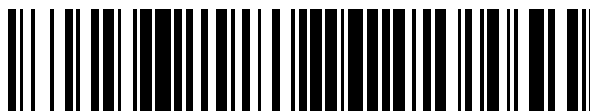


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 535**

51 Int. Cl.:

A61K 31/541 (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: **06.12.2000 E 06019082 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 1797884**

54 Título: **Taurolidina o taurultamo para uso en el tratamiento de tumores de próstata, de colon, de pulmón y para el tratamiento del glioblastoma multiforme recurrente**

30 Prioridad:

06.12.1999 US 169122 P

06.12.1999 US 169127 P

06.12.1999 US 169128 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.01.2014

73 Titular/es:

GEISTLICH PHARMA AG (100.0%)

BAHNHOFSTRASSE 40

6110 WOLHUSEN, CH

72 Inventor/es:

CALABRESI, PAUL y

DARNOWSKI, JAMES

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 438 535 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

Taurolidina o taurultamo para uso en el tratamiento de tumores de próstata, de colon, de pulmón y para el tratamiento del glioblastoma multiforme recurrente

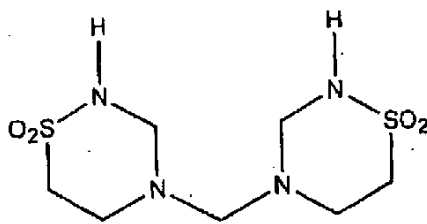
Antecedentes de la invención

5 La invención se refiere a la terapia del cáncer.

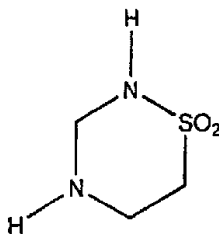
A pesar de los avances en la identificación de agentes quimioterapéuticos para inhibir el crecimiento de células cancerosas, el cáncer sigue siendo una temible enfermedad con una alta tasa de mortalidad. Un problema importante de los agentes quimioterapéuticos es la baja especificidad. Muchos agentes anticáncer no distinguen de modo adecuado entre las células normales y las células cancerosas. Como resultado, a menudo producen efectos secundarios graves no deseados.

Sumario de la invención

15 La invención proporciona un compuesto para su uso para inducir la apoptosis en células cancerosas en un mamífero, en el que dicho compuesto es taurolidina o taurultamo, y en el que dicho cáncer se selecciona de un cáncer de colon, un cáncer de pulmón y un cáncer de próstata. El compuesto se administra para que se ponga en contacto directo con una célula tumoral a una dosis suficiente para inducir la muerte celular por apoptosis. Preferiblemente, el compuesto se administra de una manera y a una dosis que induce preferentemente la muerte apoptótica, comparada con la muerte necrótica. El compuesto se administra por vía sistémica, por ejemplo, por vía oral o intravenosa. El compuesto que se va a administrar es taurolidina o taurultamo. La taurolidina también se proporciona para su uso en el tratamiento del glioblastoma multiforme recurrente avanzado.



Taurolidina



Taurultamo

25 Los compuestos se administran solos o en combinación con otro agente antineoplásico. Preferiblemente, el agente coadministrado mata a las células tumorales a través de un mecanismo distinto de la apoptosis. Por ejemplo, se administra un antimetabolito, un análogo de purina o pirimidina, un agente alquilante, un agente reticulante (por ejemplo, un compuesto de platino) y un agente intercalante y/o un antibiótico en un régimen de terapia de combinación. El fármaco coadministrado se administra antes, después o al mismo tiempo que la taurolidina o el taurultamo.

30 La invención también incluye tratar un tumor resistente a fármacos, por ejemplo, un tumor resistente a múltiples fármacos (MDR), en un mamífero, mediante la administración al mamífero de un compuesto de taurolidina o taurultamo. El tumor que se va a tratar es un carcinoma. El tumor resistente a fármacos se selecciona del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer de próstata, y cáncer de pulmón.

35 Preferiblemente, la taurolidina o el taurultamo se administra de una manera que permite el contacto directo con la superficie de la célula tumoral. El compuesto se une a un componente, por ejemplo, un ligando polipeptídico de la superficie celular u otro resto de la superficie celular, para iniciar una cascada de transducción de señales intracelular que culmina con la muerte celular por apoptosis. Los tumores que van a tratar son el cáncer de colon, el cáncer de próstata y el cáncer de pulmón. La liberación lenta del compuesto hacia cualquier tejido se logra implantando una matriz cargada con el fármaco en contacto directo o adyacente al sitio tumoral.

Los compuestos se formulan para la administración para el contacto directo con las células cancerosas, por ejemplo, en forma de una disolución acuosa. Las formulaciones incluyen una composición que forma una película terapéutica contenida o revestida con el compuesto terapéutico, así como ungüentos, pastas, pulverizados, parches, cremas, geles, esponjas y espumas.

- 5 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 es un diagrama de la estructura de la taurolidina y sus principales productos de la degradación o metabolitos (taurultamo, taurinamida y taurina). Después de la degradación, cada molécula de taurolidina genera 3 restos que contienen metilol implicados en las actividades antibióticas y antiendotoxinas de la taurolidina.

15 La figura 2 es un diagrama de barras que muestra el efecto de la 48^a exposición a taurolidina sobre el aspecto de los residuos de ADN en células PA-1, SKOV-3 y NIH-3T3. Se sembraron 3×10^5 células en matraces de cultivo de tejidos de plástico. Veinticuatro horas después se añadió taurolidina para lograr unas concentraciones finales de 25 μM , 50 μM o 100 μM . Los cultivos control recibieron un volumen apropiado de Kollidine-17P. Después de un periodo de 48 h de exposición a la taurolidina, las células se recolectaron y se tiñeron con yoduro de propidio. Se evaluó el porcentaje de residuos de ADN en la región sub-G₀/G₁ utilizando técnicas citofluorométricas. Cada barra representa la media (\pm EE) de tres determinaciones. **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$.

20 La figura 3 es un diagrama de barras que muestra el efecto de la 24^a exposición a taurolidina sobre la externalización de fosfatidilserina sobre la membrana en células PA-1, SKOV-3 y NIH-3T3. Se sembraron 3×10^5 células en matraces de cultivo de tejidos de plástico. Veinticuatro horas después se añadió taurolidina para lograr unas concentraciones finales de 25 μM , 50 μM o 100 μM . Los cultivos control recibieron un volumen apropiado de Kollidine-17P. Después de 24 h más, las células se recolectaron y se determinó la externalización de fosfatidilserina evaluando la unión de anexina-V/FITC utilizando técnicas citofluorométricas. Cada barra representa la media \pm MEE de cuatro determinaciones. **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

25 La figura 4 es una fotografía que muestra los resultados de un análisis de la transferencia Western del efecto de una exposición de 24 h a taurolidina 50 o 100 μM sobre la expresión de PARP y el aspecto del principal producto de la ruptura de PARP en células PA-1, SKOV-3 y NIH-3T3. Se sembraron 2×10^6 células en matraces de cultivo de tejidos de 150 cm^2 . Veinticuatro horas después se añadió taurolidina a unas concentraciones 50 μM o 100 μM . Después de 24 h más, las células se recolectaron, se determinó el número de células y se generaron partes alícuotas derivadas de un número idéntico de células de cada condición de exposición. Las proteínas totales de estos lisados de células completas se separaron mediante SDS-PAGE y se trasladaron a filtros de nitrocelulosa. Los filtros después se inmunotransfirieron para detectar la proteína PARP intacta y los fragmentos de la ruptura utilizando el anticuerpo anti-PARP monoclonal de ratón del clon C-2-10 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA). Los complejos de proteína-anticuerpo resultantes se visualizaron mediante técnicas de quimioluminiscencia.

35 La figura 5 es un diagrama de barras que muestra el efecto de la administración retrasada de un único régimen de inyección en embolada intraperitoneal (i.p.) de 3 días (3d) de taurolidina (20 mg/ratón/inyección) sobre la aparición de xenoinjertos de tumor humano i.p. en ratones hembra atímicos después de la administración i.p. de 5×10^6 células de tumor de ovario humano SKOV-3. La terapia con taurolidina se inició en el día de la inoculación de las células tumorales o hasta 5d después. Catorce días después de la última inyección de taurolidina los ratones de todos los grupos se sacrificaron y se estudió la cavidad peritoneal para la presencia de tumores. Cada experimento se repitió tres veces y el número reunido de animales en cada grupo varió de 15-21.

45 La figura 6 es un diagrama de barras que muestra el efecto de la administración retrasada de un único régimen de inyección en embolada i.p. 3d de taurolidina (20 mg/ratón/inyección) sobre el peso de xenoinjertos de tumor humano i.p. en ratones hembra atímicos después de la administración i.p. de 5×10^6 células de tumor de ovario humano SKOV-3. La terapia con taurolidina se inició en el día de la inoculación de las células tumorales o hasta 5d después. Catorce días después de la última inyección de taurolidina los ratones de todos los grupos se sacrificaron, se retiraron los xenoinjertos de tumor de ovario i.p. y se pesaron los tumores. Cada experimento se repitió tres veces y el número reunido de animales en cada grupo varió de 15-21. Cada barra representa la media (\pm EE) del peso tumoral de 15-21 animales. ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$.

50 Descripción detallada

Se ha descubierto que la taurolidina y el taurultamo son agentes antineoplásicos seguros y eficaces que inducen preferentemente la muerte apoptótica en células cancerosas. Los compuestos inducen la muerte apoptótica de células tumorales.

Compuestos terapéuticos

55 Se ha descubierto que la taurolidina es selectivamente tóxica contra células cancerosas sin matar a las células

normales (es decir, no cancerosas). La taurolidina, el taurultamo o sus derivados o metabolitos tienen una alta afinidad por un resto sobre la superficie de una célula cancerosa (por ejemplo, un receptor de fosfatidilserina) y se unen selectivamente a él, e inducen la apoptosis en esa célula, lo cual conduce, a su vez, a citotoxicidad. La internalización celular del compuesto puede no ser necesaria para la inducción de la muerte apoptótica de una célula cancerosa.

La citotoxicidad o muerte celular puede producirse por necrosis o por apoptosis. La necrosis, que no está genéticamente controlada, normalmente es el resultado de daños físicos o químicos. La apoptosis está genéticamente controlada y es una respuesta celular a un estímulo específico, por ejemplo, una señal generada en la superficie celular. La necrosis implica la destrucción de los orgánulos citoplásmicos y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, mientras que las células que sufren apoptosis muestran un encogimiento de la célula, la formación de ampollas en la membrana, y una condensación y fragmentación de la cromatina. Después de los daños en el ADN en la vía de la enzima caspasa se producen una serie de acontecimientos que implican la activación del calcio y de enzimas calpaína que conducen después a otros cambios celulares y la regulación de las enzimas citoplásmicas.

Una importante diferencia entre la necrosis y la apoptosis *in vivo* es la eliminación de la célula apoptótica antes de que produzca una respuesta inflamatoria. Por contraste con la apoptosis de células, la necrosis de células provoca inflamación. Así, la inducción de la citotoxicidad de las células cancerosas por apoptosis ofrece considerables ventajas frente a la inducción de la muerte celular por agentes quimioterapéuticos convencionales, porque la muerte apoptótica está asociada con daños mínimos a las células o los tejidos circundantes. A diferencia de muchos agentes quimioterapéuticos convencionales, los compuestos de taurolidina o de taurulamo administrados según la invención son agentes citotóxicos que inducen la apoptosis de células cancerosas (pero no de células no cancerosas normales) para reducir, de manera segura, la carga tumoral en un mamífero que padece cáncer.

Caracterización funcional de la taurolidina

La taurolidina (Taurolin™) se identifica de modo químico como bis-(1,1-dioxoperhidro-1,2,4-tiadiazinil-4)metano (figura 1). Es una molécula dimérica relativamente pequeña con un peso molecular de 284 (Knight et al., 1983, J. Pharm. Sci., 72:705-707)). La evaluación temprana de su actividad antibiótica revela que posee actividad bactericida contra un amplio espectro de cepas bacterianas aerobias y anaerobias. La concentración mínima requerida para inhibir el crecimiento de células bacterianas (MIC) varía de 0,01 a 1 mg/ml, dependiendo de la cepa bacteriana evaluada. Estudios anteriores también han revelado que la taurolidina posee actividad contra hongos importantes desde el punto de vista clínico. La concentración requerida para ejercer actividad antifúngica es aproximadamente equivalente a la requerida para producir su actividad antibacteriana.

La actividad antibiótica de la taurolidina depende de una reacción química secundaria a la generación de grupos metilol activos formados tras la descomposición de la molécula de taurolidina de origen (figura 1). Estudios bioquímicos y morfológicos han revelado que el grupo metilol derivado de la taurolidina contiene restos que parecen reaccionar con componentes de la pared celular bacteriana. El resultado de esta reacción química es que la exposición a este agente inhibe significativamente la capacidad de los microorganismos para adherirse a superficies biológicas, tales como células epiteliales. La exposición a taurolidina altera la estructura y reduce el número de fimbrias de la célula bacteriana, siendo esto aparentemente un reflejo de la aglutinación de estas estructuras. Se cree que la modificación de estas estructuras de la superficie es responsable de la capacidad de la taurolidina para alterar la adhesión de la célula bacteriana. Además de este efecto directo sobre los componentes de la pared celular bacteriana, la taurolidina también posee actividad antiendotoxinas por medio de la reducción de la síntesis y la actividad del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α). La taurolidina también reduce el alcance y la gravedad de las adhesiones peritoneales posoperatorias y se ha administrado de modo clínico, mediante lavado, después de una cirugía abdominal para reducir las infecciones y las adhesiones posoperatorias, así como para tratar la peritonitis.

La taurolidina es un antibiótico sintético de amplio espectro que también posee actividad antifúngica. Mecánicamente, reacciona con componentes de la membrana celular bacteriana para evitar la adhesión de las células bacterianas a las superficies de las células epiteliales. Como reflejo del papel crucial de la adhesión celular en el crecimiento y el desarrollo de tumores sólidos humanos, se han iniciado estudios para evaluar la actividad citotóxica de este agente contra el crecimiento de un panel que consiste en 12 líneas celulares de tumores murinos y humanos seleccionados. La evaluación de la actividad inhibidora del crecimiento de una exposición a taurolidina 3d reveló que este agente inhibe el crecimiento de todas las líneas celulares evaluadas con unas CI_{50} que varían de 9,6-34,2 μ M. Se realizaron estudios para identificar el mecanismo o mecanismos subyacentes responsables de este efecto en fibroblastos murinos NIH-3T3 y en las líneas celulares de tumor de ovario humanas PA-1 y SKOV-3. Los estudios iniciales evaluaron el efecto de una exposición durante 48 h a taurolidina sobre la distribución del ciclo celular. Los resultados de este análisis revelaron que, aunque la taurolidina tiene poco efecto sobre el ciclo celular en células PA-1, en células SKOV-3 reduce el porcentaje de células en la fase G_0/G_1 y aumenta el porcentaje de células en S y G_2/M . En estas líneas celulares de tumor humanas, la exposición a taurolidina aumenta significativamente los residuos de ADN en la región sub- G_0/G_1 , un efecto coherente con la inducción de la apoptosis. Por contraste, en células NIH-3T3, la taurolidina aumenta el porcentaje de células en fase S, disminuye el porcentaje de células en G_0/G_1 , y no aumenta los residuos de ADN en la región sub- G_0/G_1 . Otros estudios acerca de la relación

entre la exposición a la taurolidina y la apoptosis de células tumorales evalúan la externalización de fosfatidilserina después de una exposición de 24 h a taurolidina, utilizando la unión de anexina-V como marcador de la superficie celular. Estos estudios revelan que la taurolidina aumenta el porcentaje de células positivas a anexina-V en 4 y 3 veces en células PA-1 y SKOV-3, respectivamente. Por contraste, en células NIH-3T3, la exposición a taurolidina aumenta ligeramente (aproximadamente 5%) la unión de anexina-V. Estudios complementarios determinan que una exposición de 48 h a taurolidina 50 o 100 μ M afecta a la ruptura de PARP en estos modelos celulares, y revelan que la taurolidina induce la ruptura de PARP en células PA-1 y SKOV-3. En total, estos resultados *in vitro* revelan que la taurolidina posee actividad citotóxica sobre células tumorales que se correlaciona con su capacidad para inducir específicamente la apoptosis. Por último, se realizaron estudios con base murina para evaluar la actividad antineoplásica de este agente. Los estudios iniciales evaluaron la toxicidad de 3 inyecciones en embolada i.p. diarias consecutivas de taurolidina, a unas dosis que varían de 5 mg/inyección/ratón-30 mg/inyección/ratón. La dosis de 20 mg/inyección produce aproximadamente 10% de mortalidad y se identificó como la MTD en este modelo. La administración de este régimen de taurolidina a ratones atímicos que portan xenoinjertos de tumor de ovario humano i.p. produjo una significativa inhibición de la formación y el crecimiento de tumores. Estos descubrimientos revelan que la taurolidina puede representar una nueva clase de agente antineoplásico y se analizan a la luz de sus implicaciones clínicas.

La invención se basa en el descubrimiento de que, además de las actividades analizadas anteriormente, la taurolidina inhibe de modo selectivo y fiable el crecimiento de las células tumorales y mata selectivamente a las células tumorales mediante la inducción de la apoptosis. Ahora se ha descubierto que la taurolidina mata a menos 28 líneas de células tumorales humanas diferentes, que incluyen tumores de ovario, mama, cerebro, colon, próstata, vejiga urinaria y pulmón, así como melanomas, mesoteliomas, carcinomas laríngeos, leucemias y linfomas. Además, la taurolidina mata a células de glioma resistentes a múltiples fármacos y células del síndrome mielodisplásico (un tipo de células precancerosas). La inhibición del crecimiento tumoral y la inducción de la muerte apoptótica de células tumorales se producen a concentraciones de taurolidina significativamente menores que las necesarias para la actividad antibiótica. Por ejemplo, para aplicaciones antineoplásicas, la taurolidina se administra a una dosis que es al menos 10% menor, preferiblemente al menos 20% menor, más preferiblemente al menos 50% menor, y hasta una unidad logarítmica menor que la dosis requerida para la actividad antibacteriana o antiadhesiva.

La taurolidina es tóxica para células tumorales (pero no para células no tumorales normales), independientemente del origen del tumor. La apoptosis de las células tumorales es inducida después de una incubación con taurolidina durante un tiempo tan corto como una hora en cultivo.

La taurolidina y sus metabolitos también son útiles en una terapia de combinación. Los datos indican que la taurolidina es útil para potenciar la citotoxicidad de otros agentes quimioterapéuticos y/o terapia de radiación mediante la inducción de ciertos tipos de células cancerosas para que entren en la fase S.

Taurolidina y angiogénesis

Se trataron pacientes con cáncer de colon metastásico con taurolidina y se midieron varios factores que controlan la angiogénesis. Se descubrió que cuatro factores que controlan el crecimiento de los vasos sanguíneos (factores de necrosis tisular (TNF), interleuquinas 1, 6 y 10, factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor del crecimiento tumoral- β (TGF)) disminuyen en sujetos tratados con taurolidina, comparado con sujetos que reciben un placebo. Estos datos indican que la taurolidina es un agente antiangiogénesis.

Administración terapéutica

Una cantidad eficaz de un compuesto terapéutico es preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg. Sin embargo, debido a la baja toxicidad de los compuestos de taurolidina y taurultamo, pueden administrarse dosis mayores sin efectos secundarios perjudiciales. Una dosis eficaz para inducir la apoptosis de células cancerosas es un orden de magnitud menor que las dosis administradas para objetivos antisépticos, antibacterianos, antitóxicos o antiadhesión. Una dosis apoptótica de taurolidina o taurultamo eficaz para inducir la apoptosis (por ejemplo, 0,5 μ g/ml) también es significativamente menor que las dosis previamente sugeridas (por ejemplo, 150-450 mg/kg) como potencialmente útiles para el tratamiento de ciertos cánceres. Las dosis eficaces varían, según reconocen los expertos en la técnica, dependiendo de la vía de administración, la utilización de excipientes, y la coadministración con otros tratamientos terapéuticos, que incluyen el uso de otros agentes antitumorales (por ejemplo, un antimetabolito, un análogo de purina o pirimidina, un agente alquilante, un agente reticulante, un agente intercalante o un antibiótico) y terapia de radiación.

Un régimen terapéutico se realiza identificando un mamífero, por ejemplo, un paciente humano, que padece (o está en riesgo de desarrollar) cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de próstata, utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, la taurolidina o el taurultamo se administran a un individuo diagnosticado con un cáncer o a un individuo diagnosticado con un trastorno precanceroso. El compuesto farmacéutico se administra a dicho individuo utilizando métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, el compuesto se administra por vía oral, tópica o parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular e intravenosa. El compuesto se administra de modo profiláctico, después de la detección de un tumor recurrente, o en el momento de la cirugía. Los ejemplos de formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen disoluciones acuosas del agente

activo en una disolución salina isotónica, una disolución de glucosa al 5%, u otro excipiente convencional farmacéuticamente aceptable. También se utilizan agentes solubilizantes convencionales, tales como PVP o ciclodextrinas, como excipientes farmacéuticos para la administración de los compuestos terapéuticos.

5 Los compuestos terapéuticos descritos en la presente se formulan en composiciones para otras vías de administración utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, la taurolidina o el taurultamo pueden formularse en una cápsula o un comprimido para la administración oral. Las cápsulas pueden contener cualquier material farmacéuticamente aceptable convencional, tal como gelatina o celulosa. Los comprimidos pueden formularse según procedimientos convencionales mediante el prensado de mezclas de un compuesto terapéutico con un vehículo sólido y un lubricante. Los ejemplos de vehículos sólidos incluyen almidón y bentonita de azúcar. El compuesto se
10 administra en forma de un comprimido de cubierta dura o una cápsula que contiene un ligante, por ejemplo, lactosa o manitol, una carga convencional, y un agente de formación de comprimidos. Otras formulaciones incluyen un ungüento, una pasta, un pulverizado, un parche, una crema, un gel, una esponja reabsorbible o una espuma. Estas formulaciones se producen utilizando métodos muy conocidos en la técnica.

15 Los compuestos de taurolidina o taurultamo son eficaces tras el contacto directo del compuesto con la célula cancerosa. Por consiguiente, el compuesto puede administrarse por vía tópica. Como alternativa, los compuestos se administran implantando (directamente en un órgano, tal como el hígado, o por vía subcutánea) una matriz sólida o reabsorbible que lentamente libera el compuesto hacia los tejidos adyacentes y circundantes del sujeto.

Para el tratamiento de glioblastomas, el compuesto se administra por vía sistémica. El compuesto se administra, por ejemplo, por vía intravenosa.

20 Citotoxicidad de los compuestos de taurolidina y taurultamo

La actividad citotóxica de la taurolidina se evaluó *in vitro* frente al crecimiento de una diversidad de líneas de células cancerosas humanas, así como en fibroblastos NIH-3T3 "normales", y se descubrió que induce citotoxicidad apoptótica. Las líneas de células neoplásicas utilizadas en el estudio fueron líneas de células tumorales convencionales, por ejemplo, la línea de células de ovario humanas PA1, la línea de células de ovario humanas SKOV3, la línea de células de tumor de colon humanas HT29, la línea de células de próstata humanas DU145, la línea de células de glioblastoma humanas U251, la línea de células de glioblastoma humanas transfectadas con ADN que codifica MDR U251-MDR, la línea de células de glioblastoma humanas T98G, la línea de células de leucemia humanas SP-1, y la línea de células de leucemia humanas Daudi.

30 Los datos indican que la taurolidina inhibe el crecimiento de células cancerosas humanas. De modo sorprendente, la concentración de taurolidina requerida para inhibir el crecimiento de células tumorales después de una exposición de 3 días al compuesto (CI_{50}) es de aproximadamente 12,5 μ M-50 μ M. Esta concentración es al menos 1000 veces menor que las concentraciones utilizadas para inhibir el crecimiento de células bacterianas.

35 Se añadieron taurolidina y células cancerosas a matraces de forma simultánea, y se evaluó el crecimiento celular 3 días después. Se realizaron estudios paralelos para evaluar si la alteración de la adhesión celular desempeña un papel en la actividad citotóxica. Se realizaron ensayos para evaluar la capacidad de la taurolidina para inhibir el crecimiento de células de tumor de ovario humanas después de que fueran establecidas y crecieran *in vitro* como colonias discretas. Los datos revelaron que una exposición de 24 horas a taurolidina 50 μ M produce un significativo efecto citotóxico contra el crecimiento de las células tumorales establecidas. Los datos indican que la actividad citotóxica/citostática de la taurolidina no es debida a la inhibición de la adhesión de las células tumorales.

40 Se evaluó el mecanismo por el cual la taurolidina produce citotoxicidad. Se estudió la cinética del ciclo celular y la distribución del ciclo celular de células tumorales después de una exposición durante 24 h a taurolidina. Los resultados revelan que en células PA1 y 3T3, la exposición a taurolidina altera la cinética del ciclo celular y reduce significativamente el porcentaje de células en las fases S y G2/M. La exposición de células de ovario humano PA1 a este régimen de taurolidina también induce un alto grado de fragmentación del ADN que indica la inducción de la
45 apoptosis. Esta fragmentación del ADN no se observa en células 3T3 normales.

Para evaluar también la posibilidad de que la exposición a taurolidina 50 μ M sea capaz de inducir específicamente la apoptosis en células de tumor de ovario humanas, pero no en fibroblastos normales, se realizaron estudios para evaluar la fragmentación del ADN como una función de la exposición a taurolidina utilizando una electroforesis en gel de agarosa. Los resultados confirman que, en células de tumor de ovario, la exposición a taurolidina produce una
50 fragmentación del ADN abierta que no es evidente en células 3T3 expuestas a un régimen de taurolidina idéntico.

La actividad citotóxica del taurultamo se evaluó *in vitro* utilizando las mismas líneas de células de cáncer humanas que las descritas anteriormente. Los datos indican que el taurultamo induce la muerte apoptótica de células cancerosas pero no de células control normales de la misma manera que la taurolidina. La actividad citotóxica del taurultamo es aproximadamente 75% de la actividad observada con la taurolidina.

55 La muerte apoptótica puede distinguirse de la muerte por otros mecanismos utilizando métodos conocidos en la técnica. Otro reflejo temprano de la inducción de la apoptosis es la ruptura de la proteína poli(ADP-ribosa)

5 polimerasa (PARP) por las caspasas celulares. Se realizaron estudios basados en una transferencia Western para determinar si la exposición a la taurolidina produce la ruptura de PARP. Los resultados revelan que la ruptura de PARP no es evidente en células 3T3 cuando se exponen al mismo régimen de taurolidina. También se detectó apoptosis utilizando métodos conocidos, tales como la determinación de la activación de caspasas, las proporciones de bax/bcl2 y las interacción de fas y fas-l. Se emplean otros métodos para distinguir entre la apoptosis y la necrosis (por ejemplo, un método basado en la fluorescencia descrito en la patente de EEUU n.º 5.976.822) para determinar el mecanismo de la muerte o la dosis en la que un compuesto induce la apoptosis comparada con la necrosis.

10 También se evalúa la actividad antitumoral de un compuesto utilizando un ensayo colorimétrico MTS convencional. Los resultados obtenidos con diversos tipos de células tumorales (células primarias o líneas celulares) se comparan con los obtenidos utilizando células normales. Se calcula la viabilidad de las células en cada línea celular midiendo la conversión celular de una sal de tetrazolio después de incubar las células en una disolución que contiene un compuesto de ensayo en una placa de 96 pocillos. Los valores de CI_{50} obtenidos utilizando el mismo compuesto de ensayo sobre células normales y células de una línea de células tumorales concreta se comparan, y su proporción (CI_{50} de células normales/ CI_{50} de células cancerosas) indica la selectividad de cáncer del compuesto de ensayo. Un aumento en la proporción de CI_{50} de células normales/ CI_{50} de células cancerosas refleja una mayor selectividad del compuesto de ensayo para matar a las células cancerosas.

15 También se evalúa la actividad antitumoral de un compuesto *in vivo* utilizando, por ejemplo, un ensayo de regresión de xenoinjertos tumorales. Por ejemplo, animales que portan tumores establecidos se tratan con un compuesto de ensayo durante un periodo de tres semanas. Se controla el crecimiento de los tumores y la salud general del animal durante el tratamiento de tres semanas y durante dos semanas más después del tratamiento para determinar si se produce un recrecimiento del tumor. Se determina la actividad antineoplásica de la taurolidina en ratones atímicos ("nude") que portan xenoinjertos avanzados y/o metastásicos. Se evalúan regímenes de una única dosis y de múltiples dosis de taurolidina en ratones atímicos ("nude"). Después de la identificación de los regímenes de dosis, se evalúa la actividad antineoplásica en ratones atímicos ("nude") que portan xenoinjertos de células cancerosas humanas, por ejemplo, tumores de ovario, próstata, colon, pancreáticos, de mama y glioma.

Tratamiento de tumores resistentes a fármacos

20 Se descubrió que la taurolidina es particularmente eficaz para matar células tumorales que son refractarias a la citotoxicidad por otros agentes quimioterapéuticos conocidos. Se transfectaron células de glioblastoma con un gen que codifica la resistencia a múltiples fármacos (MDR). Las células transfectadas eran 100-1000 veces más resistentes a agentes quimioterapéuticos convencionales, por ejemplo, adriamicina.

25 Las células de glioblastoma no transfectadas cultivadas con una dosis convencional (por ejemplo, 1 μ M) de adriamicina murieron, pero las células de glioblastoma transfectadas con MDR que se habían puesto en contacto con 1 μ M del fármaco fueron resistentes. Se observó una citotoxicidad significativa de las células de glioblastoma transfectadas con MDR después de un contacto con el compuesto (por ejemplo, taurolidina a una dosis de 50 μ M). Estos datos indican que el compuesto descrito en la presente ejerce su actividad citotóxica a través de un mecanismo que difiere de el de los agentes quimioterapéuticos convencionales. Por consiguiente, una terapia de combinación en la que un compuesto de taurolidina o taurultamo se administra antes, después o al mismo tiempo que otro agente quimioterapéutico (por ejemplo, un antimetabolito, un anticuerpo monoclonal específico de tumor o un agente antiangiogénico) produce un resultado clínico mejorado en pacientes que padecen un trastorno maligno caracterizado por una población mixta de células tumorales (por ejemplo, células que son destruidas por agentes quimioterapéuticos convencionales y células que son MDR).

30 Los siguientes ejemplos demuestran la actividad apoptótica en una diversidad de líneas celulares, que incluyen células de cáncer de próstata, colon y pulmón (según la invención) y células de cáncer de ovario (según el documento EP-B-1.246.617, la patente concedida sobre la solicitud de patente). Además, se indica un ensayo clínico contra el glioblastoma multiforme recurrente. Los documentos WO 92/00743 y WO 98/52572 describen el uso de la taurolidina y el taurultamo para el tratamiento de linfomas, sarcomas, melanomas, carcinomas y leucemias.

Ejemplo 1: Evaluación citotóxica y mecanística de agentes antineoplásicos

35 Se descubrió que la taurolidina es activa para inhibir el crecimiento de una diversidad de líneas de células tumorales humanas *in vitro*. Se emplearon las líneas de células de tumor de ovario humanas PA-1 y SKOV-3 y de fibroblastos murinos NIH-3T3 para determinar el mecanismo de la actividad antitumoral. Los estudios revelaron que este efecto estaba asociado con alteraciones en la estructura del ADN, los componentes de la membrana celular y la ruptura de proteínas, que son coherentes con la inducción de la apoptosis específicamente en células tumorales. La evaluación antineoplásica de la taurolidina en ratones atímicos que portan xenoinjertos intraperitoneales de tumores de ovario humanos demuestra que este agente inhibe significativamente el desarrollo y el crecimiento de tumores *in vivo*.

40 Para estudiar la actividad neoplásica, la taurolidina se formula como una disolución al 2% en Kollidon 17PF al 5%. Los medios de cultivo de células convencionales (por ejemplo, DMEM con alto contenido en glucosa, RPMI 1640, 5A de McCoy y, F12K), la tripsina, y el suero bovino fetal (FBS) se adquirieron en GIBCO/Life Technologies (Grand

Island, NY). La externalización de fosfotidilserina por las células se evaluó utilizando el kit de ensayo de anexina-V/FITC ApoAlert®, adquirido en Clontech (Palo Alto, CA). Los reactivos para la SDS-PAGE se adquirieron en BioRad Laboratories (Richmond, CA). Un anticuerpo monoclonal murino (clon C-2-10) contra PARP humana se adquirió en Zymed Laboratories (San Francisco, CA). Los demás productos químicos se obtuvieron en Sigma (St. Louis, MO).

Los estudios para evaluar la actividad citotóxica de la taurolidina se realizaron utilizando un panel de líneas celulares de tumores sólidos, así como fibroblastos murinos NIH-3T3. En el panel de líneas celulares de tumores se incluyen células de tumor de ovario (PA-1 y SKOV-3), células de tumor de colon (HCT-9, HCT-15 y HT-29), células de tumor de pulmón (H-157, A-549 y H-596), células de tumor de próstata (DU-145), células de glioma (U-251), y melanoma (MNT-1). También se ensayó la línea celular de melanoma murino B16F10. Estas líneas celulares pueden adquirirse con facilidad, por ejemplo, en the American Type Culture Collection (ATCC). Las células se cultivaron en un medio de crecimiento apropiado a 37 °C en un incubador humidificado en una atmósfera de CO₂ al 5%. Bajo estas condiciones de crecimiento, el tiempo de duplicación de todas las líneas celulares era de 20-28 h.

Se realizaron estudios para evaluar la toxicidad y la eficacia terapéutico *in vivo* en ratones atímicos (Hsd:atímicos nude nu/nu) homocigóticos hembra de 6-12 semanas obtenidos de Harlan (Indianápolis, IN).

Para evaluar la inhibición del crecimiento celular, se recolectaron cultivos subconfluentes de las líneas celulares apropiadas mediante tripsinización y se resuspendieron en un medio a una densidad celular de $1-5 \times 10^4$ células/ml. Se añadió 1 ml de esta suspensión celular a cada pocillo de una placa de cultivo de células de 12 pocillos que contenía 3 ml del medio apropiado más suero. Vienticuatro horas después se añadió taurolidina a cada pocillo, en un volumen de 40 µl, para lograr una concentración final de 0,1-200 µM. Los pocillos control recibieron 40 µl de Kollidon 17PF al 5% solo. Setenta y dos horas después se recolectaron todas las células mediante tripsinización y se determinó el número de células utilizando un contador de partículas Coulter modelo Z1 (Coulter Corp., Miami, FL) para evaluar la inhibición del crecimiento celular. Cada experimento se realizó por duplicado y se repitió un mínimo de tres veces.

Para los estudios de citometría de flujo se incubaron 1×10^6 células PA-1, SKOV-3 o NIH-3T3 durante 24 h en un medio apropiado que contenía suero. Vienticuatro horas después se añadió taurolidina en un volumen de 40 µl para lograr una concentración final de 25, 50 o 100 µM. Los cultivos control para cada línea celular se incubaron en un medio que contenía 40 µl de Kollidon 17PF al 5% solo. Cuarenta y ocho horas después se recolectaron todas las células mediante tripsinización y se prepararon para el análisis citofluorométrico mediante métodos convencionales. Por ejemplo, las células recolectadas se resuspendieron en disolución salina tamponada con fosfato enfriada en hielo a una densidad de células final de 2×10^6 células/ml. Después las células se tiñeron durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad con una disolución de yoduro de propidio 0,05 mg/ml, Igepal al 0,6% y citrato de sodio al 1%. Se realizó una citometría de flujo con un FACScan (Becton Dickinson, Plymouth, Reino Unido) utilizando el programa ModFit LT (Becton Dickinson). Se realizó un análisis estadístico con un ensayo ANOVA no paramétrico de Kruskal Wallis, seguido de un ensayo de múltiples comparaciones de Dunn utilizando Instat.

Se evaluó la externalización de fosfotidilserina en la membrana celular, como reflejo de la inducción potencial de la apoptosis, mediante métodos de citometría de flujo utilizando el kit de ensayo de anexina-V/FITC ApoAlert®. Brevemente, se incubaron 1×10^6 células durante 24 h en medio de cultivo de tejidos que contiene suero. A esto se le añadió taurolidina para lograr una concentración final de 25, 50 o 100 µM. Los cultivos control recibieron Kollidon 17PF al 5% solo. Veinticuatro horas después se recolectaron todas las células mediante tripsinización. Las células recolectadas se resuspendieron en 200 µl de tampón de unión y después se incubaron durante 5-15 min en una disolución que contenía anexina-V/FITC 1 µg/ml a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células después se analizaron para cuantificar la unión de anexina-V mediante técnicas citofluorométricas que emplean un FACScan que utiliza el programa ModFit LT con un análisis estadístico tal como se describió anteriormente.

Se empleó un análisis de la transferencia Western para evaluar la ruptura de PARP. Se sembraron 2×10^6 células en distintos matraces de cultivo de tejidos de 75 cm² que contenían 20 ml de medio de cultivo de tejidos más suero. Veinticuatro horas después se añadió taurolidina a unas concentraciones de 50 µM o 100 µM. Veinticuatro horas después de la adición de taurolidina se recolectaron las células, se determinó el número de células y se generaron partes alícuotas que contenían un número igual de células a partir de cada condición de exposición. Las proteínas totales de los lisados de células completas generados a partir de estas partes alícuotas se separaron mediante SDS-PAGE y se electrotransfirieron a filtros de nitrocelulosa. Después los filtros se procesaron para detectar la proteína PARP intacta y los fragmentos de la ruptura utilizando el anticuerpo anti-PARP monoclonal de ratón del clon C-2-10 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA). Los complejos de proteína-anticuerpo resultantes se visualizaron mediante técnicas de quimioluminiscencia convencionales.

Para evaluar la toxicidad inducida por taurolidina, los ratones se dividieron en grupos de 5-8 animales. Después, todos los ratones se pesaron y se inició la terapia, que consistía en una única inyección en embolada i.p. de taurolidina en 3 días consecutivos. Las dosis de taurolidina evaluadas fueron de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/ratón/inyección y, excepto para las inyecciones de 25 (1,25 ml) y 30 mg/ratón (1,5 ml), se administraron en un volumen de 1 ml. La taurolidina para inyección se diluyó a partir de una disolución de taurolidina al 2% mediante la

adición de Kollidon 17PF al 5%. Los animales control recibieron inyecciones de 1 ml de Kollidon 17PF al 5% solo. Los animales se examinaron a diario y se registró el peso corporal dos veces semanales. Una reducción en el peso corporal mayor que 10% es considerada significativa. Se consideró que la dosis máxima tolerada (MTD) era la dosis que producía aproximadamente 10% de mortalidad.

- 5 Para evaluar la eficacia terapéutica, los ratones recibieron una única inyección intraperitoneal de 5×10^6 células SKOV-3 en un volumen de 0,5 ml. Inmediatamente después, los ratones se dividieron de modo aleatorio en grupos de tratamiento de 7 animales. La terapia de taurolidina, que consistía en una única inyección en embolada i.p. de 20 mg de taurolidina en 3 días consecutivos, se inició inmediatamente después de la inoculación de las células tumorales o en intervalos de tiempo seleccionados después de la inoculación de las células tumorales (≤ 5 d). Los animales control recibieron inyecciones de 1 ml de Kollidon 17PF al 5% solo. Los animales se examinaron a diario y se registró el peso corporal dos veces semanales. Catorce días después de la última inyección de taurolidina, todos los ratones de los grupos se sacrificaron mediante asfixia por CO₂, se retiraron todos los focos de tumores i.p. y se determinó el peso de los tumores. Se calculó el peso medio de los tumores para cada grupo de tratamiento, y un análisis estadístico de las diferencias en el peso medio de los tumores entre los grupos de tratamiento empleó el ensayo de la t de Student. Unos valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados significativos.

La taurolidina inhibe el crecimiento de células tumorales

Se evaluó la capacidad de la taurolidina para inhibir el crecimiento celular en un panel de líneas de células neoplásicas murinas y humanas formado por 13 líneas diferentes que representan 6 tipos de tumores diferentes. Los resultados de este estudio revelaron que una exposición de 3d a taurolidina inhibe el crecimiento celular en cada línea celular examinada (tabla 5).

Se evaluó la CI₅₀ de la taurolidina frente al crecimiento de líneas celulares neoplásicas murinas y humanas seleccionadas como sigue. Se sembraron las células a una densidad de $1-5 \times 10^4$ células en cada pocillo de un matraz de cultivo de tejidos de 6 pocillos. Veinticuatro horas después se añadió taurolidina a unas concentraciones que variaban de 1-100 μ M. Después de tres días, las células se recolectaron mediante tripsinización y se determinó el número de células electrónicamente. Se determinó la inhibición del crecimiento celular mediante una comparación con cultivos control no expuestos a taurolidina. Se calculó la CI₅₀ como la concentración requerida para inhibir el número de células en 50%. Cada valor de CI₅₀ representa la media \pm EE de 4-8 determinaciones.

Tabla 5

| <u>Sitio de origen del tumor</u> | <u>Línea celular</u> | <u>CI₅₀ (μM)</u> |
|----------------------------------|----------------------|--|
| Ovario | PA-1 | 11,4 \pm 1,8 |
| | SKOV-3 | 31,6 \pm 7,0 |
| Próstata | DU-145 | 9,8 \pm 0,8 |
| Cerebro | U-251 | 20,1 \pm 2,7 |
| Colon | HT-29 | 18,6 \pm 1,0 |
| | HCT-8 | 11,5 \pm 0,5 |
| | HCT-15 | 9,6 \pm 3,0 |
| Melanoma | B16-F10 | 30,1 \pm 2,6 |
| | MNT-1 | 22,1 \pm 2,1 |
| Pulmón | H-157 | 32,2 \pm 5,6 |
| | A-549 | 26,8 \pm 7,2 |
| | H-596 | 34,2 |
| Fibroblastos murinos | NIH-3T3 | 11,9 \pm 1,8 |

30 De modo sorprendente, las CI₅₀ observadas para cada línea celular fueron notablemente similares y varían a lo largo del intervalo relativamente estrecho de aproximadamente 10 μ M (PA-1, DU-145, HCT-8, HCT-15, B16F10, y NIH-3T3) hasta aproximadamente 35 μ M (H-596).

Los estudios evaluaron el efecto de la taurolidina sobre la proliferación de células tumorales. La inhibición de la proliferación puede reflejar la detención del crecimiento o la muerte celular. Por tanto, los siguientes estudios se centraron en identificar el mecanismo o mecanismos por los cuales la taurolidina induce la inhibición del crecimiento celular. Estos estudios se realizaron en las líneas de células de tumor de ovario humanas PA-1 y SKOV-3 y en los fibroblastos murinos NIH-3T3. Los estudios, que emplean técnicas de citometría de flujo convencionales, evalúan el

efecto de una exposición durante 48 h a taurolidina sobre la distribución del ciclo celular en las líneas de células de tumor de ovario humanas PA-1 y SKOV-3. Los resultados de estos estudios revelan que la exposición a este agente no induce un patrón coherente de alteraciones del ciclo celular.

5 El efecto de una exposición durante 48 h a concentraciones seleccionadas de taurolidina sobre la distribución del ciclo celular en células de tumor de ovario humanas (PA-1 y SKOV-3) y fibroblastos murinos (NIH-3T3) se realizó como sigue. Se sembraron 3×10^3 células en matraces de cultivo de tejidos de plástico. Veinticuatro horas después se añadió taurolidina para lograr una concentración final de 25 μ M, 50 μ M o 100 μ M. Los cultivos control recibieron un volumen apropiado de Kollidine-17P. Después de 48 h más, las células se recolectaron, se tiñeron con yoduro de propidio y se evaluó la distribución del ciclo celular utilizando técnicas citofluorométricas. Cada valor representa el porcentaje de células en las fases del ciclo celular indicadas y es la media \pm MEE de tres determinaciones.

Tabla 6

| Línea celular/exposición al fármaco | Distribución del ciclo celular (%) | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------|-------------------|
| | G ₀ G ₁ | S | G ₂ /M |
| NIH-3T3 | | | |
| Taurolidina 48 h- 0 μ M | 46,1 \pm 9,2 | 45,0 \pm 5,9 | 9,0 \pm 3,3 |
| Taurolidina 48 h- 25 μ M | 42,5 \pm 9,6 | 44,9 \pm 5,6 | 13,0 \pm 4,0 |
| Taurolidina 48 h- 50 μ M | 33,9 \pm 10,2 | 44,3 \pm 5,9 | 21,8 \pm 4,6 |
| Taurolidina 48 h- 100 μ M | 25,8 \pm 1,7 | 63,2 \pm 9,8 | 11,0 \pm 11,0 |
| PA-1 | | | |
| Taurolidina 48 h- 0 μ M | 29,9 \pm 1,5 | 47,7 \pm 1,0 | 22,5 \pm 0,5 |
| Taurolidina 48 h- 25 μ M | 28,4 \pm 0,5 | 46,8 \pm 0,6 | 24,7 \pm 0,9 |
| Taurolidina 48 h- 50 μ M | 23,7 \pm 2,2 | 39,5 \pm 12,5 | 36,8 \pm 12,4 |
| Taurolidina 48 h- 100 μ M | 28,4 \pm 5,6 | 44,5 \pm 23,5 | 27,2 \pm 17,9 |
| SKOV-3 | | | |
| Taurolidina 48 h- 0 μ M | 46,7 \pm 1,3 | 38,8 \pm 4,1 | 13,5 \pm 3,6 |
| Taurolidina 48 h- 25 μ M | 45,8 \pm 2,7 | 41,9 \pm 4,2 | 12,3 \pm 3,1 |
| Taurolidina 48 h- 50 μ M | 30,7 \pm 9,4 | 45,5 \pm 12,4 | 30,3 \pm 10,5 |
| Taurolidina 48 h- 100 μ M | 19,9 \pm 6,1 | 54,2 \pm 8,6 | 25,9 \pm 7,8 |

15 Específicamente, en las células PA-1, una exposición durante 48 h de taurolidina hasta 100 μ M tiene poco efecto sobre la distribución del ciclo celular. En efecto, el porcentaje de células en las fases G₀/G₁, S y G₂/M fundamentalmente no mostró cambios a pesar de la exposición a taurolidina. De modo diferente, en las células SKOV-3, la exposición a taurolidina produjo una disminución dependiente de la concentración en el porcentaje de células en G₀/G₁, pero un aumento en el porcentaje de células en la fase S y G₂/M. De manera importante, en ambas líneas celulares PA-1 y SKOV-3, la exposición a taurolidina también produjo la aparición de restos de ADN en la región sub-G₀/G₁, un efecto que depende de la concentración de taurolidina (figura 2). Al igual que en la línea celular SKOV-3, la exposición de las células NIH-3T3 a taurolidina disminuyó el porcentaje de células en G₀/G₁, y aumentó el porcentaje de células en S de una manera dependiente de la concentración. Sin embargo, a diferencia de las células de tumor de ovario humanas evaluadas, la exposición a taurolidina en las células NIH-3T3 no afecta significativamente a la aparición de restos de ADN en la región sub-G₀/G₁.

25 La ruptura de ADN en fragmentos discretos es un acontecimiento tardío en el proceso de la apoptosis. La aparición de residuos de ADN en la región sub-G₀/G₁ 48 h después de la exposición a taurolidina puede ser un reflejo de la fragmentación del ADN asociada a la apoptosis. Para evaluar esta posibilidad, los siguientes estudios evaluaron la capacidad de la taurolidina para aumentar la externalización de fosfatidilserina sobre las membranas celulares, un acontecimiento que se produce en una fase más temprana del proceso apoptótico. Estos estudios se basan en una fluorocitometría y emplean un ensayo de unión de anticuerpos fluorescentes (anexina-V) para evaluar la externalización de fosfatidilserina. Los resultados de los estudios (mostrados en la figura 3) revelan que, en ambas

líneas de células de tumores de ovario humanas PA-1 y SKOV-3, una exposición durante 24 h a taurolidina induce un aumento significativo de unión de anexina-V, dependiente de la concentración de taurolidina, en 4 y 3 veces, respectivamente. Por contraste, en células NIH-3T3, la exposición a taurolidina produjo un aumento no significativo (aproximadamente 5%) en la unión del anticuerpo. Estos datos apoyan los resultados de los estudios del ciclo celular, así como la observación de que la exposición a taurolidina induce la apoptosis en células PA-1 y SKOV-3, pero no en células NIH-3T3. Los resultados indican que la taurolidina induce preferentemente la apoptosis (y la muerte apoptótica) en células tumorales, comparado con células no tumorales.

Para confirmar aún más la inducción de la apoptosis por la taurolidina, se evaluó la relación entre la exposición a taurolidina y la ruptura de PARP. PARP es una proteína nuclear que desempeña un papel clave en el reconocimiento y la reparación de rupturas en el ADN monocatenario y bicatenario. Además, un acontecimiento clave en el proceso apoptótico es la ruptura, mediada por las caspasa 3 y la caspasa 9, y la consecuente desactivación catalítica de esta proteína. Para determinar si la exposición a taurolidina produce la ruptura de PARP en células de tumor de ovario, se realizaron análisis de la transferencia Western sobre extractos de células completas de PA-1, SKOV-3 y NIH-3T3, seguido de una exposición durante 24 h a taurolidina 50 o 100 μ M. Los resultados de este análisis, presentado en la transferencia Western representativa contenida en la figura 4, revelan que, en células PA-1 y SKOV-3, la exposición a taurolidina 50 μ M o 100 μ M produce la ruptura de PARP. Por contraste, en células NIH-3T3, tras la exposición a taurolidina no hay apenas pruebas de este acontecimiento proteolítico. Estos datos confirman que la taurolidina induce la apoptosis en células tumorales, pero no en células no tumorales.

Dada la inducción preferente de la muerte apoptótica en células tumorales, comparado con células no neoplásicas normales, se administró taurolidina a animales que portan tumores para evaluar también la actividad antineoplásica. Se iniciaron estudios para evaluar la actividad antineoplásica de la taurolidina en ratones atímicos que portan xenoinjertos de tumores de ovario humanos i.p.. Se diseñaron estudios *in vivo* para identificar el régimen de dosis máxima tolerada (MTD) de taurolidina en ratones atímicos hembra y para evaluar la toxicidad. La toxicidad se evaluó midiendo los cambios en el peso corporal y la mortalidad después de un régimen de una inyección en embolada i.p. 3d. Las inyecciones de 1 ml diarias administraron unas dosis que varían de 5 mg/ratón/día-30 mg/ratón/día. Los resultados de estos estudios revelaron que, a unas dosis diarias menores que 15 mg/ratón (aproximadamente 650 mg/kg), la taurolidina es bien tolerada (tabla 7).

Se evaluó la toxicidad inducida por taurolidina en ratones hembra atímicos ("nude") como sigue. Grupos de 5-10 ratones fueron inyectados con taurolidina en tres días consecutivos. Las dosis de taurolidina evaluadas varían de 5-30 mg/ratón/inyección y se administraron por vía intraperitoneal en un volumen de 1 ml (con la excepción de las dosis de 25 y 30 mg que, debido a la limitada solubilidad, se administraron a un volumen de 1,25 y 1,5 ml, respectivamente). Durante el régimen de inyección y después diariamente durante 30d, los ratones se pesaron y se estudiaron. Los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces y se reunieron los datos de mortalidad y de pérdida de peso.

Tabla 7

| Dosis de taurolidina (mg/ratón/inyección) | n | Pérdida de peso (% nadir) | Mortalidad (%) |
|---|----|---------------------------|----------------|
| Ninguna (control de vehículo) | 24 | -1,2 | 0 |
| 5 | 17 | -1,2 | 0 |
| 10 | 17 | -1,7 | 6% |
| 15 | 17 | -7,1 | 0 |
| 20 | 46 | -12,2 | 13% |
| 25 | 17 | -16,3 | 47% |
| 30 | 10 | -24,5 | 100% |

La máxima pérdida de peso corporal como resultado de este régimen de dosificación fue del 7%, y el peso corporal volvió a los niveles anteriores a la inyección a los siete días después de la finalización del régimen de inyección. Con unos regímenes que emplean unas dosis de 20 mg/ratón o mayores se observó una toxicidad más significativa (tabla 3). De modo específico, el nadir de la pérdida de peso para los regímenes que emplean 20, 25 o 30 mg/ratón fue de -12%, -16% y -25%, respectivamente. Además, estos regímenes de dosis de taurolidina produjeron una mortalidad del 15%, 43% y 100%, respectivamente.

Basándose en los estudios de toxicidad, se eligieron 3 inyecciones diarias i.p. de 1 ml de taurolidina a una dosis de

20 mg/ratón como MTD. Después, los estudios evaluaron la actividad antineoplásica de este régimen en ratones que portan xenoinjertos de tumores de ovario humanos i.p. derivados de la línea celular SKOV-3. Los ratones se inyectaron i.p. con 5×10^6 células SKOV-3. La terapia con taurolidina, que emplea el régimen de dosis de 20 mg/ratón 3d, se inició hasta 5d después de la inyección de las células tumorales. Catorce días después de la terminación de la terapia con taurolidina, los ratones se sacrificaron y todos los tumores i.p. se retiraron y se pesaron. Los resultados de este estudio, resumido en las figuras 5 y 6, revelan que, cuando se inicia en el día de la inyección de las células tumorales, la terapia con taurolidina es muy eficaz e inhibe la formación de tumores (figura 5), el desarrollo de fluido de ascitis, y el crecimiento (figura 6).

Se evaluó el efecto de un único régimen de inyección en embolada i.p. 3d de taurolidina (20 mg/ratón/inyección, comenzando en el día de la inyección de las células tumorales) sobre el aspecto general de ratones que portan xenoinjertos i.p. de células de tumor de ovario humanas SKOV-3. Diecinueve días después de la inyección de las células tumorales, el peso medio de los tumores en los ratones control (sin taurolidina) era de aproximadamente 1,7 gm. Además, se descubrió que los animales control contenían hasta 7 ml de fluido de ascitis. El peso medio de los tumores en el grupo tratado con taurolidina (un único régimen de taurolidina) era menor que 50 mg y no había pruebas de formación de fluido de ascitis. También se descubrió que un número significativo de estos animales tratados con taurolidina no portaban tumores.

Cuando la terapia se inicia en el día de la inyección de las células tumorales, aproximadamente 80% de los ratones tratados no presentaron pruebas de enfermedad tras el sacrificio. Además, el tamaño medio de los tumores en los ratones tratados con tumores es aproximadamente 40 veces menor que en los ratones control (tratados con vehículo). Incluso si la terapia con taurolidina se retrasa hasta 3d después de la inyección de las células tumorales, aproximadamente 10% de los ratones no portaban tumores tras el sacrificio, y el tamaño medio de los tumores en los ratones tratados de nuevo era significativamente menor que en los controles. El inicio de este único ciclo de terapia de taurolidina 5d después de la inyección de las células tumorales (es decir, en ratones con tumores de ovario i.p. establecidos) aún fue capaz de inhibir significativamente el crecimiento tumoral.

Los datos presentados en la presente indican que una clase de compuestos, ejemplificados por la taurolidina, posee una potente actividad antineoplásica mediante la inhibición selectiva del crecimiento de las células tumorales e induce específicamente la apoptosis en las células tumorales. De modo sorprendente, se descubrió que la CI_{50} citotóxica de la taurolidina está en el intervalo de 10-50 μM , aproximadamente 100 veces menor que la requerida para sus efectos antibióticos. Esta diferencia en las concentraciones eficaces, combinada con las bajas toxicidades clínicas observadas de la taurolidina, indica que esta clase de compuestos es útil como agente antineoplásico seguro y clínicamente bien tolerado.

Los datos revelan que la exposición a taurolidina inhibe, de forma eficaz, la proliferación y la viabilidad de todas las líneas celulares de tumor evaluadas en un panel amplio de líneas de células de tumores sólidos. La taurolidina induce la apoptosis en células neoplásicas, lo cual indica que su mecanismo de acción no es simplemente la inhibición de procesos o componentes de la adhesión de la superficie celular. Los resultados de los estudios realizados en modelos de células cancerosas no adherentes apoyan los anteriores descubrimientos y revelan que una exposición tan corta como de 90 min a taurolidina induce la apoptosis en la línea celular promielocítica humana HL-60. La exposición a taurolidina produce la activación de las caspasas 3, 8 y 9, una alteración de la integridad de la membrana mitocondrial acompañada por el eflujo de citocromo C desde estos orgánulos, y la ruptura de la proteína PARP.

Las células de leucemia humanas HL-60, que están genéticamente modificadas para resistir a la inducción apoptótica, fueron inducidas a la apoptosis independientemente (cadena abajo) del punto bcl-2/bax (gen antimuerte) en la cascada de transducción de señales. De modo sorprendente, en células HL-60 que sobreexpresan Bcl2, se descubrió que la exposición a taurolidina es capaz de inducir la apoptosis, pero con una aparición retrasada. Estos datos indican que un producto de la degradación de la taurolidina activo es capaz de reaccionar con componentes de la membrana para afectar a procesos de señalización intracelulares e iniciar el proceso de la apoptosis.

Se ha descubierto que la capacidad de la taurolidina para inducir la apoptosis es específica de células tumorales. Esta observación se confirmó utilizando células primarias normales (no tumorales) derivadas de animales que se sabe que no portan tumores. Se evaluó la actividad citotóxica y apoptótica de la taurolidina en cultivos de médula ósea murina normal, así como en cultivos de células T humanas activadas. En ambos modelos de células normales, la taurolidina no es citotóxica en el intervalo de alto μM , y no produce cambios celulares coherentes con la inducción de la apoptosis. En la médula ósea murina normal, se requieren concentraciones en el intervalo de mM para inhibir la proliferación celular. Estos descubrimientos indican que la taurolidina (o uno de sus metabolitos) accede a una diana específica de células tumorales capaz de inducir la apoptosis de células tumorales.

Ejemplo 2: Uso clínico

La taurolidina se administra mediante un lavado i.p. inmediatamente después de una cirugía para la eliminación de tumores de ovario recurrentes. Para los pacientes con glioblastoma, la taurolidina se administra por vía sistémica. Hasta la fecha, la taurolidina ha sido bien tolerada en estos pacientes.

- Cuatro pacientes que han sido diagnosticados con glioblastoma multiforme recurrente avanzado, fueron tratados con taurolidina. Se determinó que la prognosis para este grupo de pacientes era de aproximadamente 8 semanas de supervivencia. Cada paciente recibe al menos un régimen de 5 semanas, en el que 20 g de taurolidina se infunden por vía intravenosa en el brazo a lo largo de un periodo de 6 horas dos veces semanales. En 3 de los 4 pacientes tratados, la masa del tumor disminuye o se mantiene; y en un caso se observa un ligero aumento. A las 14 semanas después del inicio de la terapia, cada uno de los pacientes seguía vivo, habiendo excedido la prognosis de 8 semanas. Se logra un efecto clínico beneficioso en estos pacientes con tumores cerebrales mediante la administración sistémica de taurolidina, lo cual indica que la taurolidina, o un metabolito de la taurolidina, atraviesa con éxito la barrera hematoencefálica para acceder al tumor en el cerebro.
- 5
- 10 Estos datos indican que la taurolidina y sus derivados o metabolitos son útiles para inhibir o detener el crecimiento tumoral y para extender la esperanza de vida de los pacientes con tumores.
- Otras realizaciones se encuentran dentro de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un compuesto para su uso para inducir la apoptosis en células cancerosas en un mamífero, en el que dicho compuesto es taurolidina o taurultamo, y en el que dicho cáncer se selecciona de cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer de próstata.
- 5 2.- Un compuesto según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en el que dichas células cancerosas expresan un gen que codifica la resistencia a múltiples fármacos.
- 3.- Un compuesto según la reivindicación 1 o 2 para el uso según la reivindicación 1, para la administración para un contacto directo con dichas células cancerosas.
- 10 4.- Un compuesto según la reivindicación 3 para el uso según la reivindicación 1, formulado como una matriz cargada con fármaco para la implantación en contacto directo o adyacente a dichas células cancerosas.
- 5.- Un compuesto según la reivindicación 1 o 2 para el uso según la reivindicación 1, formulado para la administración intraperitoneal.
- 15 6.- Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para el uso según la reivindicación 1, para la administración antes, al mismo tiempo o después de la administración de un segundo agente quimioterapéutico que se selecciona de un antimetabolito, un análogo de purina, un análogo de pirimidina, un agente alquilante, un agente intercalante, un agente reticulante y un antibiótico.
- 7.- La taurolidina para su uso en el tratamiento del glioblastoma multiforme recurrente avanzado mediante la administración sistémica.

FIG. 1

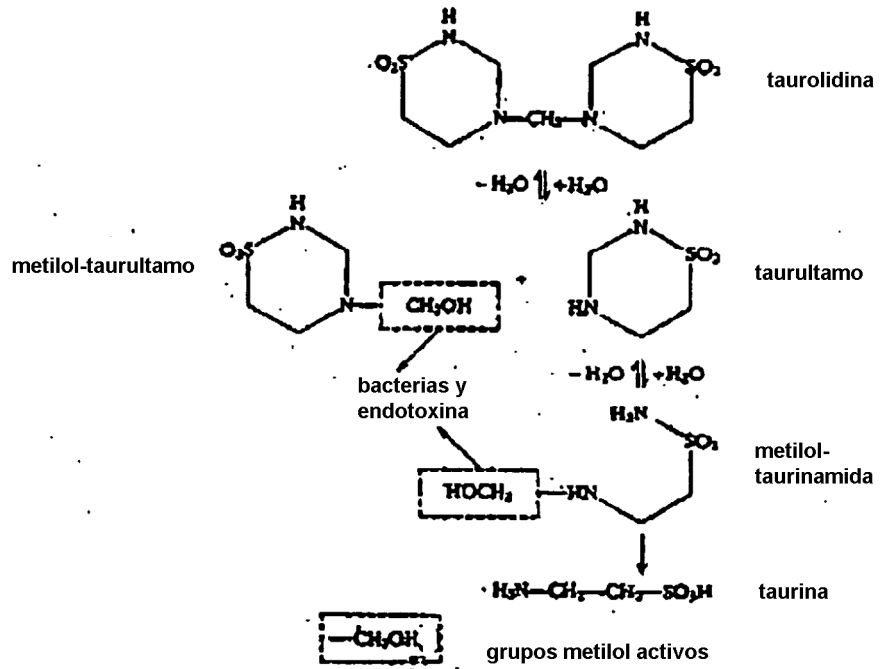


FIG. 2

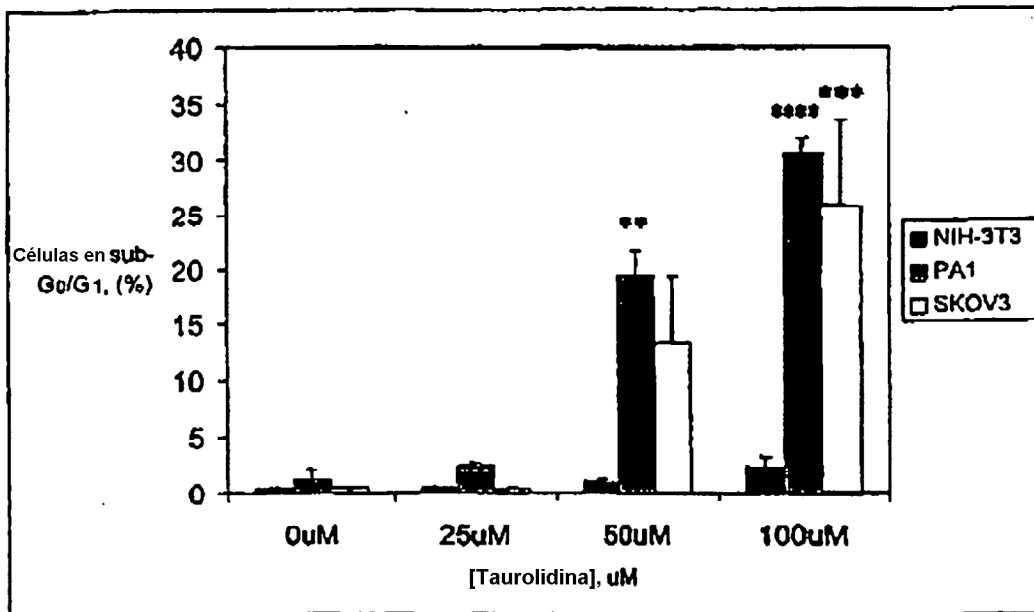


FIG. 3

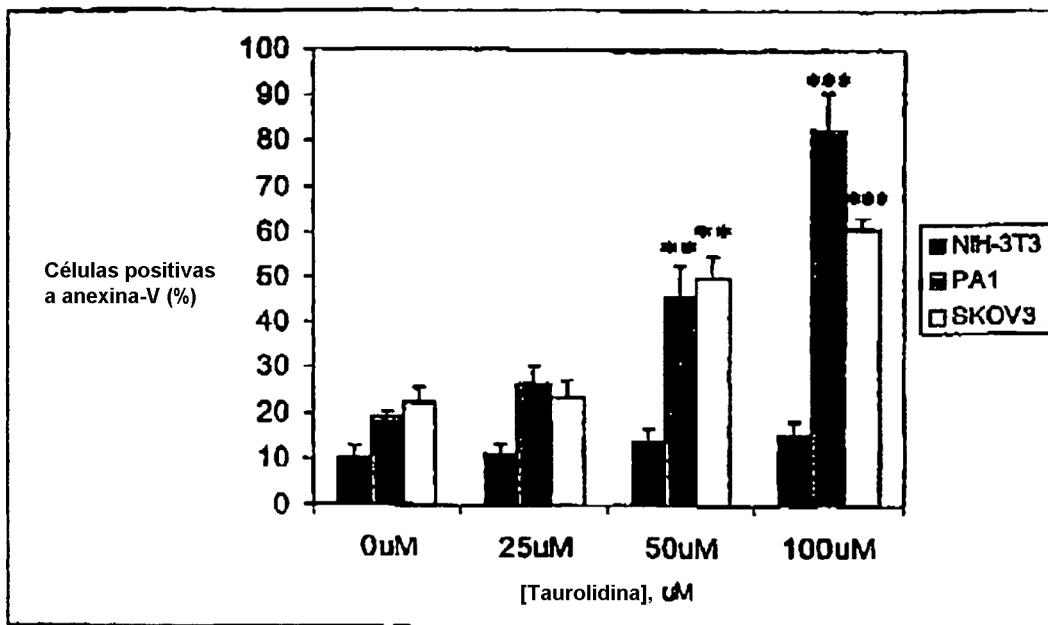


FIG. 4

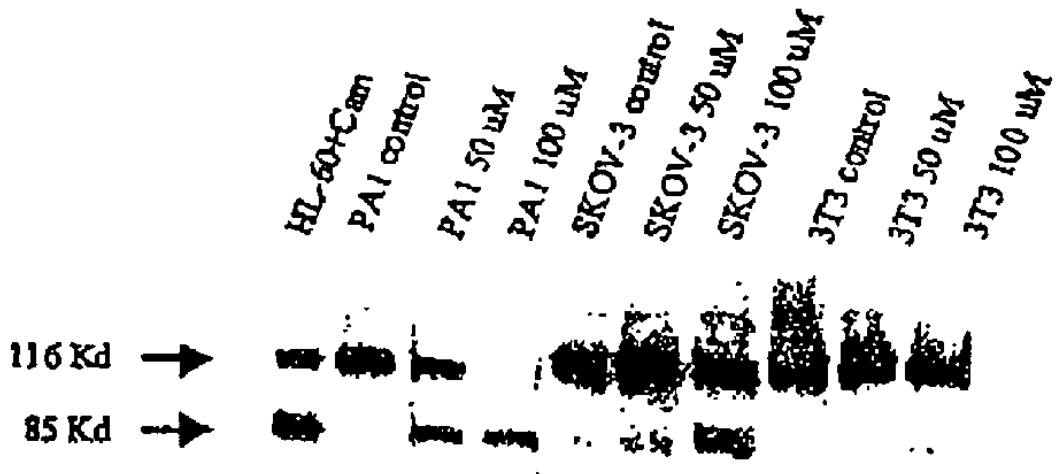


FIG. 5

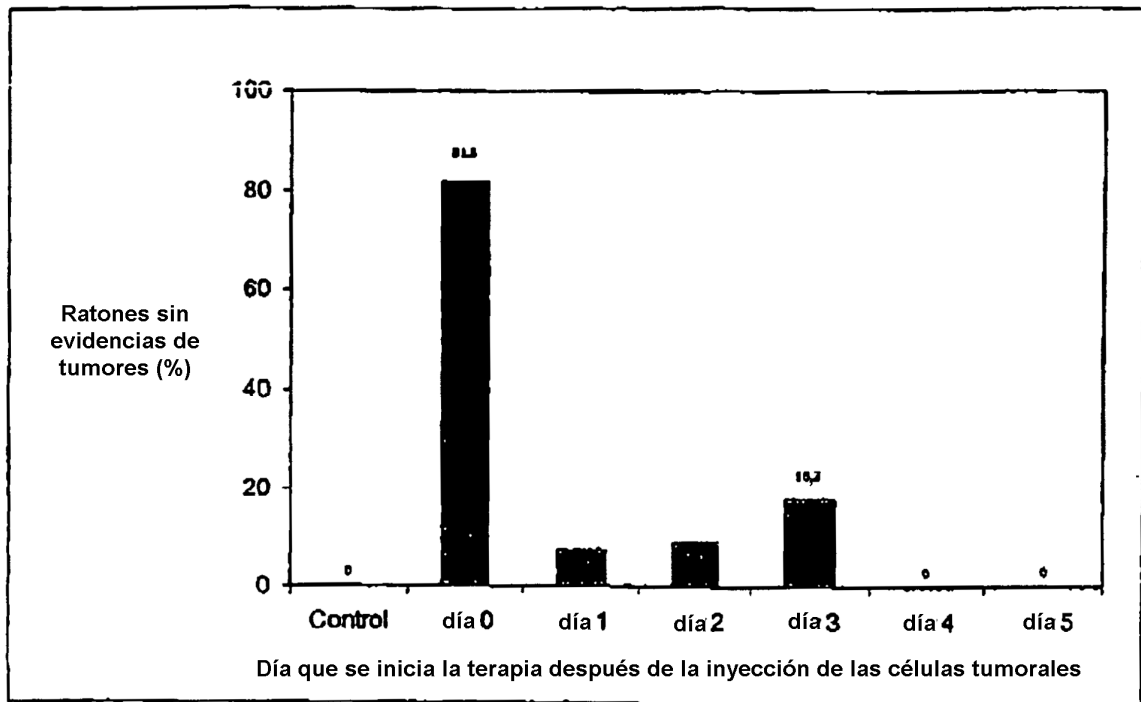


FIG. 6

