Nervous System, Russell y Rubinstein (Eds.), 6ª Edición, Londres: Edward Arnold, 757, 1998.

Burger y col., en: Surgical Pathology of the Nervous System and Its Coverings, 3ª ed., Nueva York, Churchill Livingstone, Inc, 737, 1991.

Burger y col., Cancer, 56: 1106 - 1111, 1985.

Burger y col., Cancer, 59: 1345 - 1352, 1987.

Cao y col., Brain Res., 644: 267 - 272, 1994.

Cao y col., J. Clin. Oncol. 23: 4127 - 36, 2005.

Carney y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 88: 3633 - 3636, 1991.

Clough - Helfin y col., Free Radic. Res. Commun., 15: 177 - 186, 1991.

Daumas - Duport y col., J. Neurooncol., 34: 61 - 78, 1997.

Davis y col., J. Neurooncol., 24: 9 - 12, 1995.

Dehghani y col., Acta Neuropathol., 95: 493 - 504, 1998.

Dimova y col., Thromb. Haemost., 93: 1176 - 1184, 2005.

Doblas y col., Free Radic. Biol. Med. 44: 63 - 72, 2008.

Ernestus y col., Acta. Histochem. Suppl., 42: 159 - 164, 1992.

Ernestus y col., J. Neurooncol., 29 (2): 167 - 174, 1996.

Floyd y col., FASEB J., 4: 2587 - 2597, 1990.

Floyd y col., en: Neuroprotective Approaches to the Treatment of Parkinson's Disease and other Neurodegenerative Disorders, Chapman y col. (Eds.), Academic Press Limited, Londres, 69 - 90, 1996.

Floyd, Adv. Pharmacol., 38: 361 - 378, 1997.

Folbergrova y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 92: 5057 - 5061, 1995.

Heegard y col., Cancer, 76: 1809 - 1813, 1995.

Hensley y col., en: Neuroprotective Agents and Cerebral Ischaemia, Green y Cross (Eds.), Academic press Ltd., Londres, 299 - 317, 1996.

Hoshino y col., Int. J. Cancer, 53: 550 - 555, 1993.

Kleihues y Cavenee, en: Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System, IARC Press, Lion, 227 - 228, 2000.

Kleihues y Ohgaki, Brain Pathol, 7: 1131 - 1136, 1997.

Kleihues y Ohgaki, Neuro - Oncology, 1: 44 - 51, 1999.

Kleihues y col., en: Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System, 2ª Ed., Berlín: Springer - Verlag, 112, 1993.

- Kros y col., *Cancer*, 78: 1107 - 1113, 1996.
 Lamborn y col., *Cancer*, 85: 925 - 935, 1999.
 Levin y Prados, *J. Clin. Oncol.*, 10 (5): 766 - 771, 1992.
 Levin y col., *Clin. Cancer Res.*, 6 (10): 3878 - 3884, 2000.
 5 Levin y col., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 32 (1): 75 - 83, 1995.
 Muller y col., *Acta Neurochir (Wien)*, 37: 75 - 91, 1977.
 Pahlmark y col., *Acta Physiol. Scand.*, 157: 41 - 51, 1996.
 Pogrebniak y col., *Surgery*, 112: 130 - 139, 1992.
 Poyer y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 539: 402 - 409, 1978.
 10 Prados y col., *Neurosurgery*, 24 (6): 806 - 809, 1989.
 Scalabrino y Ferioli, *Cancer Detect. Prev.*, 8 (1 - 2): 11 - 16, 1985.
 Scalabrino y col., *J. Natl. Cancer Inst.*, 68 (5): 751 - 754, 1982.
 Schneider y col., *Acta Neuropathol* 107: 272 - 6, 2004.
 Shaw y col., *Neurosurgery*, 34: 577 - 582, 1994.
 15 Shuaib y col., *N. Engl. J. Med.* 357: 562 - 71, 2007.
 Wacker y col., *J. Neuro - Oncology*, 19: 113 - 122, 1994.
 Wang y Shuaib, *Drugs Aging* 24: 537 - 46, 2007.
 Wang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 92: 5510 - 5514, 1995.

REIVINDICACIONES

1. 2,4-disulfonil fenil terc-butil nitrona (2,4-ds-PBN) para su uso en un procedimiento de (a) tratamiento de un glioma mediante la inhibición de la vascularización, del crecimiento o de la diseminación de dicho glioma, (b) inhibición del desarrollo del glioma y (c) inhibición de la reaparición del glioma.
- 5 2. 2,4-ds-PBN para el uso de la reivindicación 1, en el que el procedimiento incluye la administración de 2,4-ds-PBN a través de una vía que requiere el subsiguiente paso de la 2,4-ds-PBN a través de la barrera hematoencefálica.
3. 2,4-ds-PBN para el uso de la reivindicación 2, en el que la vía es enteral, intravenosa o intraarterial.
4. 2,4-ds-PBN para el uso de la reivindicación 3, en el que la vía enteral es un complemento dietético de un componente alimenticio, o está en forma de una píldora o un líquido.
- 10 5. 2,4-ds-PBN para el uso de la reivindicación 4, en el que la cantidad eficaz de la 2,4-ds-PBN es desde aproximadamente el 0,005 % p/p hasta aproximadamente el 0,1 % p/p de la dieta que se está administrando.
6. 2,4-ds-PBN para el uso de la reivindicación 1, en el que el procedimiento incluye la administración de la 2,4-ds-PBN en una dosis que varía desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal por día.
- 15 7. 2,4-ds-PBN para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho glioma es un astrocitoma, un oligodendroglioma o un glioblastoma multiforme.
8. 2,4-ds-PBN para el uso de la reivindicación 1 (a), en el que el glioma es un glioma recurrente o metastásico, o en el que el glioma ha sido tratado previamente con una o más terapias anti-glioma y estas terapias han fracasado.
9. 2,4-ds-PBN para el uso de la reivindicación 1, en el que el procedimiento (a) está apoyado por una terapia anti-glioma secundaria, en particular, por radiación, cirugía o quimioterapia, tal como lomustina, vincristina, matulane, PCV (una combinación farmacológica de matulane, lomustina y vincristina), BCNU (carmustina), CCNU (lomustina) y/o DFMO (eflornitina).
- 20 10. 2,4-ds-PBN para el uso de la reivindicación 1, en el que el procedimiento (b) es para el tratamiento de un sujeto que tiene antecedentes familiares de cáncer o que ha sido expuesto a un entorno carcinógeno, en particular, en el que el entorno carcinógeno incluye la exposición a compuestos N-nitrosos o a radiación X.
- 25 11. 2,4-ds-PBN para el uso de la reivindicación 1, en el que el procedimiento (c) está apoyado por un segundo agente que inhibe la aparición de gliomas.

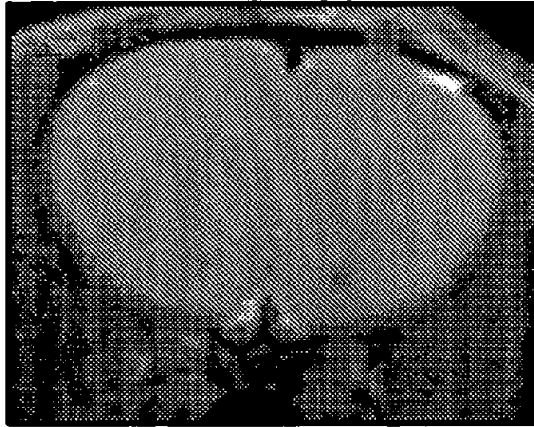


FIG. 1A

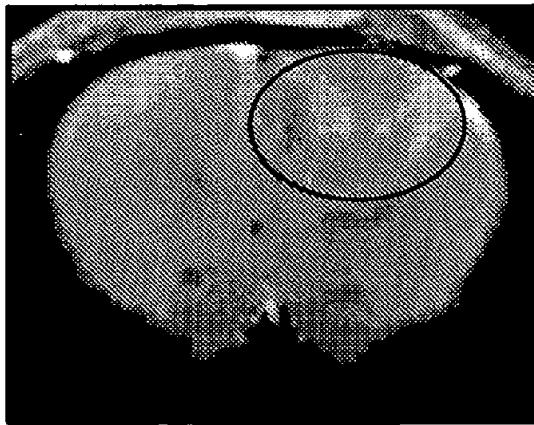


FIG. 1B

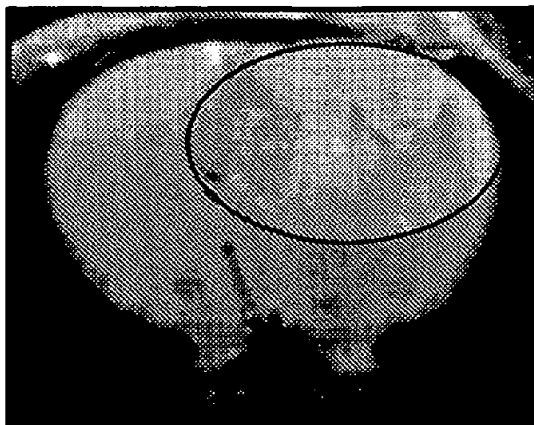


FIG. 1C

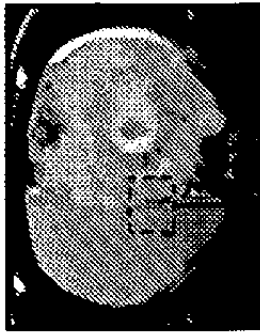


FIG. 2-1A



FIG. 2-1B



FIG. 2-1C

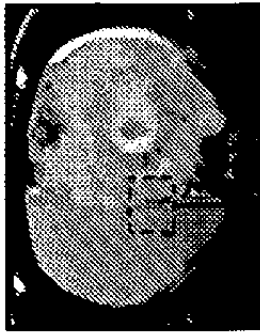


FIG. 2-1D

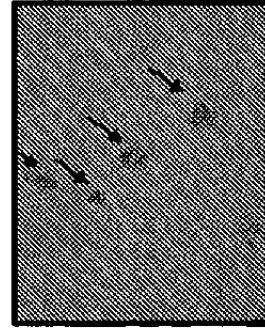
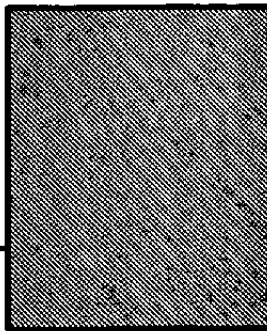
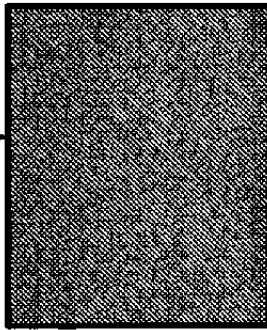
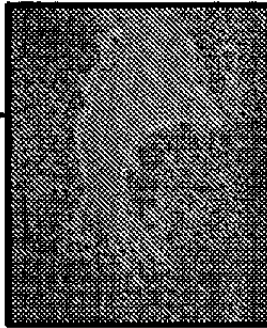
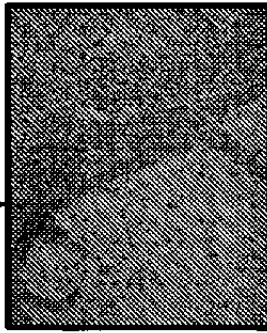


FIG. 2-2A

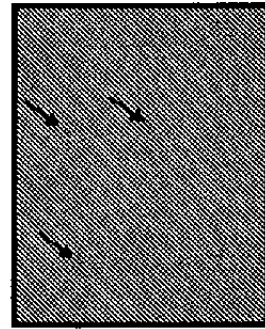


FIG. 2-2B

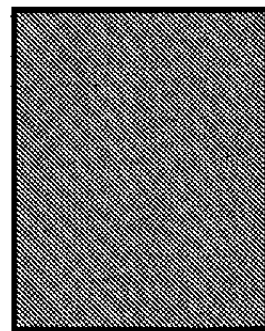


FIG. 2-2C

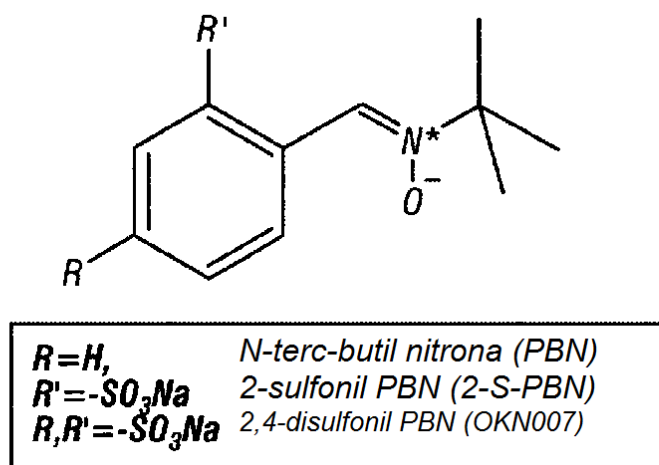


FIG. 3

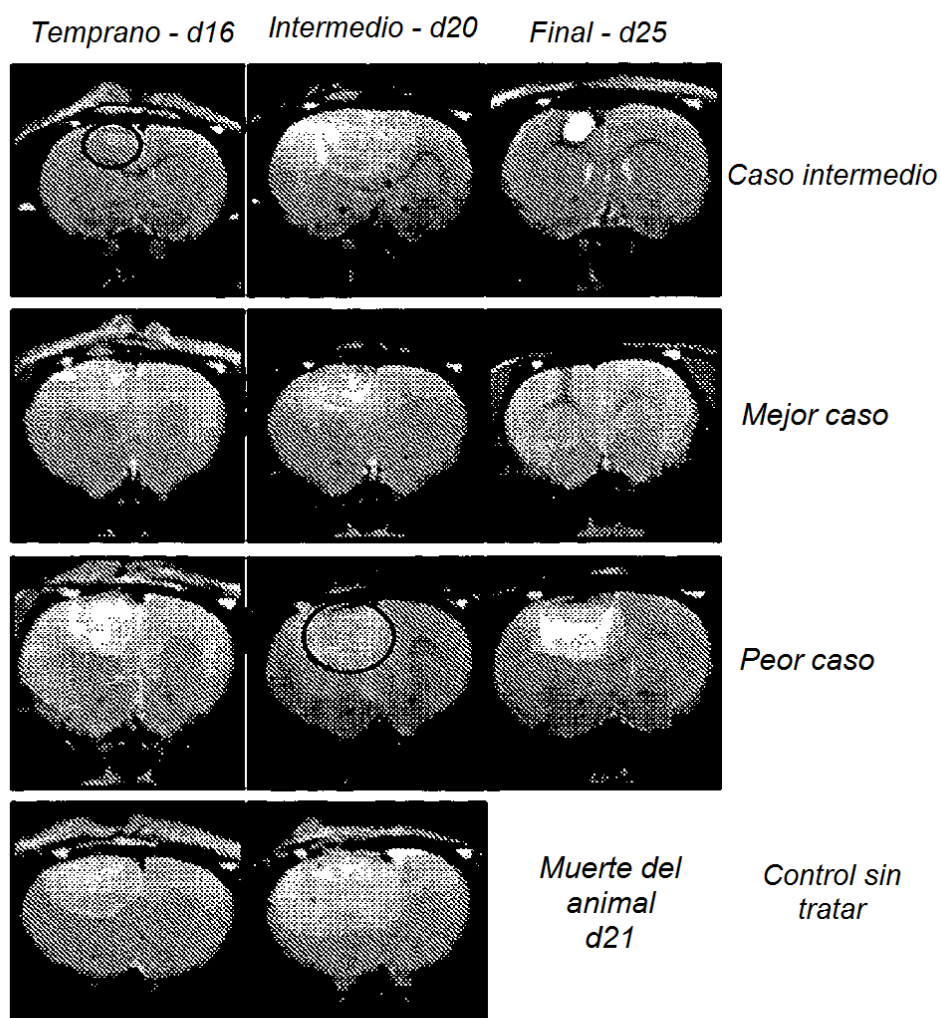


FIG. 4

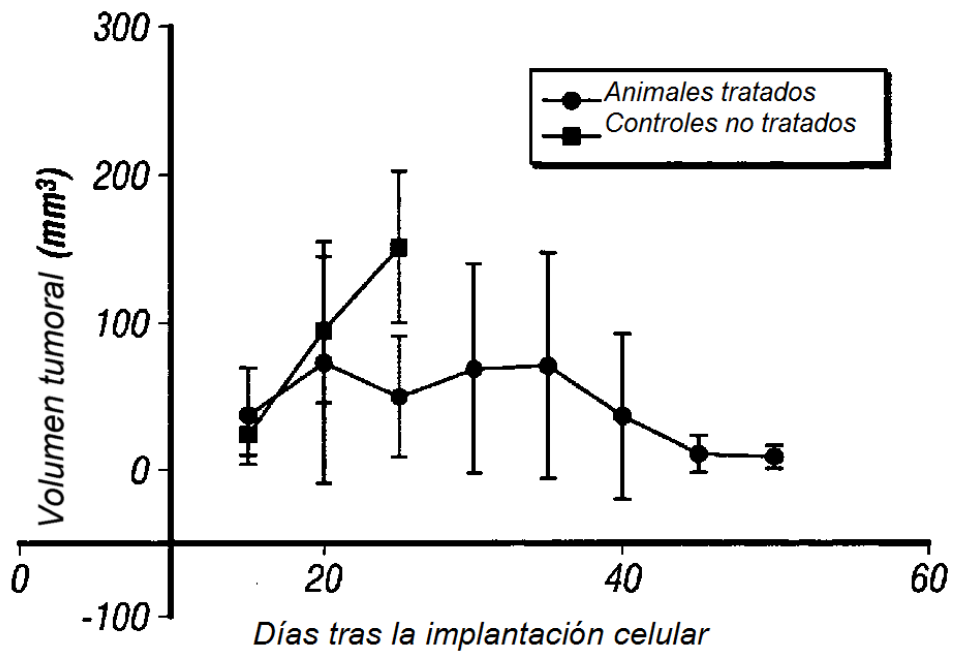


FIG. 5A

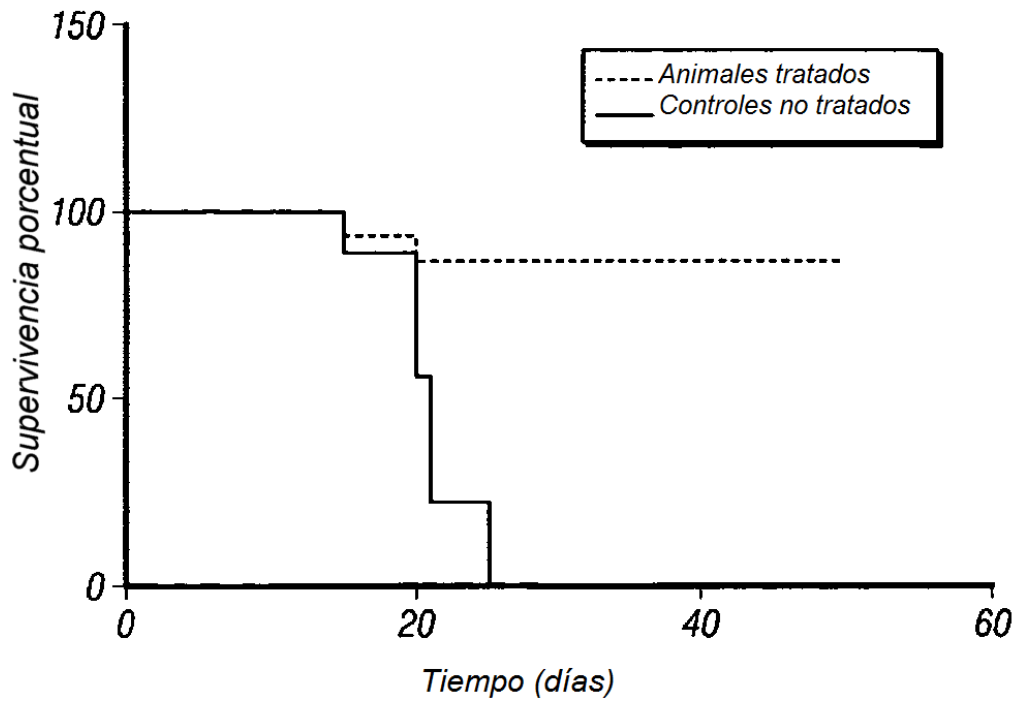


FIG. 5B

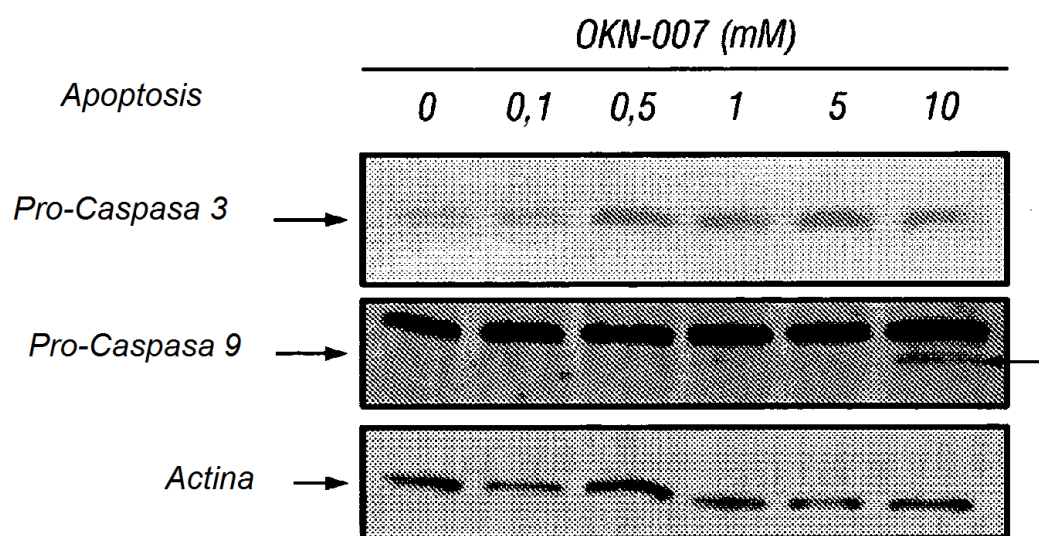


FIG. 6