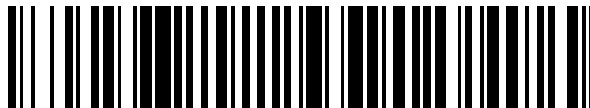


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 951**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/245** (2006.01)

**A61K 31/353** (2006.01)

**A61K 31/502** (2006.01)

**A61K 31/706** (2006.01)

**A61K 31/7068** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2009 E 09761954 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 2307002**

54 Título: **Combinaciones de sapacitabina o CNDAC con inhibidores de ADN metiltransferasa tales como decitabina y procaína**

30 Prioridad:

**09.06.2008 GB 0810552**

**17.04.2009 GB 0906696**

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

**25.04.2013**

73 Titular/es:

**CYCLACEL LIMITED (100.0%)**

**411 Tower Bridge Business Centre, 46-48 East**

**Smithfield, London**

**E1W 1AW , GB**

72 Inventor/es:

**GREEN, SIMON, RICHARD;**

**MACKAY, RUTH y**

**FLEMING, IAN, NEIL**

74 Agente/Representante:

ES 2 401 951 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

Combinaciones de sapacitabina o cndac con inhibidores de adn metiltransferasa tales como decitabina y procaína

5 Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

10 Las ADN metiltransferasas son una familia de enzimas que promueven la adición covalente de un grupo metilo a una base de nucleótido específica en una molécula de ADN. Todas las ADN metiltransferasas conocidas usan S-adenosilmetionina (SAM) como donador de metilo. Se han identificado cuatro ADN metiltransferasas activas en mamíferos. Se denominan DNMT1, DNMT2, DNMT3A y DNMT3B.

15 DNMT1 es la ADN metiltransferasa más abundante en células de mamífero y se considera que es la metiltransferasa de mantenimiento clave en mamíferos. Predominantemente, metila dinucleótidos CpG hemimetilados en el genoma de mamíferos y es responsable del mantenimiento de los patrones de metilación establecidos en el desarrollo. La enzima tiene aproximadamente 1620 aminoácidos de longitud, constituyendo los primeros 1100 aminoácidos el dominio regulador, y constituyendo los residuos restantes el dominio catalítico. Estos se unen mediante repeticiones de Gly-Lys. Se requieren ambos dominios para la función catalítica de DNMT1. DNMT3 es una familia de ADN metiltransferasas que pueden metilar CpG hemimetilado y no metilado a la misma velocidad. La arquitectura de las enzimas DNMT3 es similar a DNMT1 con una región reguladora unida a un dominio catalítico.

20 El trabajo reciente ha revelado la vinculación de la metilación del ADN y la estructura de la cromatina al nivel molecular y cómo las anomalías en la metilación desempeñan un papel causal directo en tumorigénesis y enfermedad genética. Ha salido a la luz mucha nueva información referente a ADN metiltransferasas, en cuanto a su papel en el desarrollo de mamíferos y los tipos de proteínas con las que se sabe que interaccionan. En vez de enzimas que actúan de manera aislada copiando los patrones de metilación tras la replicación, los tipos de interacciones descubiertas hasta la fecha indican que las ADN metiltransferasas pueden ser componentes de complejos mayores implicados de manera activa en el control de la transcripción y la modulación de la estructura de la cromatina. Estos hallazgos deben potenciar la comprensión de los miles de papeles de la metilación del ADN en la enfermedad, así como conducir a terapias novedosas para prevenir o reparar estos defectos.

25 Está bien establecido en la técnica que pueden administrarse a menudo agentes farmacéuticos activos en combinación con el fin de optimizar el régimen de tratamiento. La presente invención busca por tanto proporcionar una nueva combinación de agentes farmacéuticos conocidos que es particularmente adecuada para el tratamiento de trastornos proliferativos, especialmente cáncer. Más específicamente, la invención se centra en los efectos sorprendentes e inesperados asociados con el uso de determinados agentes farmacéuticos en combinación.

Declaración de la invención

35 En un primer aspecto, la invención proporciona una combinación que comprende un inhibidor de ADN metiltransferasa y 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoilcitosina, o un metabolito de la misma, que es 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina, seleccionándose el inhibidor de ADN metiltransferasa de azacitidina y decitabina.

40 Qin T *et al* (2007, 13, Clin. Cancer Res. 4225-4232) dan a conocer el efecto de combinaciones de citarabina y decitabina en diversas líneas celulares leucémicas humanas. Asimismo, Kong XB *et al* (1991, Molecular Pharmacol. 39, 250-257) sugieren que 5-azacitidina provoca la regulación por incremento de dCK en una línea celular que es resistente a citarabina, dando como resultado una disminución en el valor de CI<sub>50</sub> para citarabina desde 12,5 hasta 0,55 μM. Sin embargo, hasta la fecha no hay ninguna enseñanza sobre el uso de inhibidores de ADN metiltransferasa en combinación con sapacitabina, que tiene un modo de acción único sobre otros metabolitos de nucleósidos.

45 Un segundo aspecto proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación según la invención mezclada con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un tercer aspecto se refiere al uso de una combinación según la invención en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno proliferativo

50 Un cuarto aspecto se refiere a un producto farmacéutico que comprende un inhibidor de ADN metiltransferasa y 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoilcitosina, o un metabolito de la misma que es

1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina, como una preparación combinada para uso simultáneo, secuencial o separado en terapia, seleccionándose el inhibidor de ADN metiltransferasa de azacitidina y decitabina.

5 Un aspecto adicional se refiere al uso de un inhibidor de ADN metiltransferasa en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, comprendiendo dicho tratamiento administrar a un sujeto simultánea, secuencialmente o por separado 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina, o un metabolito de la misma que es 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina, y un inhibidor de ADN metiltransferasa, seleccionándose el inhibidor de ADN metiltransferasa de azacitidina y decitabina.

10 Un aspecto adicional se refiere al uso de un inhibidor de ADN metiltransferasa y 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabinopentofuranosil)-N4-palmitoicitosina, o un metabolito de la misma que es 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno proliferativo, seleccionándose el inhibidor de ADN metiltransferasa de azacitidina y decitabina.

15 Un aspecto adicional se refiere al uso de un inhibidor de ADN metiltransferasa en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, siendo dicho medicamento para su uso en terapia de combinación con 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina, o un metabolito de la misma, que es 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina y seleccionándose el inhibidor de ADN metiltransferasa de azacitidina y decitabina.

20 Un aspecto adicional se refiere al uso de 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina, o un metabolito de la misma que es 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, siendo dicho medicamento para su uso en terapia de combinación con un inhibidor de ADN metiltransferasa, seleccionándose el inhibidor de ADN metiltransferasa de azacitidina y decitabina.

25 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una combinación tal como se describió anteriormente para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo.

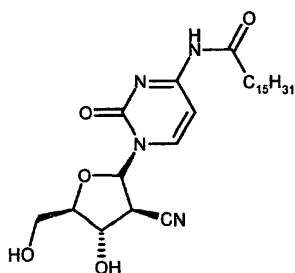
#### Descripción detallada

30 El efecto de las combinaciones de fármacos es inherentemente impredecible y a menudo hay una propensión a que un fármaco inhiba parcial o completamente los efectos del otro. La presente invención se basa en la sorprendente observación de que la administración de 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina y un inhibidor de ADN metiltransferasa en combinación, o bien simultáneamente, por separado o bien secuencialmente, no conduce a ninguna interacción adversa entre los dos agentes. La ausencia inesperada de ninguna interacción antagonista de este tipo es crítica para aplicaciones clínicas.

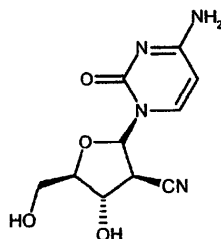
35 En una realización preferida, la combinación de 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina e inhibidor de ADN metiltransferasa produce un efecto potenciado en comparación con cualquier fármaco administrado solo. La naturaleza sorprendente de esta observación está en contraposición con lo esperado basándose en la técnica anterior.

Las realizaciones preferidas tal como se exponen a continuación pueden aplicarse a todos los aspectos anteriormente mencionados de la invención.

40 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoicitosina (I), también conocida como 2'-ciano-2-desoxi-N<sup>4</sup>-palimotolil-1-β-D-arabinofuranosilcitosina (Hanaoka, K., *et al*, Int. J. Cancer, 1999:82:226-236; Donehower R, *et al*, Proc Am Soc Clin Oncol, 2000: resumen 764; Burch, PA, *et al*, Proc Am Soc Clin Oncol, 2001: resumen 364), es un profármaco antimetabolito de 2'-desoxicidina novedoso administrado por vía oral del nucleósido CNDAC, 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina.



(I)



CNDAC

45

1-(2-C-Ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoilcitosina (I) (también conocida como "CYC682" o sapacitabina) tiene un modo de acción único sobre otros metabolitos de nucleósidos tales como gemcitabina porque tiene una acción de rotura de la hebra de ADN espontánea, dando como resultado una potente actividad antitumoral en una variedad de líneas celulares, xenoinjerto y modelo de cáncer metastásico.

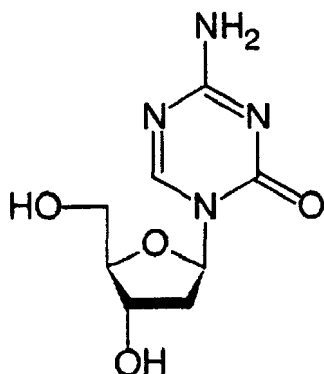
- 5 1-(2-C-Ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N<sup>4</sup>-palmitoilcitosina (I) ha sido el centro de varios estudios en vista de su biodisponibilidad oral y su actividad mejorada con respecto a gemcitabina (el análogo de nucleósido líder en el mercado) y 5-FU (un fármaco antimetabolito ampliamente usado) basándose en datos preclínicos en tumores sólidos. Recientemente, los investigadores notificaron que (I) presentaba actividad anticancerígena fuerte en un modelo de cáncer de colon. En el mismo modelo, (I) se encontró que era superior a o bien gemcitabina o bien 5-FU en cuanto al aumento de supervivencia y que prevenía también la propagación de metástasis de cáncer de colon al hígado (Wu M, *et al*, Cancer Research, 2003:63:2477-2482). Hasta la fecha, los datos de fase I de pacientes con una variedad de cánceres sugieren que (I) se tolera bien en seres humanos, con mielosupresión como toxicidad limitante de la dosis.

El inhibidor de ADN metiltransferasa se selecciona de azacitidina y decitabina.

- 15 La azacitidina (vidaza; 5-azacitidina) y decitabina (dacogen; 5-aza-2'-desoxicitidina) fueron los primeros inhibidores de ADN metiltransferasa (DNMT) que se describieron. En células, la azacitidina puede convertirse en decitabina mediante la enzima ribonucleótido reductasa. Estos análogos de pirimidina de citidina se incorporan en el ARN y ADN respectivamente, y forman complejos covalentes con DNMT, conduciendo a empobrecimiento de enzimas activas (Fenaux P, (2005) Nature Clinical Practice, 2, S36-44). La azacitidina también se incorpora en el ARN, dando lugar a ARN de transferencia y mensajero defectuoso, dando como resultado en última instancia inhibición de la síntesis de proteínas. Aparte de la inhibición de metiltransferasas, estos agentes son citotóxicos a dosis superiores, porque interfieren directamente con la síntesis de ADN.

En una realización altamente preferida, el inhibidor de ADN metiltransferasa es decitabina.

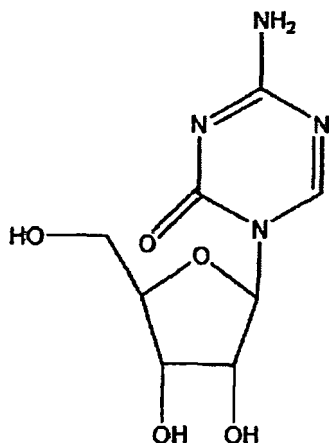
- 20 La decitabina o 5-aza-2'-desoxicitidina (nombre comercial Dacogen) es el compuesto 4-amino-1-(2-desoxi-β-D-eritropentofuranosil)-1,3,5-triazin-2(1H)-ona, cuya estructura se muestra a continuación.



- 30 La decitabina está indicada para el tratamiento de síndromes mielodisplásicos (SMD) incluyendo SMD *de novo* y secundario, tratado y no tratado previamente de todos los subtipos de la clasificación francesa-americana-británica (anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos en anillo, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación y leucemia mielomonocítica crónica) y los grupos de sistema de puntuación de pronóstico internacional intermedio-1, intermedio-2 y de alto riesgo.

- 35 Se cree que la decitabina ejerce sus efectos antineoplásicos tras fosforilación e incorporación directa en el ADN. La decitabina inhibe la ADN metiltransferasa, provocando hipometilación del ADN y diferenciación celular o apoptosis. La hipometilación inducida por decitabina en células neoplásicas puede restaurar la función normal en genes que son críticos para el control de la diferenciación y proliferación celulares. En células que se dividen rápidamente, la citotoxicidad de la decitabina puede atribuirse también a la formación de aductos covalentes entre ADN metiltransferasa y compuesto que se ha incorporado al ADN. Las células que no proliferan son relativamente insensibles a la decitabina.

- 40 En otra realización altamente preferida, el inhibidor de ADN metiltransferasa es azacitidina (nombre comercial Vidaza) que es el compuesto 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-s-triazin-2(1H)-ona, cuya estructura se muestra a continuación.



La azacitidina es un análogo de nucleósido de pirimidina antineoplásico usado para tratar varios subtipos de síndrome mielodisplásico, enfermedades provocadas por anomalías en las células que forman la sangre de la médula ósea que pueden dar como resultado producción insuficiente de células sanguíneas sanas. El fármaco ejerce un efecto citotóxico sobre células que se dividen rápidamente, incluyendo células cancerosas, y puede ayudar a restaurar la función normal en genes que controlan la diferenciación y proliferación celulares apropiadas.

La azacitidina está indicada específicamente para el tratamiento de los siguientes subtipos de síndrome mielodisplásico: anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos en anillo (si va acompañada por neutropenia o trombocitopenia o requiere transfusiones), anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación y leucemia mielomonocítica crónica.

Se cree que la azacitidina ejerce sus efectos antineoplásicos provocando hipometilación del ADN y citotoxicidad directa en células hematopoyéticas anómalas en la médula ósea. La concentración de azacitidina requerida para una inhibición máxima de la metilación del ADN *in vitro* no provoca supresión grave de la síntesis del ADN. La hipometilación puede restaurar la función en genes que son críticos para la diferenciación o proliferación. Los efectos citotóxicos de la azacitidina provocan la muerte de células que se dividen rápidamente, incluyendo células cancerosas que ya no son sensibles a los mecanismos de control del crecimiento normales. Las células que no proliferan son relativamente insensibles a la azacitidina.

El término “trastorno proliferativo” se usa en el presente documento en un amplio sentido incluyendo cualquier trastorno que requiera el control del ciclo celular, por ejemplo trastornos cardiovasculares tales como reestenosis y cardiomiopatía, trastornos autoinmunitarios tales como glomerulonefritis y artritis reumatoide, trastornos dermatológicos tales como psoriasis, trastornos antiinflamatorios, antifúngicos, antiparasitarios tales como malaria, enfisema y alopecia. En estos trastornos, los compuestos de la presente invención pueden inducir apoptosis o mantener la estasis dentro de las células deseadas según se requiera.

Preferiblemente, el trastorno proliferativo es un cáncer o leucemia, lo más preferiblemente seleccionado de cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer hepático, sarcoma, linfoma, linfoma de células T cutáneo y mieloma múltiple.

En una realización especialmente preferida, el trastorno proliferativo es un tumor maligno hematológico, por ejemplo, leucemias avanzadas o síndromes mielodisplásicos (SMD). Otros ejemplos incluyen leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica aguda (LLA) o leucemia linfocítica crónica (LLC).

En una realización particularmente preferida, el trastorno proliferativo se selecciona de cáncer de pulmón, leucemia linfoblástica y leucemia mielógena aguda.

Tal como se usa en el presente documento, la frase “preparación de un medicamento” incluye el uso de los componentes de la invención directamente como el medicamento además de su uso en cualquiera fase de la preparación de tal medicamento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “terapia de combinación” se refiere a terapia en la que la sapacitabina, o metabolito de la misma, y el inhibidor de ADN metiltransferasa se administran, si no simultáneamente, entonces secuencialmente dentro de un lapso de tiempo en el que ambos están disponibles para actuar terapéuticamente dentro del mismo lapso de tiempo.

La sapacitabina, o metabolito de la misma, y el inhibidor de ADN metiltransferasa pueden administrarse simultáneamente, en combinación, secuencialmente o por separado (como parte de un régimen de dosificación).

- Tal como se usa en el presente documento, “simultáneamente” se usa queriendo decir que los dos agentes se administran de manera simultánea, mientras que el término “en combinación” se usa queriendo decir que se administran, si no simultáneamente, entonces “secuencialmente” dentro de un lapso de tiempo en el que ambos están disponibles para actuar terapéuticamente dentro del mismo lapso de tiempo. Por tanto, la administración “secuencial” puede permitir que un agente se administre en el plazo de 5 minutos, 10 minutos o en
- 5                    cuestión de horas después del otro siempre que la semivida circulatoria del primer agente administrado sea tal que están ambos presentes de manera simultánea en cantidades terapéuticamente eficaces. El retraso temporal entre la administración de los componentes variará dependiendo de la naturaleza exacta de los componentes, la interacción entre ellos y sus semividas respectivas.
- 10                   En contraposición a “en combinación” o “secuencialmente”, “por separado” se usa en el presente documento queriendo decir que el intervalo entre la administración de un agente y la del otro es significativa, es decir, el primer agente administrado puede no estar ya presente en el torrente sanguíneo en una cantidad terapéuticamente eficaz cuando se administra el segundo agente.
- 15                   En una realización preferida de la invención, el inhibidor de ADN metiltransferasa se administra secuencialmente o por separado antes de la 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina. Preferiblemente, el inhibidor de ADN metiltransferasa se administra al menos 4 horas antes que la 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina, y más preferiblemente al menos 72 horas antes que la 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina.
- 20                   En una realización particularmente preferida, la 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina se administra secuencialmente o por separado antes que el inhibidor de ADN metiltransferasa. Preferiblemente, la 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina se administra al menos una hora antes que el inhibidor de ADN metiltransferasa, y más preferiblemente al menos 24 horas antes que el inhibidor de ADN metiltransferasa.
- 25                   En una realización preferida, el inhibidor de ADN metiltransferasa y la 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabinopentofuranosil)-N4-palmitoicitosina se administran cada uno en una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a los componentes individuales; en otras palabras, el inhibidor de ADN metiltransferasa y la 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabinopentofuranosil)-N4-palmitoicitosina se administran en cantidades que serían terapéuticamente eficaces incluso si los componentes se administrasen de una manera distinta que en combinación.
- 30                   En otra realización preferida, el inhibidor de ADN metiltransferasa y la 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabinopentofuranosil)-N4-palmitoicitosina se administran cada uno en una cantidad subterapéutica con respecto a los componentes individuales; en otras palabras, el inhibidor de ADN metiltransferasa y la 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina se administran en cantidades que serían terapéuticamente ineficaces si los componentes se administrasen de una manera distinta que en combinación.
- 35                   Preferiblemente, la 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina y el inhibidor de ADN metiltransferasa interaccionan de una manera sinérgica. Tal como se usa en el presente documento, el término “sinérgico” significa que la 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina y el inhibidor de ADN metiltransferasa producen un mayor efecto cuando se usan en combinación que el que se
- 40                   esperaría de añadir los efectos individuales de los dos componentes. Ventajosamente, una interacción sinérgica puede permitir que se administren dosis inferiores de cada componente a un paciente, disminuyendo de ese modo la toxicidad de la quimioterapia, mientras que se produce y/o mantiene el mismo efecto terapéutico. Por tanto, en una realización particularmente preferida, cada componente puede administrarse en una cantidad subterapéutica.

#### Metabolito

- 45                   Tal como se usa en el presente documento, el término “metabolito” abarca entidades químicamente modificadas que se producen mediante metabolismo de 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina.
- El metabolito de 1-(2-C-ciano-2-desoxi- $\beta$ -D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoicitosina es 2'-C'-ciano-2'-desoxi-1- $\beta$ -D-arabino-pentofuranosilcitosina (CNDAC).
- 50                   En una realización altamente preferida, el metabolito de sapacitabina es CNDAC y la ADN metiltransferasa es decitabina. Para esta realización, los componentes de la combinación pueden administrarse simultánea, secuencialmente o por separado. Preferiblemente, los componentes se administran secuencialmente o por separado (por ejemplo tratamiento previo con CNDAC o decitabina).
- 55                   En otra realización altamente preferida, el metabolito de sapacitabina es CNDAC y la ADN metiltransferasa es azacitidina. Preferiblemente, para esta realización particular, los componentes de la combinación se administran secuencialmente o por separado, prefiriéndose particularmente el tratamiento previo con azacitidina.

Sales/ésteres

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

- 5 Las sales farmacéuticamente aceptables de los agentes de la invención incluyen sales de bases o de adición de ácido adecuadas de los mismos. Puede encontrarse una revisión de sales farmacéuticas adecuadas en Berge *et al*, J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977). Se forman sales, por ejemplo, con ácidos inorgánicos fuertes tales como ácidos minerales, por ejemplo ácido sulfúrico, ácido fosfórico o hidrácidos halogenados; con ácidos carboxílicos orgánicos fuertes, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 4 átomos de carbono que no están sustituidos o están sustituidos (por ejemplo con halógeno), tales como ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetráftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o arilsulfónicos que no están sustituidos o están sustituidos (por ejemplo, con un halógeno) tal como ácido metano o p-toluenosulfónico.
- 10 Se forman ésteres usando o bien ácidos orgánicos o bien alcoholes/hidróxidos, dependiendo del grupo funcional que está esterificándose. Los ácidos orgánicos incluyen ácidos carboxílicos, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 12 átomos de carbono que no están sustituidos o están sustituidos (por ejemplo, con halógeno), tales como ácido acético; con ácido dicarboxílico saturado o insaturado, por ejemplo oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetráftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o arilsulfónicos que no están sustituidos o están sustituidos (por ejemplo, con un halógeno tal como ácido metano o p-toluenosulfónico. Los hidróxidos adecuados incluyen hidróxidos inorgánicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio.
- 15 Los alcoholes incluyen alcanoalcoholes de 1-12 átomos de carbono que pueden estar no sustituidos o sustituidos, por ejemplo con un halógeno.
- 20
- 25

Enantiómeros/tautómeros

- 30 La invención también incluye cuando sea apropiado todos los enantiómeros y tautómeros de los agentes. El experto en la técnica reconocerá compuestos que tienen propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono quirales) o características tautoméricas. Los enantiómeros y/o tautómeros correspondientes pueden aislarse/prepararse mediante métodos conocidos en la técnica.

Estereoisómeros e isómeros geométricos

- 35 Algunos de los agentes de la invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, por ejemplo pueden tener uno o más centros asimétricos y/o geométricos y de ese modo pueden existir en dos o más formas estereoisoméricas y/o geométricas. La presente invención contempla el uso de todos los estereoisómeros e isómeros geométricos individuales de esos agentes inhibidores, y mezclas de los mismos. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas, siempre que dichas formas conserven la actividad funcional apropiada (aunque no necesariamente en el mismo grado).

- 40 La presente invención también incluye todas las variaciones isotópicas adecuadas del agente o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se define como una en la que al menos un átomo se reemplaza por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la masa atómica habitualmente encontrada en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en el agente y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro tales como <sup>2</sup>H, <sup>3</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O, <sup>31</sup>P, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>18</sup>F y <sup>36</sup>Cl, respectivamente. Determinadas variaciones isotópicas del agente y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, por ejemplo, aquéllas en las que se incorpora un isótopo radiactivo tal como <sup>3</sup>H o <sup>14</sup>C, son útiles en estudios de distribución tisular de sustrato y/o fármaco. Se prefieren particularmente isótopos tritados, es decir, <sup>3</sup>H, y carbono-14, es decir, <sup>14</sup>C, por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos tales como deuterio, es decir, <sup>2</sup>H, puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, aumento de la semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos y por tanto pueden preferirse en algunas circunstancias. Pueden prepararse en general variaciones isotópicas del agente de la presente invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo de esta invención mediante procedimientos convencionales usando variaciones isotópicas apropiadas de reactivos adecuados.
- 45
- 50
- 55

### Solvatos

La presente invención también incluye formas de solvato de los agentes de la presente invención. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas.

### Polimorfos

- 5 La invención se refiere además a agentes de la presente invención en sus diversas formas cristalinas, formas polimórficas y formas (an)hidras. Está bien establecido dentro de la industria farmacéutica que pueden aislarse compuestos químicos en cualquiera de tales formas variando ligeramente el método de purificación y la forma de aislamiento o los disolventes usados en la preparación sintética de tales compuestos.

### Profármacos

- 10 La invención incluye además agentes de la presente invención en forma de profármaco. Tales profármacos son generalmente compuestos en los que uno o más grupos apropiados se han modificado de manera que la modificación puede revertirse tras la administración a un ser humano o sujeto mamífero. Tal reversión se realiza habitualmente mediante una enzima presente de manera natural en tal sujeto, aunque es posible que se administre un segundo agente junto con un profármaco de este tipo con el fin de realizar la reversión *in vivo*. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen éster (por ejemplo, cualquiera de los descritos anteriormente), en el que la reversión puede llevarse a cabo por una esterasa, etc. Los expertos en la técnica conocerán bien otros sistemas de este tipo.

### Administración

- 20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar adaptadas para vías de administración oral, rectal, vaginal, parenteral, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intratecal, intra-bronquial, subcutánea, intradérmica, intravenosa, nasal, bucal o sublingual.

Para administración oral, se hace uso particular de comprimidos preparados por compresión, píldoras, comprimidos, cápsulas duras, gotas y cápsulas. Preferiblemente, estas composiciones contienen desde 1 hasta 2000 mg y más preferiblemente desde 50-1000 mg, de principio activo por dosis.

- 25 Otras formas de administración comprenden disoluciones o emulsiones que pueden inyectarse por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía intratecal, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía intraperitoneal o por vía intramuscular, y que se preparan a partir de disoluciones estériles o esterilizables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar también en forma de supositorios, óvulos vaginales, suspensiones, emulsiones, lociones, pomadas, cremas, geles, pulverizaciones, disoluciones o polvos secantes.

- 30 Un medio alternativo de administración transdérmica es mediante el uso de un parche cutáneo. Por ejemplo, el principio activo puede incorporarse en una crema que consiste en una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida. El principio activo puede incorporarse también, a una concentración de entre el 1 y el 10% en peso, en una pomada que consiste en una base de parafina blanda blanca o cera blanca junto con estabilizadores y conservantes tales como puedan requerirse.

- 35 Las formas inyectables pueden contener entre 10 - 1000 mg, preferiblemente entre 10 - 500 mg, de principio activo por dosis.

Pueden formularse composiciones en forma farmacéutica unitaria, es decir, en forma de porciones diferenciadas que contienen una dosis unitaria, o múltiples unidades o una subunidad de una dosis unitaria.

- 40 En una realización particularmente preferida, la combinación o composición farmacéutica de la invención se administra por vía intravenosa.

### Dosificación

- 45 Un experto habitual en la técnica puede determinar fácilmente una dosis apropiada de una de las presentes composiciones para administrar a un sujeto sin demasiada experimentación. Normalmente, un médico determinará la dosificación real que será la más adecuada para un paciente individual y dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y momento de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad del estado particular y el individuo que se somete a terapia. Las dosificaciones dadas a conocer en el presente documento son a modo de ejemplo del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se necesitan intervalos de dosificación superiores o inferiores, y tales están dentro del alcance de esta invención.



Dependiendo de la necesidad, el agente puede administrarse a una dosis de desde 0,1 hasta 30 mg/kg de peso corporal, tal como desde 2 hasta 20 mg/kg, más preferiblemente desde 0,1 hasta 1 mg/kg de peso corporal.

5 A modo de orientación, se administra normalmente 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoilitosina según las instrucciones de un médico a dosificaciones entre 1 y 120 mg/m<sup>2</sup> de superficie corporal. Preferiblemente, la dosis se administra por vía oral. Las dosis pueden administrarse 5 días a la semana durante 4 semanas, o 3 días a la semana durante 4 semanas. Las dosificaciones y la frecuencia de aplicación se adaptan normalmente al estado médico general del paciente y a la gravedad de los efectos adversos provocados, en particular los provocados al sistema hematopoyético, hepático y renal. La dosis diaria  
10 total puede administrarse como una única dosis o dividirse en dosificaciones separadas administradas dos, tres o cuatro veces al día.

El inhibidor de ADN metiltransferasa se administra normalmente por vía subcutánea o por vía intravenosa según las instrucciones de un médico. A modo de orientación, la dosis de decitabina recomendada es de 15 mg/m<sup>2</sup> administrada mediante infusión intravenosa continua a lo largo de 3 h repetida cada 8 h durante 3 días  
15 (etiqueta clínica de decitabina; Fenaux P. (2005) Nature Clinical Practice, 2, S36-44). Este ciclo se repite preferiblemente cada 6 semanas. Los pacientes con tumores sólidos avanzados reciben normalmente una infusión de 72 h de decitabina a 20-30 mg/m<sup>2</sup>/día. A modo de orientación, la dosis de partida recomendada de azacitidina es de 75 mg/m<sup>2</sup> por vía subcutánea o por vía intravenosa, diariamente durante 7 días (etiqueta clínica de azacitidina; Fenaux P. (2005) Nature Clinical Practice, 2, S36-44).

20 La presente invención se describe además a modo de ejemplo, y con referencia a las siguientes figuras, en las que:

La figura 1 muestra el efecto de azacitidina en combinación con CNDAC sobre el perfil de ciclo celular y la inducción de apoptosis en células HL60 tras 72 horas. (A) Se trataron células HL60 con azacitidina 128 nM durante 24 horas seguido por azacitidina 128 nM y CNDAC 133 nM durante otras 48 horas. Se fijaron las  
25 células y se tiñó el ADN con yoduro de propidio. También se incluyeron controles de agentes únicos. (B) Se trataron células HL60 con azacitidina 128 nM durante 24 horas seguido por azacitidina 128 nM y CNDAC 133 nM durante otras 48 horas. Se tiñeron las células con anexina V que detectaba células apoptóticas y yoduro de propidio para detectar células viables. También se incluyeron controles de agentes únicos. Los datos son el promedio de dos muestras y son representativos de al menos dos experimentos independientes.

30 La figura 2 muestra el efecto de azacitidina en combinación con CNDAC sobre el perfil de ciclo celular y la inducción de apoptosis en células HL60 tras 96 horas. (A) Se trataron células HL60 con azacitidina 128 nM durante 24 horas seguido por azacitidina 128 nM y CNDAC 133 nM durante otras 72 horas. Se fijaron las células y se tiñó el ADN con yoduro de propidio. También se incluyeron controles de agentes únicos. (B) Se  
35 trataron células HL60 con azacitidina 128 nM durante 24 horas seguido por azacitidina 128 nM y CNDAC 133 nM durante otras 72 horas. Se tiñeron las células con anexina V que detectaba células apoptóticas y yoduro de propidio para detectar células viables. También se incluyeron controles de agentes únicos. Los datos son el promedio de dos muestras y son representativos de dos experimentos independientes.

La figura 3 muestra un transcurso temporal que muestra el efecto de CNDAC y azacitidina solos o en combinación sobre los acontecimientos moleculares en células HL60. Se trataron las células HL60 tal como sigue:  
40 tratadas de manera simulada con DMSO (D); tratadas con azacitidina sólo (0,5 x CI<sub>50</sub>: 128 nM) (A); tratadas con medio durante 24 horas seguido por CNDAC (1x CI<sub>50</sub>: 133 nM) (C); o azacitidina (128 nM) durante 24 h seguido por CNDAC (133 nM) (AC). Se recogieron muestras a diversos tiempos (indicados) tras la adición de CNDAC. Se lisaron las células, se fraccionaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se estudiaron con sonda para detectar PARP escindido (un marcador de apoptosis). Los datos son representativos  
45 de dos experimentos independientes.

#### Ejemplos

#### Materiales y métodos

#### Líneas celulares y reactivos

50 Se adquirieron células MV4-11, HL60 y CEM de la ECACC (Salisbury, RU) ATCC. Se cultivaron las células a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI 1640 que contenía suero de ternero fetal (FCS) al 10%. Se mantuvieron las células a una densidad de entre 0,2x10<sup>6</sup> y 1x10<sup>6</sup> células/ml.

Se preparó CNDAC según la metodología expuesta en el documento EP 535231 B (Sankyo Company Limited). Se preparó CYC682 (sapacitabina) según la metodología descrita en el documento EP 536936B (Sankyo Company Limited). Se adquirieron decacitabina y azacitidina de Sigma-Aldrich. Se prepararon disoluciones madre de todos los compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 mM. Se adquirieron todos los reactivos de Sigma (Poole, RU) a menos que se indique otra cosa.  
55

Ensayos de citotoxicidad/cultivo celular

Con el fin de completar los estudios de combinación, se determinaron los efectos citotóxicos de compuestos individuales. Para establecer la  $CI_{50}$  a las 72 horas para cada compuesto, se llevaron a cabo experimentos en placas de 96 pocillos y se sembraron las líneas celulares a una densidad de 5.000/pocillo para células MV4-11 y HL60 y 6.000/pocillo para células CCRF-CEM. En cada línea celular, se determinaron los valores de  $CI_{50}$  a las 72 h de tratamiento para cada compuesto usando el ensayo de azul de alamar.

Se preparó una serie de dilución para cada fármaco en medio. Dos horas después de la siembra, se añadió un volumen igual de cada compuesto a dos veces la concentración deseada y se incubó durante 72 horas. Se realizaron todos los tratamientos por triplicado. Al final de la incubación, se preparó una disolución madre al 20% de azul de alamar (Roche, Lewes, RU) en medio, y se añadió un volumen igual a cada pocillo y se incubó durante tres horas. Se leyó la absorbancia a 544-595 nm y se analizaron los datos (Excel Fit v4.0) para determinar la  $CI_{50}$  (concentración de compuesto que inhibía el crecimiento celular en un 50%) para cada compuesto.

Entonces se sometió a prueba CNDAC en combinación con decitabina o azacitidina usando tres regímenes de tratamiento diferentes: concomitante, tratamiento previo con CNDAC seguido por inhibidor de metiltransferasa, y tratamiento previo con inhibidor de metiltransferasa seguido por CNDAC.

Protocolo de combinación de fármacos Calcsyn

Se evaluaron tratamientos de combinación tal como sigue: se usó un ensayo de citotoxicidad tratando células con dos fármacos a un intervalo de concentraciones y se analizaron usando el modelo de mediana del efecto (Chou y Talalay, 1984). Para los ensayos de citotoxicidad, los tratamientos fueron o bien concomitante (por ejemplo análogo de nucleósido + DMTi) o bien tratamiento previo de 24 horas de análogo de nucleósido seguido por 72 horas con tratamiento concomitante de ambos agentes (análogo de nucleósido - DMTi) y viceversa (DMTi – análogo de nucleósido). No fue posible realizar tratamientos meramente secuenciales con líneas celulares en suspensión. La dosificación usada se basaba aproximadamente en la  $CI_{50}$  durante 72 horas.

Puesto que células MV4-11, HL60 y CCRF-CEM no se adhieren a placas de 96 pocillos, no era práctico aspirar el medio de los pocillos, de modo que no se eliminaron los compuestos de tratamiento previo durante los experimentos de combinación. Para el análisis de combinación, se usaron diluciones en serie de 2 veces de cada compuesto, con los intervalos de concentración de los agentes únicos elegidos de modo que abarcaban el valor de  $CI_{50}$  del compuesto. Se disolvieron CNDAC, decitabina y azacitidina en DMSO antes de añadir el compuesto al medio.

Para el tratamiento concomitante, se añadieron diluciones en serie de CNDAC, inhibidor de metiltransferasa, o ambos fármacos simultáneamente a células 24 h tras la siembra en placa, y se dejaron durante 72 h a 37°C.

En los regímenes de tratamiento previo, se añadió el primer fármaco inmediatamente después de sembrarse en placa las células, y se dejaron durante 24 h. Entonces se añadió medio nuevo que contenía el segundo fármaco, y se incubó durante 72 h. Los dos controles para cada tratamiento secuencial implicaban sustituir uno de los tratamientos con fármaco por medio. Se realizaron todos los tratamientos por triplicado.

Tras el tratamiento con fármaco, se estimó entonces el número de células en cada pocillo incubando las células durante aproximadamente 6 h en medio que contenía azul de alamar al 10% (Roche, Lewes, East Sussex, R.U.) y leyendo la absorbancia a 544-595 nm. Se analizaron las interacciones de fármacos usando el paquete de software comercial Calcsyn, que se basa en el modelo de mediana del efecto de Chou y Talalay (Chou, T.C. & Talalay, P. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22, 27-55. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors). Un índice de combinación (I.C.) de 1 indicaba una interacción de fármacos aditiva, mientras que un I.C. mayor de 1 era antagonista y una puntuación inferior a 1 era sinérgica. Las definiciones del valor de IC son las siguientes: 1,45-1,2 es moderadamente antagonista, 1,2-1,1 es ligeramente antagonista, 1,1-0,9 es aditivo, 0,9-0,85 es ligeramente sinérgico, 0,85-0,7 es moderadamente sinérgico y 0,7-0,3 es sinérgico.

Análisis del ciclo celular

Los tratamientos de células fueron los siguientes: para la evaluación de agentes únicos, se sembraron células HL60 por triplicado a  $0,3 \times 10^6$  células/ml en medio y se trataron con azacitidina 128 nM ( $0,5 \times CI_{50}$ ) o CNDAC 133 nM ( $1 \times CI_{50}$ ) o DMSO sólo durante 48 ó 72 horas antes de recogerse para la citometría de flujo. Para análisis de combinación, se trataron células con azacitidina durante 24 horas seguido por otras 48 ó 72 horas con azacitidina y CNDAC. Para los controles, se realizaron también tratamientos con agentes únicos para cada fármaco. Al final de la incubación, se recogieron las células lavando dos veces en PBS y fijación en etanol al 70% y almacenamiento a -20°C. Antes del análisis, se lavaron las células dos veces en PBS que contenía BSA al 1% seguido por tinción con yoduro de propidio (50  $\mu$ g/ml) y ribonucleasa A (50  $\mu$ g/ml) en PBS que contenía Triton X-100 al 0,1% y se determinó el perfil de ciclo celular mediante citometría de flujo.

Tinción con anexina V

Se trataron previamente células HL60 con azacitidina 128 nM (equivalente a 0,5 x Cl<sub>50</sub>) durante 24 horas seguido por tratamiento concomitante con azacitidina 128 nM y CNDAC 133 nM (equivalente a 1 x Cl<sub>50</sub>) durante 48 ó 72 horas. También se realizaron tratamientos con agentes únicos como controles. Tras la incubación, se centrifugaron las células a 500 g durante 5 min., se lavaron dos veces en PBS y una vez en tampón anexina (Hepes 10 mM pH 7,4, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y NaCl 140 mM). Se resuspendieron las células a 1 x 10<sup>6</sup>/ml y se transfirieron 100 µl a un tubo de 5 ml antes de la incubación durante 10 min. en la oscuridad a temperatura ambiente con 5 µl de tinción de anexina V-FITC (Beckton Dickinson) y 10 µl de yoduro de propidio [50 mg/ml]. Se añadió tampón anexina (1 ml) y se analizaron las células mediante citometría de flujo. Se designaron células positivas para anexina V (apoptóticas) basándose en la fluorescencia verde y se designaron células positivas para yoduro de propidio (muertas) basándose en la fluorescencia roja.

Preparación y análisis de lisados celulares mediante inmunotransferencia

Se sembraron células a 0,3 x 10<sup>6</sup> células/ml en frascos T25 y se trataron con o bien DMSO, o bien azacitidina a 128 nM (equivalente a 0,5 x Cl<sub>50</sub>) durante 24 horas seguido por tratamiento concomitante con azacitidina 128 nM y CNDAC 133 nM (equivalente a 1 x Cl<sub>50</sub>) durante otras 24, 36, 40, 48 y 72 horas.

Se recogieron las células mediante centrifugación a 500 g durante 5 min., se lavan una vez con PBS enfriado con hielo y se resuspenden en 100 µl de tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 7,0, NaCl 20 mM, DTT 1 mM, 1 x inhibidores de proteasas, pirofosfato de sodio 10 mM, NaF 10 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM). Se lisaron todas las muestras mediante sonicación (ráfagas de 2 x 3 s usando un instrumento soniprep 150 de Sanyo en el parámetro de 5 amp). Se determinó la concentración de proteína de cada lisado usando el ensayo BCA (Perbio Science, Northumberland, R.U.).

Se mezcló el lisado (30 µg) con tampón de carga de gel que contenía agente reductor y se separó en geles de poliacrilamida al 10% o al 12% usando condiciones electroforéticas desnaturizantes según las instrucciones de los fabricantes (Invitrogen, Glasgow, RU). Se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham, Chalfont St.Giles, RU) usando transferencia electroforética en húmedo. Se tiñeron las membranas con ponceau S para confirmar la carga igualitaria antes de bloquear en leche desnatada al 5% en PBS con Tween 20 al 0,1% (PBSTM) durante 1 hora. Se incubaron las membranas durante la noche a 4°C con anticuerpo primario, diluido en PBSTM. Los anticuerpos usados en este estudio fueron: PARP escindido (Becton Dickinson). Se lavaron las membranas en PBS y Tween 20 al 0,1% (PBST) y se incubaron durante 1 hora en PBSTM que contenía anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa del rábano. Se lavaron las membranas y se incubaron con disolución de ECL (Amersham) y se expusieron a una película de rayos X (Amersham).

Resultados

CNDAC y decitabina en combinación en líneas celulares hematológicas

Se sometió a prueba CNDAC en combinación con decitabina en las líneas celulares de LMA HL60 y MV4-11, y la línea celular de LLA CCRF-CEM usando tres regímenes de tratamiento diferentes. Se muestran los valores de índice de combinación para cada tratamiento con fármaco para los valores de DE50, DE75 y DE90 en la tabla 1 (el punto en la curva en el que el 50%, el 75% y el 90% de las células se han destruido). Los datos son el promedio de tres experimentos independientes.

Tabla 1

Línea celular	Efecto	Tratamiento previo con CNDAC	Tratamiento previo con decitabina	Concomitante
MV4-11 (n=3)	DE50	0,95	1,17	0,79
	DE75	0,71	0,66	0,88
	DE90	0,59	0,44	1,06
HL60 (n=3)	DE50	1,16	0,6	1,47
	DE75	0,64	0,48	1,1
	DE90	0,68	0,62	1,86
CCRF-CEM (n=3)	DE50	0,58	0,94	1,29
	DE75	0,5	0,68	0,85

	DE90	0,64	0,52	0,85
--	------	------	------	------

5 CNDAC y decitabina generaron una sinergia de moderada a fuerte en las tres líneas celulares sometidas a prueba. El tratamiento previo con CNDAC y el tratamiento previo con decitabina fueron ambos regímenes de tratamiento particularmente eficaces para esta combinación. Estos resultados apoyan la idea de combinar CNDAC con decitabina en líneas celulares hematológicas.

CNDAC y azacitidina en combinación en líneas celulares hematológicas

10 Se sometió a prueba CNDAC en combinación con azacitidina en las líneas celulares de LMA HL60 y MV4-11, y la línea celular de LLA CCRF-CEM usando tres regímenes de tratamiento diferentes. Se muestran los valores de índice de combinación para cada tratamiento con fármaco para los valores de DE50, DE75 y DE90 en la tabla 2 (el punto en la curva en el que el 50%, el 75% y el 90% de las células se han destruido). Los datos son el promedio de tres experimentos diferentes.

Tabla 2:

Línea celular	Efecto	Tratamiento previo con CNDAC	Tratamiento previo con azacitidina	Concomitante
MV4-11 (n=3)	DE50	1,23	1,09	1,13
	DE75	0,95	1,04	1,03
	DE90	0,77	1,02	0,96
HL60 (n=3)	DE50	1,33	0,91	1,24
	DE75	1,13	0,6	1,11
	DE90	1,03	0,4	0,99
CCRF-CEM (n=3)	DE50	0,75	0,76	1,02
	DE75	0,71	0,61	1,09
	DE90	0,72	0,51	1,19

15 CNDAC y azacitidina indujeron una sinergia de moderada a fuerte en las tres líneas celulares sometidas a prueba. El tratamiento previo con azacitidina generó una sinergia fuerte en células HL60 y CEM, mientras que el tratamiento previo con CNDAC produjo una sinergia moderada en células MV4-11 y CEM. Estos resultados apoyan la idea de combinar CNDAC con azacitidina en líneas celulares hematológicas.

Análisis del ciclo celular

20 Se trataron células HL-60 o MV4-11 con DMSO, CNDAC o azacitidina, tal como se indica en las figuras 1A y 2A. Las concentraciones de compuesto evaluadas fueron células HL-60 azacitidina  $0,5 \times CI_{50} = 0,13 \mu M$ ; CNDAC  $CI_{50} = 0,13 \mu M$ . Células MV4-11 CNDAC  $CI_{50} = 0,46 \mu M$ . Se analizaron los perfiles de ciclo celular tras el tratamiento en las condiciones indicadas.

25 El tratamiento con azacitidina sola provocó una acumulación de células en sub-G1, G2/M y >G2/M observada a tanto 72 como 96 horas de exposición (figuras 1A y 2A). El tratamiento con CNDAC solo provocó una acumulación de células en G2/M a las 48 horas con una pequeña inducción de células en sub-G1. La combinación de agentes mostró un pequeño aumento adicional en células en sub-G1 con pocos cambios en las otras fases del ciclo celular a las 48 horas. A las 72 horas, un aumento más drástico en sub-G1 que representa el 45% de las células en comparación con el 9% y el 7% para los tratamientos con agentes únicos de azacitidina y CNDAC respectivamente. Conjuntamente, estos datos sugieren que el tratamiento de combinación provoca un aumento dependiente del tiempo en la muerte celular mayor que con cualquier agente solo.

Análisis de anexina V

30 Para evaluar la muerte celular en más detalle, se midieron tratamientos de combinación y de agentes únicos de azacitidina y CNDAC en HL60 mediante anexina V, un marcador de apoptosis. Se expusieron las células a azacitidina (128 nM) durante un total de 96 horas. Para el tratamiento de combinación tras 24 horas, se añadió CNDAC (133 nM) durante otras 72 horas en presencia de azacitidina. El tratamiento con

agentes únicos con azacitidina provocó un pequeño aumento en la proporción de células apoptóticas a las 72 y 96 horas (figuras 1B y 2B). CNDAC solo mostró poco efecto a o bien 48 o bien 72 horas en comparación con los controles (figura 1B y 2B). La combinación de agentes mostró mayores efectos (66%) que cualquier agente solo (azacitidina: 30,5% y CNDAC: 16,5%) con la diferencia más grande entre agentes únicos y la combinación en el punto de tiempo más largo de 96 horas de tratamiento total (figura 2B).

#### Experimentos de inmunotransferencia de tipo Western

Con el fin de complementar el análisis del ciclo celular, se evaluaron células HL60 tratadas con los agentes únicos o con la combinación para determinar la inducción de PARP escindido (un marcador de apoptosis) a un intervalo de puntos de tiempo (figura 3).

- 10 Se trataron células HL-60 con DMSO, azacitidina 0,13  $\mu$ M, CNDAC 0,13  $\mu$ M o ambos agentes (AC). El programa implicaba 24 h de tratamiento previo con azacitidina o DMSO seguido por la adición de CNDAC o DMSO durante los tiempos indicados. Se recogieron las células tras 48 h-96 h de tiempo de tratamiento total. Se resolvieron los lisados resultantes (20  $\mu$ g) en geles de acrilamida Bis-Tris al 12%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se estudiaron con sonda con los anticuerpos mostrados en la figura 3. Los resultados mostraron que el tratamiento con azacitidina sola provocaba una pequeña inducción en PARP escindido a puntos de tiempo tempranos. También se observó PARP escindido en el tratamiento de combinación. A puntos de tiempo posteriores, CNDAC también inducía PARP escindido a puntos de tiempo posteriores. El tratamiento con la combinación mostró mayores efectos sobre PARP escindido que cualquier agente solo. Los resultados indican que la combinación de CNDAC y azacitidina induce apoptosis pero no modula proteínas de la familia Bcl-2.
- 15
- 20

## REIVINDICACIONES

1. Combinación que comprende un inhibidor de ADN metiltransferasa y 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoilcitosina, o un metabolito de la misma, que es 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina; en la que el inhibidor de ADN metiltransferasa se selecciona de azacitidina y decitabina.
- 5 2. Combinación según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de ADN metiltransferasa es decitabina.
3. Composición farmacéutica que comprende una combinación según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 4. Uso de una combinación según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo.
5. Combinación según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo.
- 15 6. Producto farmacéutico que comprende un inhibidor de ADN metiltransferasa y 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabinopentofuranosil)-N4-palmitoilcitosina, o un metabolito de la misma que es 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina, como una preparación combinada para uso simultáneo, secuencial o separado en terapia, seleccionándose el inhibidor de ADN metiltransferasa de azacitidina y decitabina.
7. Producto farmacéutico según la reivindicación 6, en forma de una composición farmacéutica que comprende un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 8. Producto farmacéutico según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo.
9. Uso según la reivindicación 4, en el que el trastorno proliferativo es cáncer, más preferiblemente cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer hepático, sarcoma, linfoma, linfoma de células T cutáneo o mieloma múltiple.
- 25 10. Uso según la reivindicación 4, en el que el trastorno proliferativo se selecciona de cáncer de pulmón, leucemia linfoblástica y leucemia mielógena aguda.
11. Uso de un inhibidor de ADN metiltransferasa en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, comprendiendo dicho tratamiento administrar a un sujeto simultánea, secuencialmente o por separado 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoilcitosina, o un metabolito de la misma que es 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina, y un inhibidor de ADN metiltransferasa, seleccionándose el inhibidor de ADN metiltransferasa de azacitidina y decitabina.
- 30 12. Uso de un inhibidor de ADN metiltransferasa y 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoilcitosina, o un metabolito de la misma que es 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno proliferativo, seleccionándose el inhibidor de ADN metiltransferasa de azacitidina y decitabina.
- 35 13. Uso de un inhibidor de ADN metiltransferasa en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, siendo dicho medicamento para su uso en terapia de combinación con 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoilcitosina, o un metabolito de la misma, que es 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina y seleccionándose el inhibidor de ADN metiltransferasa de azacitidina y decitabina.
- 40 14. Uso de 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentofuranosil)-N4-palmitoilcitosina, o un metabolito de la misma que es 1-(2-C-ciano-2-desoxi-β-D-arabino-pentafuranosil)-citosina, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno proliferativo, siendo dicho medicamento para su uso en terapia de combinación con un inhibidor de ADN metiltransferasa, seleccionándose el inhibidor de ADN metiltransferasa de azacitidina y decitabina.
- 45

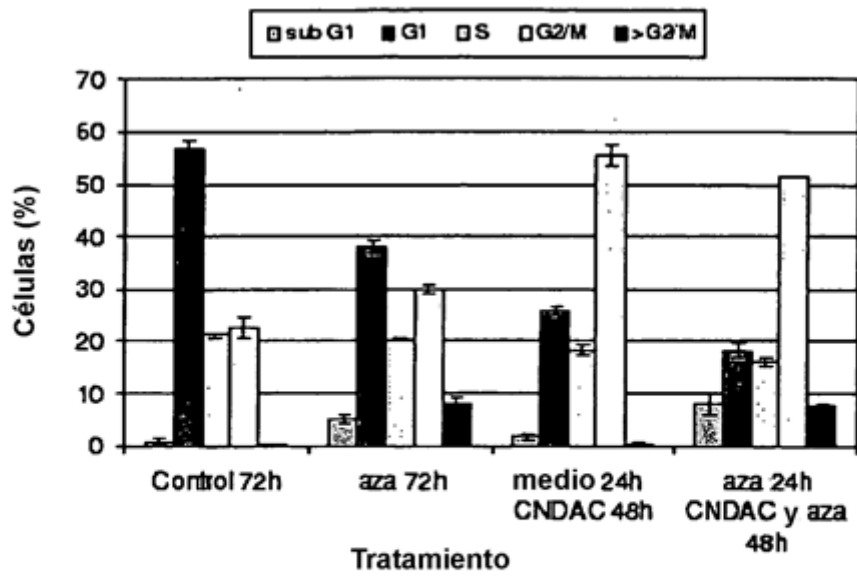


FIGURA 1A

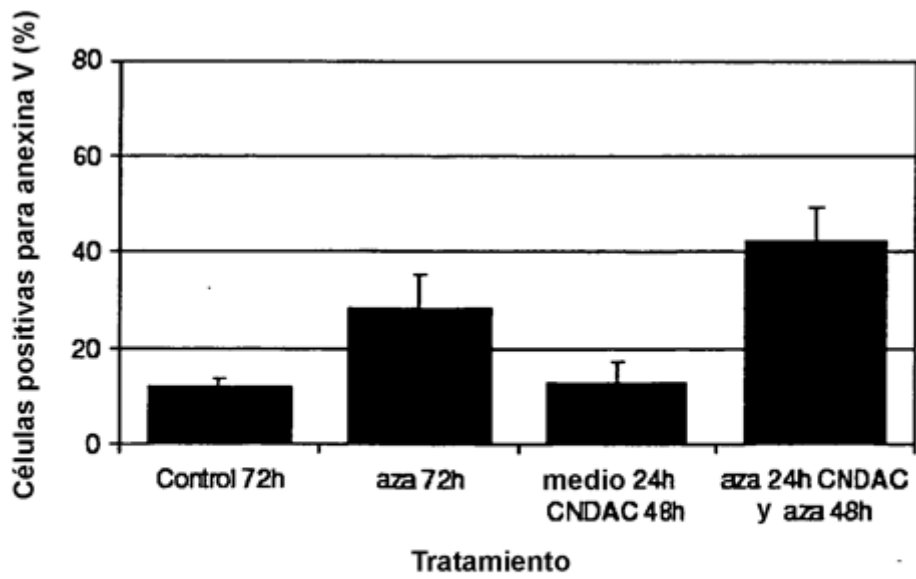


FIGURA 1B

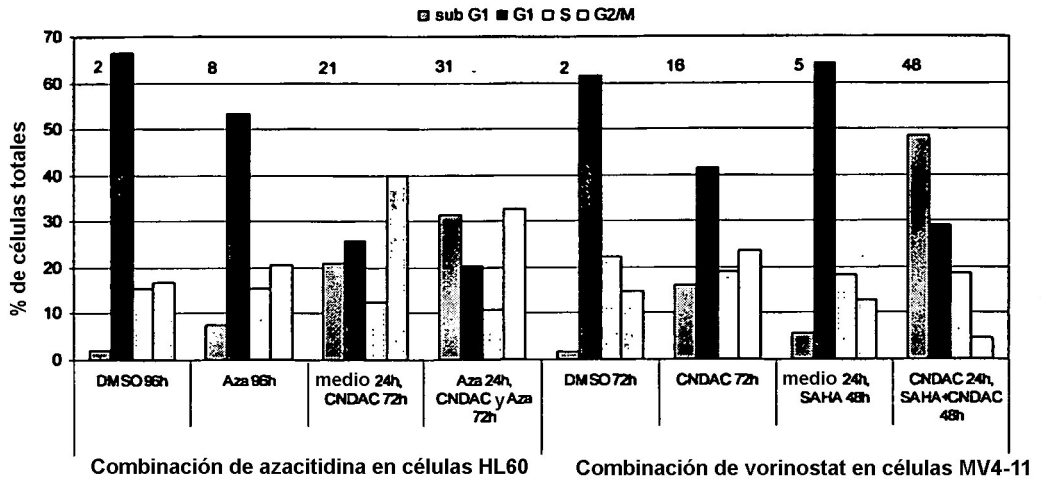


FIGURA 2A

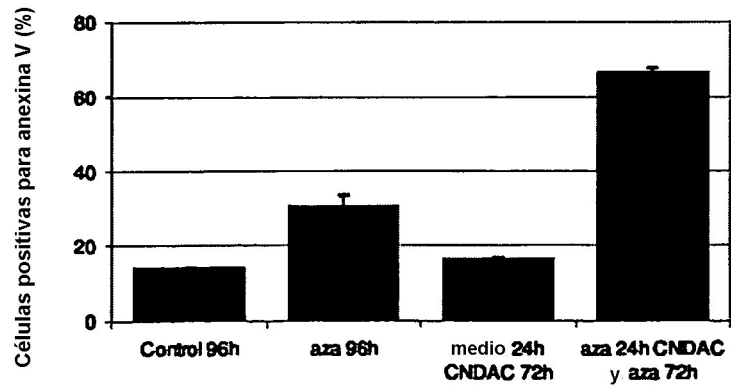


FIGURA 2B



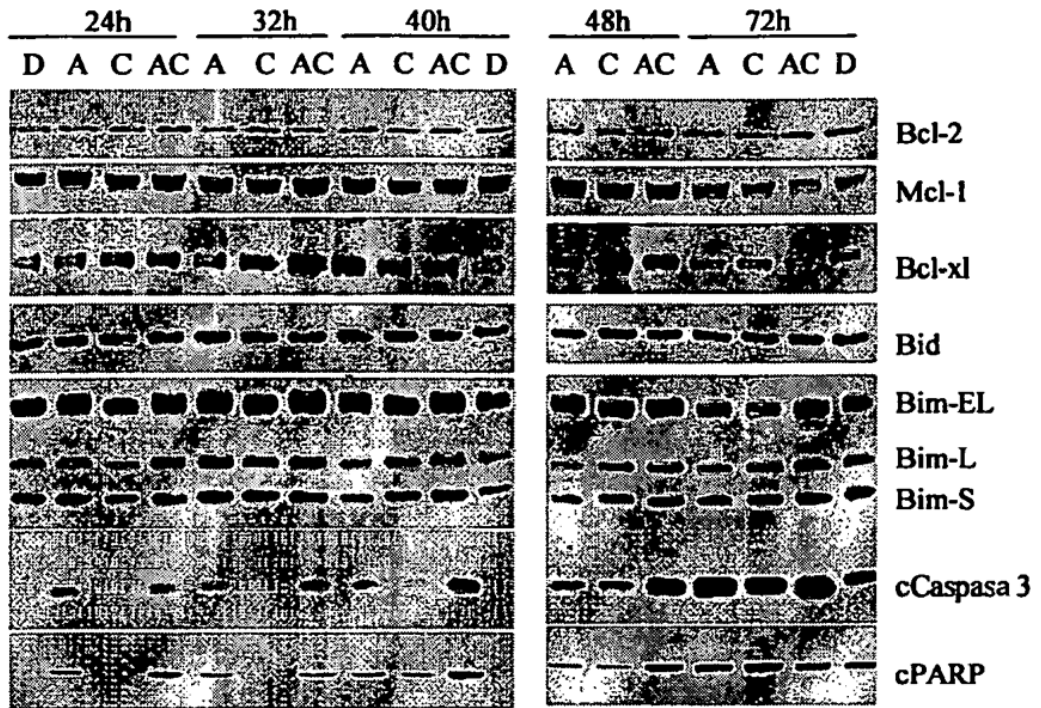


FIGURA 3