

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 232**

51 Int. Cl.:

A61K 31/337	(2006.01)	A61K 31/4745	(2006.01)
A61K 31/513	(2006.01)	A61K 31/519	(2006.01)
A61K 31/704	(2006.01)	A61K 31/7072	(2006.01)
A61K 38/03	(2006.01)	A61P 13/08	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01)		
A61K 38/16	(2006.01)		
A61K 38/20	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61K 31/282	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2007** **E 07799742 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013** **EP 2046323**

54 Título: **Composiciones para contribuir al tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

02.08.2006 US 461961

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

30.04.2013

73 Titular/es:

**SPECTRUM PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
157 TECHNOLOGY DRIVE
IRVINE, CA 92618, US y
THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF ILLINOIS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GULATI, ANIL;
REDDY, GURU y
LENAZ, LUIGI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 402 232 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para contribuir al tratamiento del cáncer.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones para contribuir al tratamiento del cáncer incluyendo los tumores sólidos por medio de la administración de un agonista de endotelina y un agente quimioterapéutico.

Antecedentes de la invención

10 El éxito del tratamiento del cáncer, incluyendo tumores sólidos, sigue siendo un objetivo médico insatisfecho, a pesar de la mejor comprensión de la biología molecular de las células tumorales y la disponibilidad de un mayor número de agentes terapéuticos potenciales. Por ejemplo, la incidencia del cáncer de mama ha aumentado sustancialmente en los últimos 10 años, y es la causa principal de muerte en mujeres entre 40-49 años en Estados Unidos.

15 Uno de los problemas en el tratamiento del cáncer es que una dosis eficaz de una amplia variedad de posibles agentes quimioterapéuticos está restringida por el efecto altamente tóxico no selectivo de estos agentes sobre los tejidos normales. Como resultado, muchos pacientes sufren por los efectos secundarios de la quimioterapia sin cosechar los beneficios del tratamiento. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico paclitaxel inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis de las células tumorales. La utilidad clínica de paclitaxel se ha visto obstaculizada, sin embargo, por las toxicidades limitantes de la dosis que incluyen la hipersensibilidad, neutropenia y neuropatía periférica. Así pues, existe una necesidad de desarrollar terapias contra el cáncer más específicas y menos tóxicas.

20 La administración dirigida de fármacos quimioterapéuticos a tumores podría tener la ventaja de mejorar la prestación de los agentes quimioterapéuticos y reducir al mínimo sus efectos sistémicos tóxicos. Dicha administración dirigida podría también servir para reducir la dosis requerida de agentes quimioterapéuticos disminuyendo con ello los efectos adversos e inaceptables de estos agentes. Una forma posible para lograr la administración dirigida selectiva de agentes quimioterapéuticos es utilizar las características diferenciales de la vasculatura tumoral.

25 Los tumores de más de unos pocos milímetros de tamaño requieren un suministro constante de nutrientes y, por lo tanto, desarrollan su propio sistema vascular y flujo sanguíneo. Folkman, *Cancer Res*, 46:467 (1986). Sin el alimento constante de estos vasos sanguíneos en desarrollo, los tumores se vuelven hipóxicos y mueren posteriormente. La formación de nueva vasculatura a partir de los vasos sanguíneos existentes se denomina "angiogénesis".

30 Durante la angiogénesis, los vasos sanguíneos tumorales sustancialmente se desarrollan de manera diferente de la vasculatura normal, y tienen propiedades diferentes. Células epiteliales en una capa única son los primeros vasos sanguíneos tumorales que se forman rápidamente. Estos vasos sanguíneos tumorales recién formados no tienen una capa de músculo liso o inervación. Los tumores también incorporan vasos sanguíneos maduros que poseen todas sus funciones de auto regulación. Mattsson et al., *Tumor Blood Circulation*, CRC Press, Boca Ratón, página 129 (1979); Reinhold, *Tumor Blood Circulation*, CRC Press, Boca Ratón, página 115 (1979), Warren, *Tumor Blood Circulation*, CRC Press, Boca Ratón, página 26 (1979).

35 El tono vascular (el grado en que los vasos sanguíneos se dilatan o contraen) se rige por una serie de factores endógenos incluyendo el H^+ , K^+ , Ca^{2+} , pO_2 , pCO_2 y óxido nítrico (NO), así como otras sustancias reguladoras tales como la endotelina (ET-1). Secombe et al., *Landes, Austin*, página 40 (1994), Luscher et al., *The endothelium: modulator of cardiovascular function*, CRC Press, Boca Ratón, página 61 (1990). ET-1 contribuye a la regulación del tono vascular significativamente (Yanagisawa et al., *Nature*, 332:411 (1988)) y los investigadores han mostrado un aumento en la expresión de los receptores ET₁ y ET_B en tumores sólidos que incluyen los carcinoma de mama. Alanen et al., *Histopathology*, 36:161 (2000), Nelson et al., *Cancer Res*, 56:663 (1996), Kar et al., *Biochem Biophys Res Commun* 216:514 (1995); Pagotto et al., *J Clin Invest*, 96:2017 (1995), Yamashita et al., *Cancer Res*, 52:4046 (1992). Yamashita et al., *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 74:363 (1991). Además, la estimulación de los receptores ET_B causa un incremento en el suministro de sangre a los tumores a través de la vasodilatación de los vasos sanguíneos del tumor. La presente invención se aprovecha de este hecho usando agonistas del receptor ET_B para incrementar selectivamente el flujo de sangre a los tumores a fin de mejorar la administración dirigida de los agentes quimioterapéuticos.

50 El documento de patente internacional WO 2004/037235 (La Junta de Gobierno de la Universidad de Illinois) describe composiciones y métodos para la prevención o el tratamiento de un cáncer de mama. La composición y el método pueden utilizar un agonista de la endotelina B y un agente quimioterapéutico como ingredientes activos para tratar un tumor sólido en mamíferos, incluyendo los seres humanos. Alternativamente, la composición y el método pueden utilizar un antagonista de la endotelina B y un inhibidor opcional de la angiogénesis para el tratamiento de un tumor sólido en mamíferos, incluyendo los seres humanos.

Breast Cancer Research and Treatment, Nijhoff, Boston, Vol. 94, N° 3, 1 de diciembre de 2005 (01/12/2005), páginas 237-247), describe IRL 1620 como un vasodilatador selectivo del tumor para mejorar la administración y eficacia del paclitaxel.

5 Los Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Nueva York, NY, volumen 96, 1 de enero de 1900 (01/01/1900), página 1349, revela IRL1620 como un vasodilatador selectivo del tumor para mejorar la administración y eficacia del paclitaxel en los tumores de mama y melanoma.

Current Genitourinary Cancer Surgery, XVI-II+699P. Lea y Febiger: Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos, Londres, Inglaterra, Reino Unido. Ilus. 1990, páginas 507-518, describe composiciones para el tratamiento de cáncer de próstata, que incluyen doxorubicina y 5-fluorouracilo.

10 El documento de patente internacional WO 2006/091767 de Spectrum Pharmaceuticals, Inc. da a conocer que los tumores sólidos, por ejemplo, tumores de mama y de próstata, se pueden tratar mediante la administración de un agonista tal como IRL 1620 y un agente quimioterapéutico tal como la doxorubicina, paclitaxel y 5-fluorouracilo.

Drugs News and Perspectives, Vol. 8, N° 6, 1 Agosto 1995, páginas 365-391, describe los efectos vasculares de las endotelinas.

15 **Compendio de la invención**

La presente invención se dirige a las composiciones como se definen en la reivindicación 1 anexadas.

La invención además se refiere a la combinación de agentes para usar en el tratamiento del tumor de próstata como se define en la reivindicación 6 anexada.

Los cánceres que son tratados con las composiciones según la presente invención son los tumores de próstata.

20 **Breve descripción de los dibujos**

Las figuras 1A y 1B muestran los efectos de las diferentes dosis de IRL1620 sobre la perfusión del tumor de próstata según se mide por flujometría de láser Doppler (14A) y el porcentaje de cambio en la perfusión del tumor de próstata desde la línea de base que sigue a la administración de IRL 1620 (14B);

25 La figura 2 muestra el efecto de IRL 1620 sobre la concentración de [¹⁴C]-doxorubicina (DOX) en el tumor y otros órganos principales de ratas con tumor de próstata;

La figura 3 muestra el peso corporal (3A); el volumen del tumor (3B); y el peso del tumor (3C) de ratas con tumor de próstata después de la administración de IRL 1620 y DOX;

La figura 4 muestra el peso corporal (4A); el volumen del tumor (4B); y el peso del tumor (4C) de ratas con tumor de próstata después de la administración de IRL 1620 y de 5-fluorouracilo (5-FU);

30 **Descripción detallada**

1. Definiciones

35 Información de la instrucción: como se usa en esta solicitud, el término "información de la instrucción" significará el material que acompaña un producto farmacéutico que proporciona una descripción de cómo administrar el producto, junto con los datos de seguridad y los datos de eficacia requeridos para permitir al médico, farmacéutico y paciente tomar una decisión informada con relación al uso del producto. Esta información de la instrucción generalmente se designa como el "prospecto" para un producto farmacéutico. La información de la instrucción puede venir de muchas formas incluyendo, sin limitación, un papel insertado, un cd rom o direcciones a un sitio web que contiene la información relacionada con el producto farmacéutico.

40 Profármaco: como se usa en esta solicitud, el término "profármaco" se entenderá como compuestos que se transforman rápidamente *in vivo* a un compuesto útil de la invención, por ejemplo, por hidrólisis. Una discusión detallada de profármacos se proporciona en Higuchi et al., Prodrugs as Novel Delivery Systems, volumen 14, de la A.C.S.D. Symposium Series, y en Roche (editores), Bioreversible Carriers in Drugs Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

45 Tratar, tratamiento o contribución al tratamiento de: tal como se usa en esta solicitud, los términos "tratar", "tratamiento" y "contribuir al tratamiento de" se entenderán como prevenir, retardar la progresión o crecimiento de, contraer o eliminar un cáncer, incluyendo un tumor sólido. Como tal estos términos incluyen ambas cosas tratamiento médico terapéutico y/o administración profiláctica, según corresponda.

Sustancialmente simultáneamente: tal como se usa en esta solicitud, el término "sustancialmente simultáneamente" se entenderá como que dos preparaciones farmacéuticas (es decir, un agonista de ET_B y un agente quimioterapéutico) se administran al mismo tiempo. Según esta definición, "mismo tiempo" debería leerse como que incluye, exactamente simultáneamente así como dentro de aproximadamente diez minutos.

- 5 La mayoría de los agentes quimioterapéuticos tienen propiedades citotóxicas que están dirigidas a destruir las células cancerosas, pero en el proceso infligen un daño significativo a los sistemas normales fisiológicos del cuerpo. Sería una gran ventaja, por lo tanto, administrar selectivamente agentes quimioterapéuticos a tumores sólidos ayudando así a evitar estos efectos negativos del tratamiento del cáncer.

10 La angiarquitectura de los vasos sanguíneos del tumor es diferente de la de los vasos normales sanguíneos. Carmeliet y Jain, *Nature*, 407:249 (2000). Por tanto, la reactividad vascular de los tumores difiere de la del tejido normal. Por ejemplo, la administración de donantes de óxido nítrico, agonistas de nicotinamida y bradiquinina modula el flujo de sangre a los tumores. Jordan et al., *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 48: 565 (2000); Fukumura et al., *Am J Pathol*, 150:713 (1997); Hirst et al., *Br J Radiol*, 67: 795 (1994).

15 La endotelina es una sustancia vasoactiva que modula el flujo sanguíneo y que está presente en grandes concentraciones en tejidos de carcinoma de mama en comparación con el tejido normal de mama (específicamente, la endotelina puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 12 pg/mg en tejidos de carcinoma de mama en comparación con aproximadamente 0,12 pg/mg en el tejido mamario normal). Kojima et al., *Surg Oncol*, 4 (6):309 (1995); Kurbel et al., *Med Hypotheses*, 52(4):329 (1999), Patel et al., *Mol Cell Endocrinol*, 126(2):143 (1997); Yamashita et al., *Cancer Res*, 52(14):4046 (1992); Yamashita et al., *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 74(3):363 (1991). Las endotelinas son una familia de péptidos cíclicos con 21 aminoácidos, que comprende tres isoformas en mamíferos, ET-1, ET-2 y ET-3. Inoue et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2863 (1989); Yanagisawa et al., *Nature*, 332:411 (1988). Las endotelinas ejercen sus efectos mediante la unión a dos receptores de la superficie celular diferentes, ET_A y ET_B. El receptor ET_B se une a los tres isotipos del péptido con la misma afinidad. Por el contrario, el receptor ET_A se une a ET-1 con mayor afinidad que las otras isoformas. Ambos receptores pertenecen al sistema de receptores acoplados a la proteína G y median las respuestas biológicas de una variedad de estímulos, que incluyen factores de crecimiento, polipéptidos vasoactivos, neurotransmisores y hormonas. Masaki, *J Cardiovasc Pharmacol*, 35:S3 (2000); Gulati, Preface. *Adv Drug Deliv Rev*, 40:129 (2000); Gulati et al., *Am J Physiol*, 273:H827 (1997); Levin, *N Engl J Med*, 333:356 (1995). Los receptores ET_B, un sujeto de la presente invención, están presentes tanto en las células endoteliales (ECs) como en las células musculares lisas vasculares (VSMCs) y están aumentados en el tejido de cáncer de mama (incluyendo, el tejido invasivo así como el tejido ductal y lobular del carcinoma de mama en los seres humanos) en comparación con el tejido mamario normal. Wulfing et al., *Oncol Rep*, 11:791 (2004); Wulfing et al., *Clin Cancer Res*, 9:4125 (2003); Alanen et al., *Histopathology*, 36(2):161 (2000). La endotelina actúa sobre los receptores ET_B para producir dilatación vascular y aumentar el flujo sanguíneo al tejido del tumor de mama. Los receptores ET_B que predominan en ECs, producen vasodilatación mediante la liberación de factores tales como la prostaciclina y el óxido nítrico. De Nucci et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:9797 (1988). Debido a que ET-1 produce un aumento en el flujo de sangre a los tumores mediante la estimulación de los receptores ET_B, un agonista del receptor ET_B puede utilizarse para incrementar selectivamente el suministro de sangre a los tumores, aumentando así la administración dirigida y la eficacia resultante de los agentes quimioterapéuticos.

40 Receptores ET_B se han evidenciado en, por ejemplo y sin limitación, cánceres de ovario, miofibroblastos, tumores del sarcoma de Kaposi y vasos intratumorales, cánceres de mama y melanomas. Bagnato et al., *Am J Pathol*, 158:841 (2001); Alanen et al., *Histopathology*, 36(2):161 (2000); Bagnato et al., *Cancer Res*, 59:720 (1999), Kikuchi et al., *Biochem Biophys Res Comm*, 219:734 (1996). Por lo tanto, la administración de un agonista del receptor ET_B en combinación con un agente quimioterapéutico se puede utilizar para contribuir al tratamiento de tumores sólidos, incluyendo, sin limitación, el cáncer de ovario, carcinoma de colon, sarcoma de Kaposi, cáncer de mama y melanoma.

El agonista de ET_B utilizado en la presente invención es IRL 1620.

50 IRL 1620 es un análogo de ET-lineal cuya estructura se basa en el extremo carboxi terminal de ET-1 y es 120.000 veces más selectivo para los receptores ET_B. Okada y Nishikibe, *Cardiovasc Drugs Rev*, 20:53 (2002), Douglas et al., *Br J Pharmacol*, 114:1529 (1995). IRL1620 es un agonista altamente potente y selectivo de ET_B, con evidencia reportada de su selectividad por el subtipo de receptor ET_{B1} con preferencia sobre el subtipo ET_{B2}. Brooks et al., *J Cardiovasc Pharmacol*, 26 Suplemento 3:S322 (1995).

55 En una realización de la presente invención, el agonista de endotelina se utiliza en conjunción con el agente quimioterapéutico para contribuir al tratamiento de un tumor sólido. En este método, el agonista de endotelina, notablemente un agonista de ET_B en particular, aumenta el flujo sanguíneo hacia el tumor, que es rico en receptores ET_B. El agonista de ET_B, por tanto, proporciona un blanco más selectivo para el agente quimioterapéutico y mejora el efecto del agente quimioterapéutico.

Se ha teorizado, pero no se confía en este documento, que los agonistas de endotelina estimulan los receptores ET_B para dilatar los vasos sanguíneos del tumor, de esta forma aumentando el flujo de sangre y la conducción resultante de agentes quimioterapéuticos al tumor. El aumento de la perfusión sanguínea de los tumores causados por los agonistas de endotelina también aumenta la oxigenación del tejido. La oxigenación mejorada puede potenciar la acción de los agentes quimioterapéuticos. La endotelina también puede tener propiedades mitogénicas. Las acciones mitogénicas de la endotelina pueden ayudar a aumentar la acción de los agentes quimioterapéuticos, cuando se administran juntos. La acción mitogénica de un agonista de endotelina puede aumentar la acción de los agentes quimioterapéuticos, mejorando su incorporación en las células en división, aumentando así su eficacia.

La quimioterapia está indicada frecuentemente como un adyuvante a la cirugía en el tratamiento de un cáncer. El objetivo de la quimioterapia en el tratamiento adyuvante es reducir el riesgo de recurrencia y mejorar la supervivencia libre de enfermedad cuando el tumor primario ha sido controlado. La quimioterapia es utilizada como un tratamiento adyuvante del cáncer, con frecuencia cuando la enfermedad es metastásica. Un agonista de ET_B, por lo tanto, es especialmente útil antes o después de la cirugía en el tratamiento de un tumor sólido en combinación con quimioterapia.

EJEMPLO

Modelo de tumor de próstata

Efecto de IRL 1620 en la perfusión del tumor de próstata, biodistribución y eficacia de la doxorrubicina y el 5-fluorouracilo.

Después de demostrar que IRL 1620 puede mejorar la eficacia de paclitaxel en un modelo de tumor de mama, se examinó también su efecto en un modelo de tumor de próstata. Específicamente, se examinó si RL 1620 podría potenciar los efectos anticancerígenos de la doxorrubicina (DOX) y 5-fluorouracilo (5-FU) en un modelo de tumor de cáncer de próstata.

Ratas Copenhague de cinco semanas de edad portadoras de un tumor de próstata (Harlan, Indianapolis, IN) que pesaban de 100-120 gramos fueron elegidas para su uso en los estudios del modelo de tumor de próstata descritos. Las instalaciones animales se mantuvieron a una temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$) y en un patrón de luz/oscuridad de 12 horas con iluminación artificial (L0600-1800 h). Se alojaron tres ratas en una jaula y se les dio comida y agua *ad libitum*. Se permitió a las ratas aclimatarse al ambiente durante al menos una semana antes del examen veterinario y el inicio de la experimentación. Todos los procedimientos y cuidado de los animales estaban de acuerdo con las directrices establecidas por el Comité de Cuidado de Animales de la Universidad de Illinois en Chicago. Las instalaciones animales se mantuvieron de acuerdo con las regulaciones federales y están acreditadas por la Asociación Americana para la Acreditación de Cuidado de Animales de Laboratorio.

Se obtuvo IRL 1620 de American Peptide (Sunnyvale, CA). El clorhidrato de [¹⁴C]doxorrubicina ([¹⁴C]adriamicina) se adquirió en GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido). La ketamina y xilazina fueron adquiridas de Phoenix Scientific, Inc. (St. Joseph, MO). El solubilizante de tejido (TS-2) se obtuvo de RPI Corp. (Chicago, IL).

Se indujeron tumores de próstata en ratas macho de Copenhague con células JHU-4 (MAT-LyLu) obtenidas de ATCC (Manassas, VA). Véase Gaddipati et al., J Exp Ther Oncol, 4(3): 203-12 (2004) lo que se incorpora aquí como referencia. Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (10%) en una incubadora humidificada que contenía 5% de CO₂ a 37° C. Se afeitó el pelo del lado dorsal del cuello, y los animales se inocularon con 10.000 JHU-4 (MAT-LyLu) células en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato por inyección subcutánea (sc). La aparición y ubicación de los tumores se monitorizó mediante palpación manual y los diámetros de los tumores se midieron con un calibrador digital. Los procedimientos experimentales comenzaron una vez que el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 200 mm³.

Estudio de perfusión. Se anestesiaron las ratas usando ketamina (100 mg/kg) y xilazina (2 mg/kg) como una inyección combinada intraperitoneal (ip). Se afeitó el pelo alrededor de la zona del tumor y los animales se colocaron en una almohadilla de calefacción (37° C) para minimizar las variaciones de temperatura. Se separó la piel que rodeaba el tejido tumoral a aproximadamente 3 mm de ancho y aproximadamente 3 mm de largo para exponer el tumor. Se aplicó a la superficie del tumor expuesto una sonda de fibra óptica modelo estándar conectada a un flujómetro Periflux Láser Doppler PF2b 4000 (sonda de flujo MP3, Moors Instruments, Devon, Inglaterra). La constante de tiempo se fijó a 1,5 segundos y el ancho de banda a 4 kHz. Este método mide un desplazamiento Doppler en la luz láser (flujo), que está determinado por el número y la velocidad de los eritrocitos, y es proporcional al flujo sanguíneo total dentro de un volumen de tejido dado. Los valores de flujo se calcularon utilizando Polyview software. Se obtuvo una línea de base de 15 minutos de grabación estable antes de la administración de solución salina o de IRL 1620. Se administró a los animales IRL 1620 (1, 3, o 6 nmoles/kg) en un volumen final de 0,2 ml a través de la vena de la cola y se registró la perfusión durante 3 horas.

Como se puede ver en las figuras 1A y 1B, la administración de solución salina o de 1 nmol/kg de IRL1620 no produjo ningún cambio significativo en la perfusión de sangre del tumor en ratas que portaban tumores. La administración de 3 nmoles/kg o 6 nmoles/kg produjo un aumento máximo en la perfusión de sangre del tumor de 102,8% y 79,12% respectivamente desde la línea de base. Este aumento en la perfusión fue significativo a los 15, 30, y 60 minutos si se compara con el valor basal y el de las ratas tratadas con solución salina ($p < 0,005$). Así, dosis apropiadas de IRL 1620 aumentan transitoriamente la perfusión de sangre del tumor en un modelo animal de cáncer de próstata.

Estudio de biodistribución. Ratas portadoras de tumores se agruparon aleatoriamente ($n = 6$ /grupo) para recibir solución salina o IRL1620 (1, 3 o 6 nmoles/kg) a través de la vena de la cola en un volumen final de 0,2 ml. Las ratas de cada grupo recibieron entonces [14 C]doxorubicina (1 μ Ci / rata) por vía intravenosa en un volumen final de 1,0 ml 15 minutos después de la administración de solución salina o IRL 1620. Los animales se sacrificaron 3 horas después de la administración de [14 C]doxorubicina. Se examinó la concentración de [14 C]doxorubicina en el tumor, corazón, cerebro, riñones, hígado, pulmones, médula ósea, próstata, músculos esqueléticos y bazo. Específicamente, el tumor y los órganos se cortaron en trozos pequeños. Se separaron los fémures de ambas piernas y se pesaron con la médula ósea eliminada utilizando una jeringa que contenía un solubilizador de tejido. Aproximadamente 500 mg de tejido o tumor se colocaron en viales separados que contenían solubilizador de tejido (6 ml) y se incubaron en un baño de agua a 50° C. Los viales se retiraron del baño de agua después de que se disolviera el tejido o tumor y se añadió 1,2 ml de ácido acético glacial al 10%. Los contenidos del vial se dividieron entonces igualmente en 3 viales y se añadió 15 ml de cóctel de centelleo líquido, (Safety Solve, RPI Corp, Chicago, IL), a cada vial y se mantuvieron durante la noche en reposo para alcanzar el equilibrio. La radiactividad en los tubos se contó usando un contador de centelleo líquido (Beckman Coulter LS 6500).

Como puede verse en la figura 2, la administración de 1 nmol/kg de IRL 1620 no produjo ningún cambio significativo en la captación de [14 C]doxorubicina en el tejido tumoral o en los otros tejidos. Las concentraciones de [14 C]doxorubicina en el tumor, sin embargo, aumentaron significativamente en aquellas ratas que recibieron 3 nmoles/kg de IRL 1620 (115,85% de aumento, $p < 0,01$) o 6 nmoles/kg de IRL 1620 (80,02% de aumento, $p < 0,05$) cuando se comparó con las ratas tratadas con solución salina. Ninguna dosis de IRL 1620 produjo un aumento significativo en la acumulación de [14 C]doxorubicina en el corazón, cerebro, riñones, hígado, pulmones, médula ósea, bazo, próstata o en los músculos esqueléticos cuando se compararon con los animales de control. De manera que IRL1620 puede selectivamente aumentar la administración de agentes quimioterapéuticos al tejido tumoral.

Estudios de eficacia: efecto de IRL 1620 en la eficacia de la doxorubicina (DOX)

En este estudio, se obtuvo IRL 1620 (N-succinil-[Glu9,Ala11,15] fragmento de endotelina 8-21) de American Peptides (Sunnyvale, CA). El clorhidrato de doxorubicina (adriamicina, solución de 2 mg/ml) se obtuvo de Ben Venue Laboratories Inc. (Bedford, OH). 5-Fluorouracilo (50 mg/ml) se obtuvo de Cadlia Pharmaceuticals (Ahmedabad, India). La ketamina y xilazina se obtuvieron de Phoenix Scientific, Inc. (St. Joseph, MO).

Se indujeron tumores de próstata en ratas macho de Copenhague de cinco semanas de edad (Harlan, Indianapolis, IN) como se describió anteriormente. Los procedimientos experimentales comenzaron una vez que el tamaño del tumor fue aproximadamente de 200 mm³. Los animales portadores del tumor se dividieron al azar en seis grupos (8 ratas/grupo):

Grupo I – Solución salina;

Grupo II - IRL 1620 (3 nmoles/kg);

Grupo III - Vehículo (solución salina) + DOX (2,5 mg/kg);

Grupo IV - Vehículo (solución salina) + DOX (5 mg/kg);

Grupo V - IRL 1620 (3 nmoles/kg) + DOX (2,5 mg/kg); y

Grupo VI - IRL 1620 (3 nmoles/kg) + DOX (5 mg/kg).

DOX se diluyó en solución salina en un volumen final de 1:0 ml y se inyectó en la vena de la cola 15 minutos después de la administración de solución salina o IRL 1620. El régimen de dosificación fue una vez cada tres días para un total de cuatro dosis. Se verificaron el peso corporal y el tamaño del tumor cada tercer día hasta 12 días después de la dosis final. Los animales se sacrificaron 12 días después de la última (cuarta) dosis. Los tumores se separaron y se pesaron, y los tejidos se observaron en cuanto a metástasis a groso modo. Los tejidos y tumores se conservaron en formalina tamponada al 10% para el análisis histopatológico.

Peso corporal. Hubo un aumento en el peso corporal en los grupos de ratas tratadas solamente con solución salina o IRL 1620. El peso corporal de los animales tratados solo con solución salina o solo con IRL 1620 al comienzo del experimento, fue de 152 \pm 6,97 y 148,8 \pm 2,52 g respectivamente que aumentó a 178,8 \pm 4,7 y 175,72 \pm 2,35 g,

respectivamente, en el día 19 del estudio. Las ratas que recibieron solución salina y DOX, o IRL 1620 y DOX mostraron una disminución en el peso corporal. La disminución máxima en el peso corporal fue $-8,46 \pm 3,88$ y $-10,03 \pm 2,12$ en el grupo de ratas tratadas con solución salina + DOX (5 mg/kg) y IRL 1620 + DOX (5 mg/kg), respectivamente, en el día 13. Sin embargo, la disminución en el peso corporal no fue estadísticamente significativa en ningún tiempo entre ninguno de los grupos administrados con DOX desde el comienzo del tratamiento (figura 3A).

Volumen del tumor. El volumen del tumor de las ratas tratadas con solución salina o IRL 1620 aumentó a un ritmo rápido y todas las ratas en estos grupos fueron sacrificadas en el día 19 debido a la gran carga tumoral. Todos los demás grupos fueron sacrificados en el día 22. Las ratas tratadas con solución salina o IRL 1620 mostraron un volumen tumoral de 10166 ± 957 and 11033 ± 873 mm³, respectivamente, en el sacrificio. El volumen tumoral de las ratas tratadas con solución salina + DOX (2,5 mg/kg) y solución salina + DOX (5 mg/kg) fue 9102 ± 1442 y 4204 ± 299 mm³, respectivamente. Las ratas tratadas con IRL 1620 + DOX (2,5 mg/kg) tuvieron un volumen tumoral de 5544 ± 845 mm³. El menor volumen tumoral (1965 ± 332 mm³) se observó en el grupo de ratas tratadas con IRL 1620 + DOX (5 mg/kg). La disminución en el volumen tumoral en ratas tratadas con IRL 1620 + DOX (5 mg/kg) fue significativa en los días 10, 13, 16, 19 y 22 en comparación con las ratas tratadas con solución salina + DOX (5 mg/kg) (figura 3B).

Peso del tumor. Las ratas tratadas con solución salina, IRL 1620, y solución salina + DOX (2,5 mg/kg), mostraron un peso del tumor comparable en el sacrificio ($19,14 \pm 1,8$, $20,77 \pm 1,64$ y $17,14 \pm 2,42$, g, respectivamente). El peso del tumor de las ratas tratadas con solución salina + DOX (5 mg/kg); IRL 1620 + DOX (2,5 mg/kg) y IRL 1620 + DOX (5 mg/kg) se redujo a $7,19 \pm 0,56$, $10,44 \pm 1,42$ y $3,31 \pm 1,64$ g, respectivamente, en el sacrificio en el día 22. Hubo una diferencia significativa en el peso del tumor entre las ratas tratadas con solución salina + DOX (5 mg/kg) e IRL 1620 + DOX (5 mg/kg) ($p < 0,005$). Estos estudios demuestran que IRL 1620 aumentó significativamente la eficacia anticancerosa de DOX (figura 3C).

Estudios de eficacia: Efecto de IRL 1620 en la eficacia del 5-fluorouracilo (5-FU)

En un estudio de seguimiento, se siguieron los mismos procedimientos excepto que las ratas portadoras de tumores se agruparon aleatoriamente en los siguientes seis grupos (6 ratas/grupo) a fin de examinar el efecto de IRL 1620 en la eficacia de 5-FU:

Grupo I – Solución salina;

Grupo II - IRL 1620 (3 nmoles/kg);

Grupo III - Vehículo (solución salina) + 5-FU (25 mg/kg);

Grupo IV - Vehículo (solución salina) + 5-FU (50 mg/kg);

Grupo V - IRL 1620 (3 nmoles/kg) + 5-FU (25 mg/kg); y

Grupo VI – IRL 1620 (3 nmoles/kg) + 5-FU (50 mg/kg).

5-FU se diluyó en solución salina en un volumen final de 1,0 ml y se inyectó en la vena de la cola 15 minutos después de la administración de solución salina o IRL 1620. El esquema de dosificación y procedimientos fueron los mismos que los del estudio DOX mencionados.

Peso corporal. El peso corporal de los animales de solución salina o de IRL 1620 en el comienzo del experimento, fue $172 \pm 4,87$ y $176,9 \pm 6,19$ g respectivamente, que aumentó a $200,3 \pm 2,57$ y $202,2 \pm 7,28$ g, respectivamente, en el día 16. El porcentaje de diferencia en la ganancia de peso corporal de los animales de solución salina o de IRL 1620 en el día 16 desde el inicio del experimento, fue $16,17 \pm 1,64$ y $14,19 \pm 1,66$, respectivamente. El peso corporal de las ratas en los otros grupos fue comparable en el inicio del tratamiento y fue $170,38 \pm 2,61$, $174,6 \pm 3,45$, $174,7 \pm 5,78$ y $179,45 \pm 2,53$ g para la solución salina + 5FU (25 mg/kg), solución salina + 5-FU (50 mg/kg), IRL 1620 + 5FU (25 mg/kg) e IRL 1620 + 5-FU (50 mg/kg) respectivamente. Sin embargo, el peso corporal declinó durante el estudio en las cantidades siguientes: solución salina + 5-FU (25 mg/kg): $- 5,46 \pm 3,39$; solución salina + 5-FU (50 mg/kg): $-10,97 \pm 2,18$; IRL1620 + 5-FU (25 mg/kg): $- 8,27 \pm 2,31$, e IRL 1620 + 50 mg/kg: $-11,20 \pm 2,41$ (figura 4A).

Volumen del tumor. Las ratas tratadas con solución salina o IRL 1620 tuvieron un rápido aumento progresivo en el tamaño del tumor y todas las ratas en estos grupos se sacrificaron el día 16 debido a la carga tumoral grande. No hubo diferencias significativas en el tamaño del tumor de las ratas administradas con solución salina + 5-FU (25 mg/kg) e IRL 1620 + 5-FU (25 mg/kg). Sin embargo, hubo una disminución consistente significativa en el volumen del tumor de ratas tratadas con IRL 1620 + 5-FU (50 mg/kg) en los días 13, 16, 19 y 22 en comparación con las tratadas con solución salina + FU (50 mg/kg), (figura 4B).

Peso del tumor. No hubo diferencias en el peso del tumor de ratas administradas con solución salina o IRL 1620 en el sacrificio en el día 16 (los pesos fueron $17,92 \pm 2,01$ y $19,50 \pm 2,37$ g respectivamente). Hubo un descenso del 38,18% en el peso de los tumores de ratas tratadas con IRL 1620 + 5-FU (25 mg/kg) en comparación con los animales tratados con solución salina + 5FU (25 mg/kg). Además, hubo una diferencia de 167,19% en el peso tumoral entre ratas tratadas con IRL1620 + 5-FU (50 mg/kg) y solución salina + 5-FU (50 mg/kg), ($p < 0,01$) (figura 4C). Estos resultados demuestran que IRL 1620 aumenta significativamente la eficacia de 5-FU en la reducción del volumen del tumor y el peso del tumor.

Estos estudios demuestran colectivamente que IRL 1620 es eficaz en un modelo animal de cáncer de próstata para aumentar la perfusión de sangre en el tumor, aumentar el suministro de agentes quimioterapéuticos al tumor y mejorar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos.

En conclusión, IRL 1620 se puede utilizar como un vasodilatador selectivo para el tumor y se puede utilizar para incrementar selectivamente la administración y la eficacia de los agentes quimioterapéuticos. El presente estudio demuestra claramente que se pueden lograr mayores concentraciones en varios múltiples del fármaco en el tejido tumoral mediante la adopción de esta estrategia terapéutica. Finalmente, también se han propuesto antagonistas del receptor de ET_A para mejorar el flujo sanguíneo del tumor (Sonveaux et al., Cancer Res, 64:3209 (2004)) y se pueden utilizar para mejorar la administración de fármacos anticancerígenos al tumor según la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas que contienen los ingredientes activos descritos son adecuadas para la administración a seres humanos u otros mamíferos. Típicamente, las composiciones farmacéuticas son estériles, y no contienen compuestos tóxicos, carcinogénicos o mutagénicos, que causarían una reacción adversa cuando se administraran. La administración de la composición farmacéutica se puede realizar antes, durante, o después de la aparición del crecimiento del tumor sólido.

Un método de la presente divulgación puede realizarse utilizando ingredientes activos como los descritos anteriormente, o como una sal fisiológicamente aceptable, derivado, pro-fármaco o solvato de los mismos. Los ingredientes activos pueden ser administrados como el compuesto puro o como una composición farmacéutica que contiene una o ambas entidades.

Las composiciones farmacéuticas incluyen aquellas en las que los ingredientes activos se administran en una cantidad eficaz para conseguir su propósito previsto. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad eficaz para prevenir el desarrollo de, para eliminar, para retardar la progresión de, o para reducir el tamaño de un tumor sólido. La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en el presente documento.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad de los ingredientes activos que consigue lograr el efecto deseado. La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos ingredientes activos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, la determinación de la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico que se expresa como la relación entre la DL_{50} y la DE_{50} . Se prefiere un índice terapéutico alto. Los datos obtenidos se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de los ingredientes activos preferiblemente se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

La formulación y la dosis exacta son determinadas por un médico individual a la vista de la condición del paciente. La cantidad y los intervalos de las dosis se pueden ajustar individualmente para proporcionar concentraciones de los ingredientes activos que sean suficientes para mantener los efectos terapéuticos o profilácticos.

La cantidad de composición farmacéutica administrada puede ser dependiente del sujeto a tratar, del peso del sujeto, la gravedad de la afección, la manera de administración, y el juicio del médico que prescribe.

Los ingredientes activos se pueden administrar solos o en mezcla con un vehículo farmacéutico seleccionado con respecto a la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención pueden así ser formuladas de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que puedan usarse farmacéuticamente.

Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de los ingredientes activos, la composición puede estar en la forma de una solución acuosa libre de pirógenos, parenteralmente aceptable. La preparación de dichas soluciones parenteralmente aceptables, que tienen en cuenta el pH, isotonicidad, estabilidad y similares, está dentro

de la experiencia en la técnica. Una composición preferida para inyección intravenosa contendrá típicamente un vehículo isotónico aunque esta característica no es necesaria.

Para uso veterinario, los ingredientes activos se administran como una formulación convenientemente aceptable según la práctica veterinaria normal. El veterinario puede fácilmente determinar el régimen de dosificación que sea más apropiado para un animal particular.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un agonista del receptor ET_B para uso en un método que comprende la administración de dicha composición con un agente quimioterapéutico para tratar un cáncer de próstata en donde el agonista del receptor ET_B es IRL 1620 y el agente quimioterapéutico se selecciona entre la doxorubicina y el 5-fluorouracilo.
2. Una composición para uso según la reivindicación 1, que además comprende dicho agente quimioterapéutico.
- 10 3. Una composición para uso según la reivindicación 2, en donde dicho agonista del receptor ET_B y dicho agente quimioterapéutico son parte de la misma composición, se proporcionan como composiciones separadas, o ambos.
4. Una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho agente quimioterapéutico es la doxorubicina.
5. Una composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho agente quimioterapéutico es el 5-fluorouracilo.
- 15 6. Un agonista del receptor ET_B y un agente quimioterapéutico para uso en el tratamiento de un tumor de próstata, en donde dicho agonista del receptor ET_B es IRL 1620 y dicho agente quimioterapéutico se selecciona entre la doxorubicina y el 5-fluorouracilo.
- 20 7. Un agonista del receptor ET_B y un agente quimioterapéutico para uso en el tratamiento de un tumor de próstata según la reivindicación 6, en donde dicho IRL 1620 está presente en una cantidad de 3 nmoles/kg y la doxorubicina está presente en una cantidad de 2,5 mg/kg o 5 mg/kg.
8. Un agonista del receptor ET_B y un agente quimioterapéutico para uso en el tratamiento de un tumor de próstata según la reivindicación 6, en donde dicho IRL 1620 está presente en una cantidad de 3 nmoles/kg y dicho 5-fluorouracilo está en una cantidad de 25 mg/kg o 50 mg/kg.
- 25 9. Un agonista del receptor ET_B y un agente quimioterapéutico para uso en el tratamiento de un tumor de próstata según la reivindicación 6, en donde dicho agonista del receptor ET_B aumenta selectivamente el suministro de sangre a dicho tumor de próstata.
10. Un agonista del receptor ET_B y un agente quimioterapéutico para uso en el tratamiento de un tumor de próstata según la reivindicación 9, en donde dicho aumento de dicho suministro de sangre a dicho tumor de próstata aumenta la administración de dicho agente quimioterapéutico a dicho tumor de próstata.
- 30 11. Un agonista del receptor ET_B y un agente quimioterapéutico para uso en el tratamiento de un tumor de próstata según la reivindicación 6, en donde dicho agonista del receptor ET_B y dicho agente quimioterapéutico se administran sustancialmente simultáneamente.
- 35 12. Un agonista del receptor ET_B y un agente quimioterapéutico para uso en el tratamiento de un tumor de próstata según la reivindicación 11, en donde dicho agonista del receptor ET_B y dicho agente quimioterapéutico se administran como una sola composición.
13. Un agonista del receptor ET_B y un agente quimioterapéutico para uso en el tratamiento de un tumor de próstata según la reivindicación 6, en donde dicho agonista del receptor ET_B y dicho agente quimioterapéutico se administran secuencialmente.
- 40 14. Un agonista del receptor ET_B y un agente quimioterapéutico para uso en el tratamiento de un tumor de próstata según la reivindicación 13, en donde dicho agente quimioterapéutico se administra antes de dicho agonista del receptor ET_B o dicho agonista del receptor ET_B se administra antes de dicho agente quimioterapéutico.

FIG. 1A

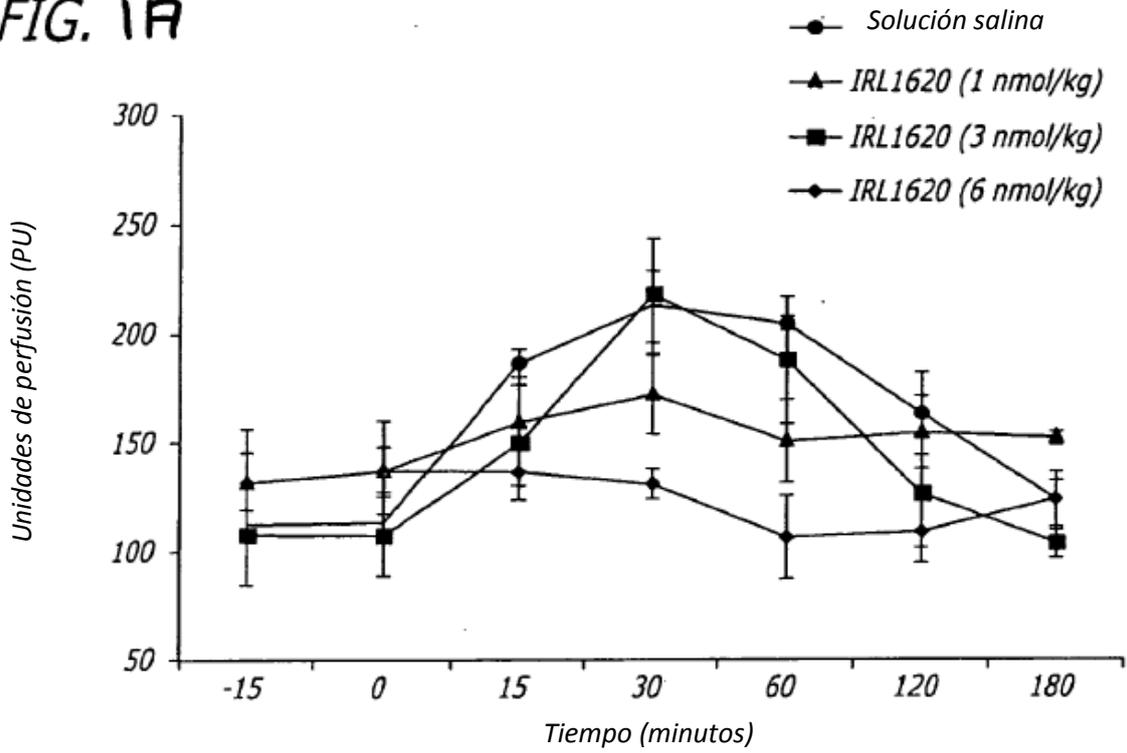
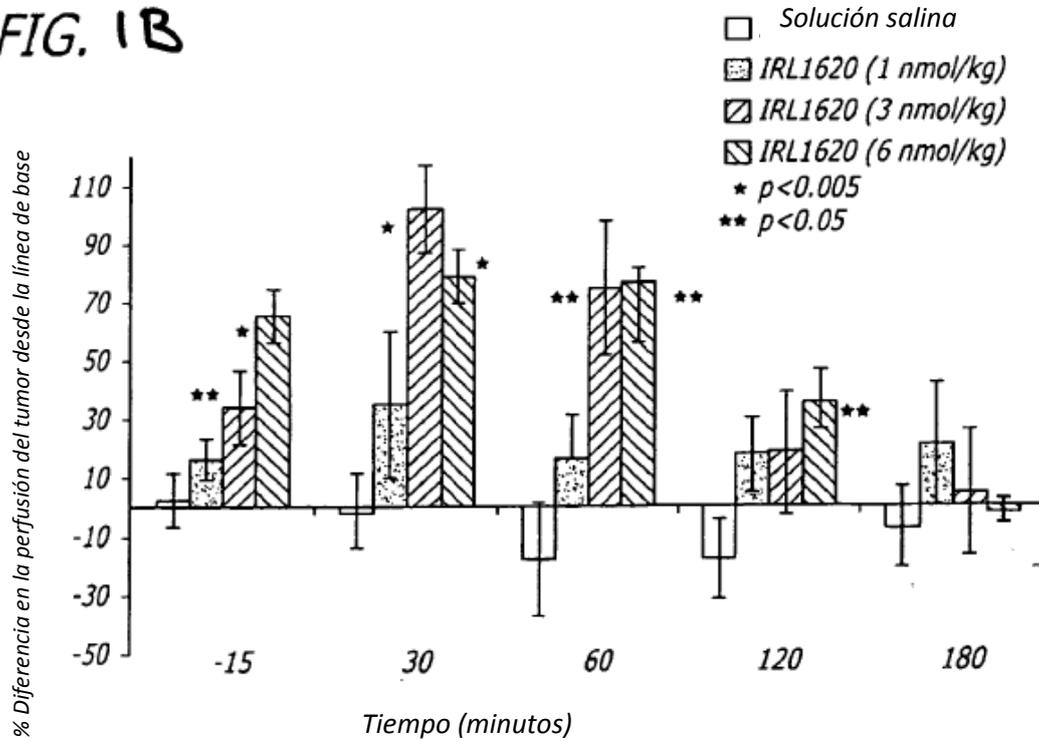


FIG. 1B



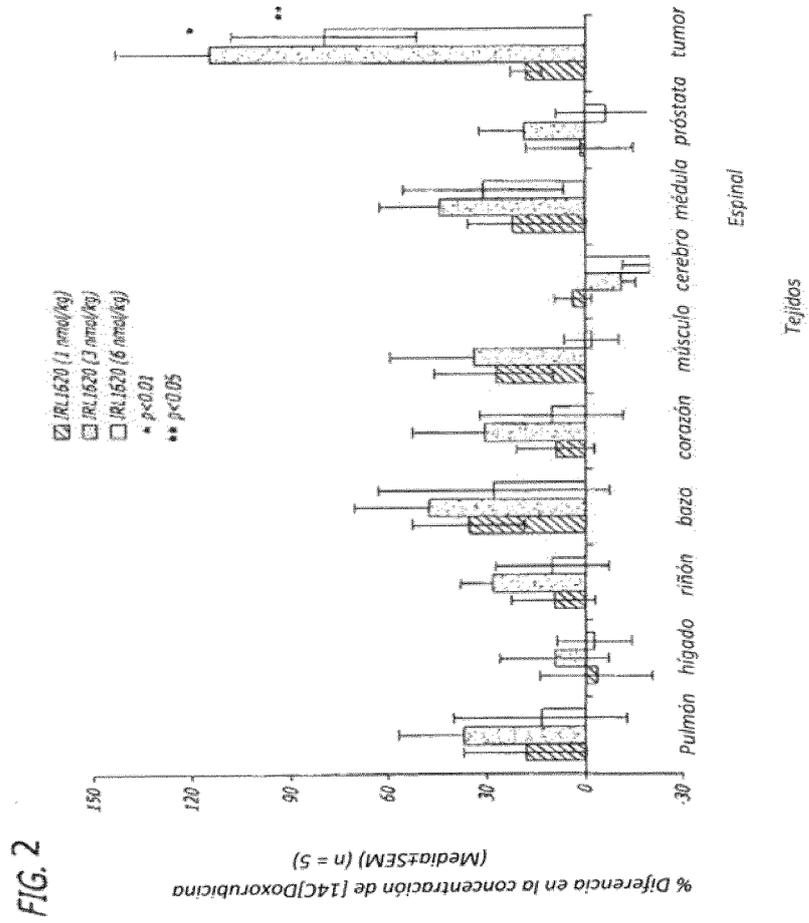


FIG. 3A

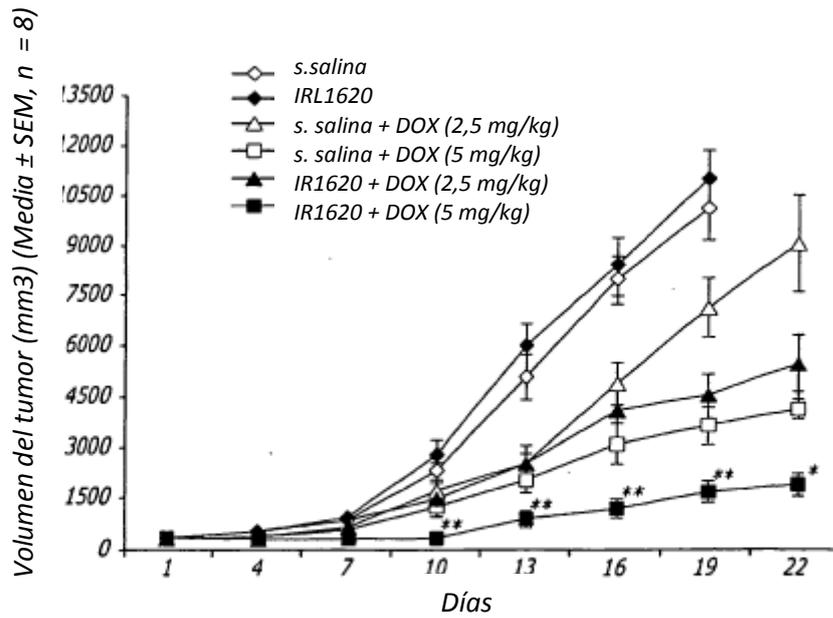
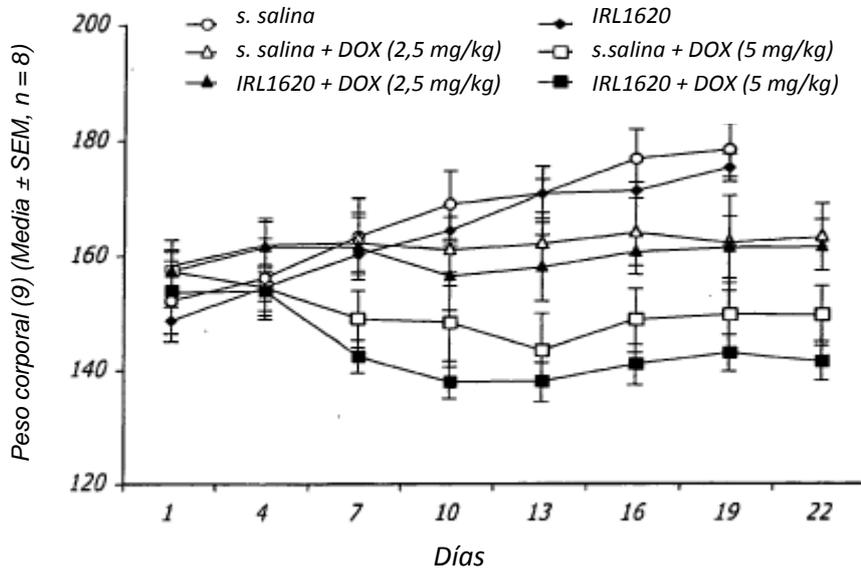


FIG. 3B

*p<0,05

**p<0,05 comparado con vehículo + DOX (5 mg/kg)

FIG. 3C

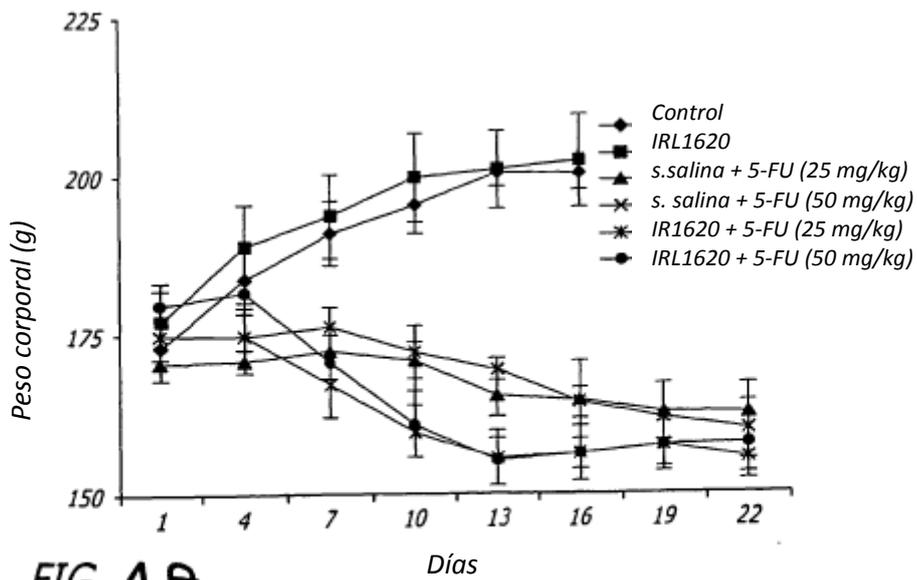
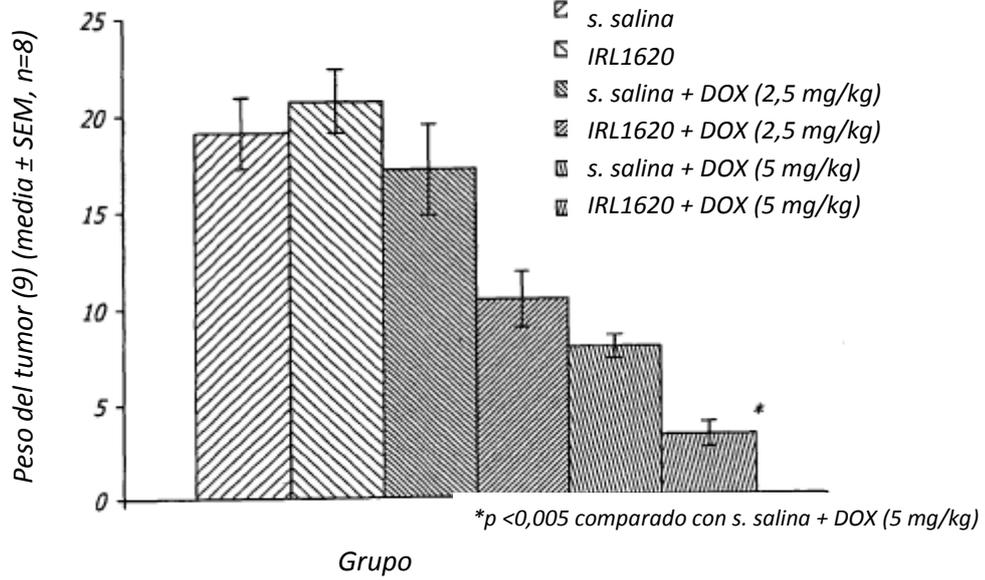


FIG. 4A

FIG. 4B

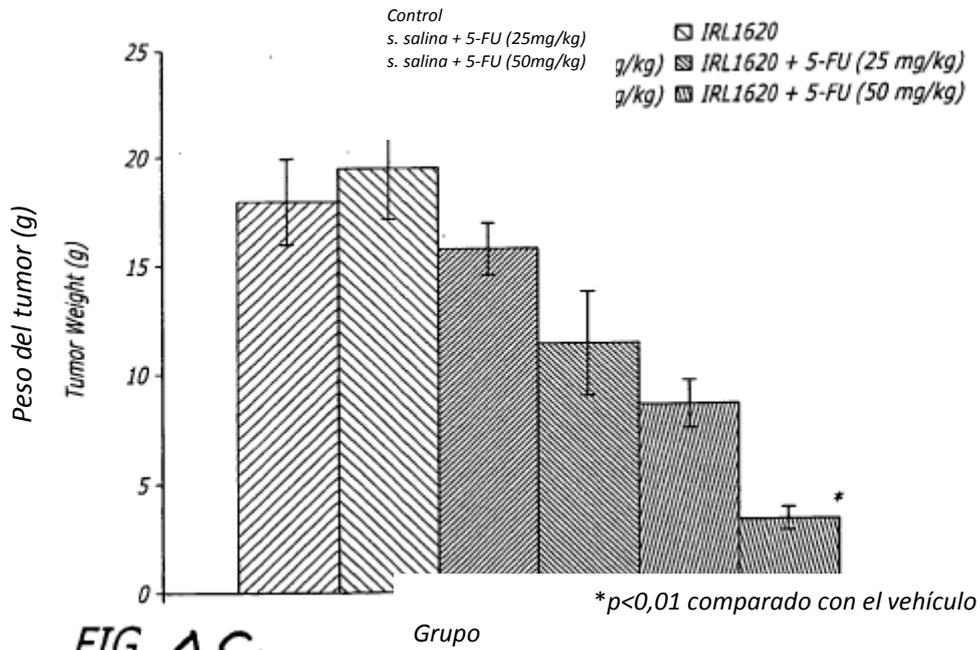
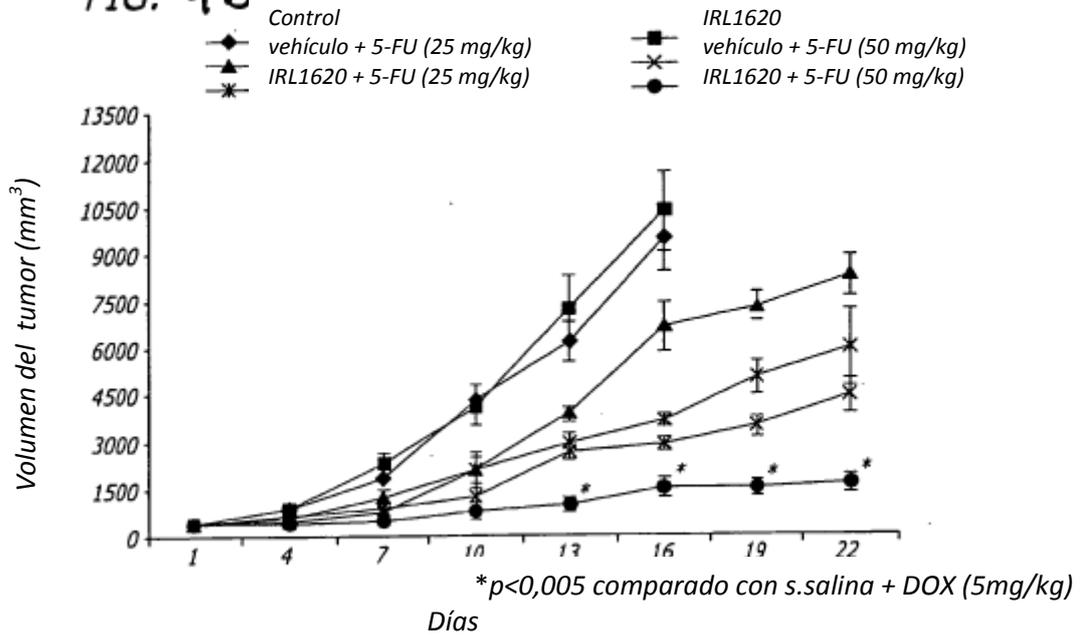


FIG. 4C