

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 877**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/196** (2006.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2008 E 08864891 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2240172**

54 Título: **Combinación de nilotinib y clorambucil para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica**

30 Prioridad:

**21.12.2007 US 15704**

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

**12.05.2014**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse, 35  
4056 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**ALOYZ, RAQUEL SILVIA y  
PANASCI, LAWRENCE CARL**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 459 877 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Combinación de nilotinib y clorambucil para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica

- 5 La invención se relaciona con una combinación que comprende (a) un agente que daña el ADN, a saber, clorambucil; y (b) 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida ("nilotinib"); una composición farmacéutica que comprende tal combinación y al menos vehículo opcionalmente aceptable, apropiado para uso simultáneo, separado o secuencial, en particular para uso en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL); y un empaque o producto comercial que comprende una combinación tal, cada uno como se define en las reivindicaciones independientes que se incorporan aquí como referencia.
- 10 El agente que daña el ADN en una combinación de acuerdo con la invención es un análogo de mostaza de nitrógeno llamado clorambucil, pero la descripción igualmente permite clornafazina, estramustina, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, navembiquina, fenestrina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, ciclofosfamida, uramustina y melfalán.
- 15 La US 2006/0122186 divulga una combinación de imatinib con análogos de mostaza de nitrógeno y su uso contra la CLL.
- 20 La leucemia linfocítica crónica (CLL) es la forma más frecuente de leucemia en adultos que representan el 25% de todas las leucemias (aproximadamente 10.000 nuevos casos de CLL anualmente en los Estados Unidos (EE.UU.)). En los Estados Unidos, el 95% de los casos de CLL son la leucemia fenotipo de células B. Aproximadamente 50% de la CLL, los pacientes son asintomáticos al momento del diagnóstico. La etapa de la enfermedad se correlaciona con el pronóstico; la etapa O que tiene una supervivencia media de > 10 años, mientras que la fase I-II tiene una supervivencia media de 7 años. El tratamiento se inicia usualmente cuando los pacientes son sintomáticos.
- 25 Hay dos grupos principales de fármacos utilizados en el tratamiento de la CLL: (1) agentes alquilantes tales como clorambucil (CLB) o ciclofosfamida y (2) análogos de purina tales como fludarabina. Usualmente, el clorambucil (CLB) fue la terapia inicial estándar, pero la fludarabina y la ciclofosfamida (CTX), ahora se han convertido en el tratamiento de primera línea estándar. Estos agentes conducen a respuestas en el 60-75% de los pacientes. Ensayos recientes de forma aleatoria demostraron una tasa de respuesta más alta para la fludarabina en comparación con el CLB pero ninguna diferencia en la supervivencia. Cualquier agente es aceptable como terapia de primera línea en la CLL. Otros agentes están disponibles para la terapia. Eventualmente, todos los pacientes se vuelven resistentes a los fármacos. No hay una terapia capaz de curar esta enfermedad (Kalil, N. and Cheson, B.D.
- 30 The Oncologist 4:352-369, 1999). PCT/IB 03/05454 divulga que el mesilato de imatinib, el ingrediente activo de Gleevec®, sensibiliza los linfocitos B de CLL frente a CLB. Mientras el imatinib en combinación con el CLB está actualmente en estudio clínico de fase I-II para el tratamiento de la CLL, ahora sorprendentemente se ha encontrado que el nilotinib posee una potencia mayor que el imatinib en la sensibilización de linfocitos de la CLL hacia el CLB. Sin estar obligados por la teoría, encontramos que tanto el nilotinib como el imatinib inhiben de manera similar la
- 35 reparación del ADN relacionada con Rad51 inducida por CLB, pero sólo el nilotinib incrementó la hH2AX inducida por CLB. Análisis de la activación de la caspasa-3 mostró un incremento de las rutas de la apoptosis mediadas por la activación de JNK en células tratadas con CLB en combinación con nilotinib, pero no de imatinib. Por otra parte, la inhibición de c-abl por nilotinib condujo a la sub regulación de la ruta de NFkB involucrada en el mantenimiento de la supervivencia de los linfocitos B de CLL.
- 40 Figura: Efecto sinérgico de nilotinib e imatinib en la citotoxicidad de CLB en linfocitos de pacientes con CLL-B. La evaluación del efecto sinérgico de 1, 5 y 10 µM de nilotinib y de imatinib en la citotoxicidad de CLB fue valorada mediante el ensayo de MTT. El valor  $I < 1$  indica que el CLB más nilotinib o imatinib actúan de manera sinérgica. Cuando el valor es  $I > 1$  los fármacos actúan antagónicamente. \*:  $P < 0.001$ .
- 45 La presente divulgación provee una combinación para uso simultáneo, separado o secuencial que comprende (a) agente que daña el ADN (de acuerdo con la invención clorambucil) y (b) 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida, en la cual los ingredientes activos (a) y (b) están presentes en cada caso en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. La presente divulgación o en el caso de clorambucil la presente invención provee además dicha combinación para uso simultáneo, separado o secuencial. Dicho agente que daña el ADN es un análogo de la mostaza de nitrógeno.
- 50 La presente divulgación provee una combinación que comprende (a) un análogo de mostaza de nitrógeno seleccionado de un grupo que consiste de clorambucil (en las realizaciones de la invención), clornafazina, estramustina, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, navembiquina, fenestrina, prednimustina, trofosfamida, ciclofosfamida, uramustina, melfalán y mostaza de uracilo y (b) 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida, en la cual los ingredientes activos
- 55 (a) y (b) están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. La

presente divulgación (en el caso de las realizaciones de la invención con clorambucil) proporciona, además, dicha combinación para uso simultáneo, separado o secuencial.

5 La presente divulgación provee una combinación que comprende (a) clorambucil, (b) 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-*N*-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida, en la cual los ingredientes activos (a) y (b) están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. La presente invención provee además dicha combinación para uso simultáneo, separado o secuencial.

10 La presente divulgación también provee una combinación que comprende (a) ciclofosfamida, (b) 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-*N*-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida, en la cual los ingredientes activos (a) y (b) están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. La presente divulgación provee además dicha combinación para uso simultáneo, separado o secuencial.

15 La presente divulgación también provee una combinación que comprende (a) fludarabina y (b) 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-*N*-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida, en la cual los ingredientes activos (a) y (b) están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. La presente divulgación provee además dicha combinación para uso simultáneo, separado o secuencial.

20 La presente divulgación informa que una combinación que comprende un análogo de mostaza de nitrógeno seleccionado de CLB, clornafazina, estramustina, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, navembiquina, fenestrina, prednimustina, trofosfamida o mostaza de uracilo, particularmente CLB e nilotinib, puede producir un efecto terapéutico que es mayor que el obtenible mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de bien sea un análogo de mostaza de nitrógeno único, en particular, CLB o nilotinib solo. Más específicamente y de acuerdo con la invención, el nilotinib sensibiliza los linfocitos B de CLL para el tratamiento con CLB.

25 La presente divulgación es pertinente a una combinación para uso simultáneo, separado o secuencial, tal como una preparación combinada o una combinación fija farmacéutica, que comprende (a) un análogo de mostaza de nitrógeno (en las realizaciones de la invención clorambucil) y (b) nilotinib en el cual los ingredientes activos (a) y (b) están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 El término "una preparación combinada", tal como se utiliza aquí define especialmente un "kit de partes" en el sentido de que los asociados de combinación (a) y (b) tal como se definió anteriormente se pueden dosificar independientemente uno del otro o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de los asociados de combinación (a) y (b), es decir, simultáneamente o en diferentes puntos del tiempo. Las partes del kit de partes pueden ser entonces, por ejemplo, administradas simultáneamente o espaciadas cronológicamente, esto es, en diferentes momentos y con igual o diferentes intervalos de tiempo para cualquiera de las partes del kit de partes. Los intervalos de tiempo se escogen de tal forma que el efecto sobre la enfermedad tratada en el uso combinado de las partes es mayor que el efecto que se obtendría por medio del uso únicamente de uno cualquiera de la combinación de los asociados (a) y (b). La relación de las cantidades totales del asociado de combinación (a) con el asociado de combinación (b) para ser administrada en la preparación combinada puede variar, por ejemplo, con el fin de hacer frente a las necesidades de una subpoblación de pacientes a ser tratados o las necesidades del paciente individual, cuyas diferentes necesidades pueden deberse a la edad, sexo, peso corporal, etc. de los pacientes. Preferiblemente, hay al menos un efecto beneficioso, por ejemplo, una mejora mutua del efecto de los asociados de combinación (a) y (b), en particular en las realizaciones de la invención, un sinergismo, por ejemplo, un efecto más que aditivo, efectos ventajosos adicionales, menos efectos secundarios, un efecto terapéutico combinado en una dosificación no efectiva de uno o ambos de los asociados de la combinación (a) y (b), y muy preferiblemente un fuerte sinergismo de los asociados de combinación (a) y (b).

El término "tratamiento" comprende la administración de los asociados de combinación a un animal de sangre caliente en necesidad de tal tratamiento con el objetivo de curar la enfermedad o para efectuar un retraso de la progresión de una enfermedad.

50 El término "retraso de la progresión" tal como se utiliza aquí significa que la progresión de la enfermedad es por lo menos lenta u obstaculizada por el tratamiento y que los pacientes exhiben ratas de supervivencia mayores que los pacientes que no se están tratando o se están tratando con la monoterapia.

55 El término "análogo de mostaza de nitrógeno", tal como se entiende comúnmente por un experto en la técnica, se refiere a un agente de quimioterapia citotóxica el cual no alquila específicamente el ADN. Preferiblemente, el término "análogo de mostaza de nitrógeno" se refiere a un grupo de compuestos, que incluye, pero no se limita a CLB (en las realizaciones de la invención), clornafazina, estramustina, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, navembiquina, fenestrina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo ciclofosfamida, uramustina, y melfalán.

El término "leucemia linfocítica crónica resistente al clorambucil" tal como se utiliza aquí define especialmente una leucemia linfocítica crónica en la cual el CLB ya no es eficiente o muestra una reducción de su eficacia terapéutica.

El CLB se puede preparar de acuerdo con el proceso descrito en la patente de los Estados Unidos 3,046,301.

5 El 4-Metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil]benzamida también se conoce bajo la denominación pública internacional de "nilotinib". Se puede preparar y administrar como se describe en WO 04/005281.

El nilotinib se puede emplear en la forma de sus mono-hidrato de mono-hidrocloreto como se describe en W02007/015870.

10 La estructura de los agentes activos citados se puede tomar de la edición actual del compendio estándar "The Merck Index" o de bases de datos, por ejemplo, Patentes Internacionales (por ejemplo IMS World Publications). Cualquier persona capacitada en la materia es perfectamente capaz, con base en estas referencias, de fabricar y ensayar las indicaciones farmacéuticas y las propiedades en modelos estándar de ensayo, tanto *in vitro* como *in vivo*.

15 Una combinación como se divulga en la presente invención, a saber una combinación que comprende (a) el CLB análogo de mostaza de nitrógeno y (b) el nilotinib en el que los ingredientes activos están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable y opcionalmente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, será referida de aquí en adelante como una COMBINACIÓN DE LA INVENCION.

Las COMBINACIONES DE LA INVENCION exhiben efectos beneficiosos en el tratamiento de la CLL. En una forma de realización preferida de la invención, la enfermedad proliferativa a ser tratada con una COMBINACIÓN DE LA INVENCION es la CLL, la cual es resistente a CLB.

20 Sorprendentemente, las COMBINACIONES DE LA INVENCION son también mejor toleradas por los pacientes con CLL que las combinaciones correspondientes que emplean mesilato de imatinib en lugar de nilotinib o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

25 Se puede demostrar por modelos de prueba establecidos que una COMBINACIÓN DE LA INVENCION resulta en los efectos beneficiosos descritos antes aquí. La persona experta en la técnica es perfectamente capaz para seleccionar un modelo de prueba relevante para probar tales efectos beneficiosos. La actividad farmacológica de una COMBINACIÓN DE LA INVENCION puede, por ejemplo, ser demostrada en un estudio clínico o en un procedimiento de prueba como se describe esencialmente aquí más adelante.

30 Estudios clínicos adecuados son en particular estudios paralelos, en forma aleatoria, doble ciegos, en pacientes con CLL con enfermedad en la etapa tardía. Tales estudios son, en particular, adecuados para comparar los efectos de una monoterapia que utiliza los ingredientes activos independientes el uno del otro y una terapia utilizando una COMBINACIÓN DE LA INVENCION, y para probar en particular el sinergismo de los ingredientes activos de las COMBINACIONES DE LA INVENCION. Los puntos finales primarios en tales estudios pueden ser el estado del rendimiento, la Calidad de Vida o el tiempo para la progresión de la enfermedad. En un diseño de estudio adecuado, los pacientes están, por ejemplo, recibiendo por ciclo de tratamiento de 2 semanas, diariamente a una dosis que  
35 varía de 50 a 1000 mg de la nilotinib y CLB en una dosis que varía de 0.2 a 1 mg/kg/día.

Un objetivo de esta invención es proveer una composición farmacéutica que comprende una cantidad, que es conjuntamente terapéuticamente efectiva contra la CLL que comprende la COMBINACIÓN DE LA INVENCION. En esta composición, los asociados para la combinación (a) y (b) pueden ser administrados juntos, uno después del otro o separadamente en una forma de dosificación unitaria combinada o en dos formas de dosificación unitaria separadas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una combinación fija.

40 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden preparar de una manera conocida per se y son aquellas adecuadas para administración enteral, tal como administración oral o rectal, y parenteral a mamíferos (animales de sangre caliente), incluyendo el hombre, que comprende al menos un asociado para la combinación farmacológicamente activa solo o en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, especialmente adecuados para aplicación enteral o parenteral. En una realización de la invención, uno o más de los  
45 ingredientes activos son administrados por vía oral.

En particular, una cantidad terapéuticamente efectiva de cada uno de los asociados de combinación de la COMBINACIÓN DE LA INVENCION puede administrarse simultáneamente o secuencialmente y en cualquier orden, y los componentes pueden administrarse separadamente o como una combinación fija. Por ejemplo, un método para  
50 retrasar la progresión o tratamiento de la CLL de acuerdo con la presente invención puede comprender (i) administración del primer asociados de combinación en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable y (ii) administración del segundo asociado para la combinación en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden, en cantidades de manera sinérgica efectivas, por ejemplo, en dosis diarias que corresponden a las cantidades descritas aquí. Los asociados de combinación individuales de la

COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN se pueden administrar por separado en diferentes momentos durante el curso de la terapia o concurrentemente en formas de combinación dividida o individual. Además, el término administrar también abarca el uso de un profármaco de un asociado para la combinación que convierte *in vivo* al asociado para la combinación como tal. Se debe entender por lo tanto que la presente invención abarca a todos los regímenes de tratamiento simultáneo o alternante y el término “administración” se debe interpretar en consecuencia.

La dosis efectiva de cada uno de los asociados de combinación empleados en la COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN puede variar dependiendo de la composición o compuesto farmacéutico particular empleado, el modo de administración, la etapa de la CLL que está siendo tratada y la severidad de la condición que está siendo tratada. Por lo tanto, el régimen de dosificación de la COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN es seleccionado de acuerdo con una variedad de factores que incluyen la ruta de administración y la función renal y hepática del paciente. Un médico, clínico o veterinario de experiencia normal puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva de los ingredientes activos individuales requeridos para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la condición. La precisión óptima en el logro de la concentración de los ingredientes activos dentro del rango que produce eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad de los ingredientes activos en los sitios objetivo. Esto implica una consideración de la distribución, equilibrio y eliminación de los ingredientes activos.

El CLB se puede administrar en un rango de dosis de 0.1 a 1 mg/kg/día, preferiblemente en un rango de dosis de 0.2 a 0.8 mg/kg/día. Lo más preferiblemente, el CLB se administra a una dosis de 0.6 mg/kg/día. Dependiendo de la especie, edad, condición individual, modo de administración, y el cuadro clínico en cuestión, dosis diarias de aproximadamente 50 a 1000 mg de nilotinib se administran a los animales de sangre caliente de aproximadamente 70 kg de peso corporal.

La divulgación se refiere también a un método para la administración a un sujeto humano que padece CLL, nilotinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Cuando los asociados de combinación empleados en la COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN se aplican en la forma tal como se comercializa tal como fármacos únicos, su dosificación y modo de administración pueden tener lugar de acuerdo con la información proporcionada en el prospecto del paquete del respectivo fármaco comercializado con el fin de dar por resultado el efecto beneficioso descrito aquí, si aquí no se menciona lo contrario.

La COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN puede ser una preparación combinada o una composición farmacéutica.

Adicionalmente, la presente divulgación es pertinente con el uso de una COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN para el tratamiento de la CLL y (de acuerdo con la invención) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la CLL.

Adicionalmente, la presente invención es pertinente con el uso de CLB en combinación con nilotinib para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la CLL.

Además, la presente invención provee un empaque comercial que comprende como ingredientes activos la COMBINACIÓN DE LA INVENCIÓN, junto con instrucciones para uso simultáneo, separado o secuencial de los mismos en el tratamiento de la CLL.

#### **Ejemplo I:** El Nilotinib sensibiliza linfocitos de la CLL frente a CLB

##### A-Material y Métodos

A-1) Aislamiento de la CLL. Los Linfocitos y Linfocitos de cultivo de células se aíslan de la sangre periférica de pacientes con CLL mediante sedimentación por centrifugación en Ficoll Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suecia) como se describió previamente (Christodoulopoulos G. et al., Cancer Research, 1999, 5:2178-84). Las alícuotas que contienen  $1 \times 10^6$  células/ml se envían para análisis de linfocitos T. El porcentaje de contaminación de los linfocitos T se determina utilizando análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia con anticuerpos CD3. El porcentaje de contaminación de linfocitos T en nuestra población (expresada como una media  $\pm$  SE) es  $6.4 \pm 1.8$ . La línea celular WSU es una línea de células linfocítica B derivada de un paciente de CLL (Mohammad R.M., et al., Leukemia, 1996, 10:130-7).

A-2) Eficiencia y dosificación del blindaje. Los linfocitos y linfocitos de WSU de CLL se siembran en placas de 96 pozos en suspensiones de 200  $\mu$ l que contienen  $1.5 \times 10^6$  linfocitos/ml y  $1.25 \times 10^5$  células/ml, respectivamente, en RPMI suplementado con 10% de FBS. Solamente son analizadas las respuestas de dosis con eficiencias de blindaje lineales. Los linfocitos entonces son incubados a 37°C en la presencia de diversas concentraciones de nilotinib solo (0-100  $\mu$ M), CLB solo (0-100  $\mu$ M), o diversas concentraciones de ambos fármacos juntos.

A-3) Ensayo citotóxico. El ensayo de MTT se realizó 72 horas después del blindaje tal como se describe antes de la adición de 20  $\mu$ l de una solución de MTT 5 mg/ml (3 (Christodoulopoulos G et al., Cancer Research, 1998, 58:1789-92.) (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]2,5-difeniltetrazolo bromuro)) en la media de RPMI a cada pozo. La LD<sub>50</sub> de CLB solo,

nilotinib solo o CLB en la presencia de nilotinib se define como ser la concentración de fármaco requerida para reducir la lectura de la absorbancia a 50% del valor de control. El porcentaje de células supervivientes tras el tratamiento respecto a las células tratadas con vehículo (control) es calculado como (células tratadas OD/células sin tratar OD)x100. La sinergia es determinada por la fórmula:  $a/A + b/B = 1$  donde a es la concentración de CLB requerida para producir 50% de los valores de control en combinación con el nilotinib a una concentración de b; A es la concentración de CLB que produce un LD<sub>50</sub> sin nilotinib; y B es la concentración de nilotinib que produce un LD<sub>50</sub> en la ausencia de CLB. Según la fórmula, cuando  $I < 1$  la interacción es de manera sinérgica, cuando  $I = 1$ , la interacción es aditiva, y cuando  $I > 1$  hay una interacción antagonista.

A-4) Análisis estadístico. Las diferencias entre los valores medios son evaluadas por dos test t de cola. La correlación y el análisis de regresión lineal se realizan utilizando el Paquete de la Herramienta Estadística de EXCEL

#### Resultados

El nilotinib poseía mayor potencia que el imatinib en la sensibilización de linfocitos de la CLL (16/19 muestras) con respecto al clorambucil.

#### Ejemplo II

Pacientes. Veintiún pacientes con un diagnóstico de CLL-B seguido en el Jewish General Hospital de Montreal se enrolaron en el estudio después del consentimiento informado. Los pacientes fueron bien sea clínicamente sin tratar (n = 13) o tratados con CLB (n = 8) para varios períodos de tiempo.

Ensayo de citotoxicidad. Se aislaron linfocitos de la sangre periférica utilizando Ficoll-Hypaque (Pharmacia). La contaminación de linfocitos T en la población aislada de linfocitos B fue  $2.30 \pm 2.07$  (expresada como una media  $\% \pm$  S.D. y determinada por análisis de citometría de flujo). Los linfocitos de la CLL ( $3 \times 10^6$  células/ml) se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con FBS al 10% y se incubaron en presencia de diversas concentraciones (0-100  $\mu$ M) de imatinib (Novartis), nilotinib (Novartis), clorambucil solo (Sigma-Aldrich Co), o en combinación como se indicó. Las muestras de control se incubaron con el mayor volumen de DMSO. El ensayo de MTT se realizó 72 horas después del tratamiento como se describió anteriormente (Christodouloupoulos et al, Cancer Res, 58: 1789-1792, 199835). La sinergia se determinó por la fórmula:  $a/A + b/B = I$ , donde A es el IC<sub>50</sub> de CLB (concentración que resulta en 50% de control) en combinación con imatinib o nilotinib a una concentración de b; A es el IC<sub>50</sub> de CLB sin imatinib o nilotinib; y B es el imatinib o el IC<sub>50</sub> de nilotinib en la ausencia de CLB. De acuerdo con la fórmula, cuando  $I < 1$ , la interacción es sinérgica, cuando  $I = 1$ , la interacción es aditiva, y cuando  $I > 1$  hay una interacción antagonista.

Análisis estadístico. El análisis estadístico por ANOVA y la prueba t se realizaron con el software SigmaStat (Systat Software Inc., San Jose, CA, EE.UU.).

#### Resultados

Tanto los inhibidores de c-abl sensibilizan los linfocitos B de CLL frente a clorambucil

Un total de 21 pacientes con CLL se enrolaron en este estudio. Trece pacientes fueron no tratados clínicamente (pacientes 1 a 13) y ocho habían recibido tratamiento previo con clorambucil (pacientes tratados 14 al 21). Su edad media era de 72 años (rango de 45 a 90 años) y su mediana del conteo de WBC fue  $83.7 \times 10^9$  células/litro (rango  $32.87 \times 10^9$  a  $256.27 \times 10^9$  células/litro).

El ensayo de MTT se utilizó para determinar la citotoxicidad del CLB solo, el imatinib solo, nilotinib solo o la combinación de CLB con imatinib o nilotinib 1, 5 o 10  $\mu$ M en los linfocitos de los pacientes con CLL.

Cuando se utilizó a 1, 5 o 10  $\mu$ M, el nilotinib sensibilizó (efecto sinérgico más aditivo) los linfocitos de la CLL frente a CLB en el 84.6%, 100% y 90,5% de los pacientes a prueba, respectivamente, mientras que el imatinib sensibilizó sólo 66.7%, 68.4% y 36.8% de estas muestras frente a CLB en concentraciones similares. De modo interesante, la sensibilización de los linfocitos B de CLL frente a CLB es estadísticamente más potente con 5 o 10  $\mu$ M nilotinib que con imatinib (figura).

Adicionalmente, se seleccionaron cinco de los veintiún pacientes en su capacidad para sensibilizar los linfocitos B de CLL frente a CLB. Utilizando el ensayo de MTT, se evaluó el efecto de nilotinib y de imatinib en la citotoxicidad de CLB de los linfocitos B malignos de estos cinco pacientes. El valor I,  $I < 1$  o  $I > 1$ , indica que el CLB y los inhibidores de c-abl actúan de manera sinérgica o antagonista, respectivamente.

## ES 2 459 877 T3

Tabla:

Paciente	CLB IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Nilotinib IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Imatinib IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CLB + 5 $\mu$ M nilotinib IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Valor de Sinergia I	CLB+5 $\mu$ M imatinib IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Valor de Sinergia I
9	11.68	>100	43.32	8.19	0.70	12.43	1.18
14	8.10	33.16	42.07	<2.5	0.38	6,07	0.87
15	49.69	19.92	37.92	41.06	1.08	66.60	1.47
16	4.54	9.61	14.22	<2,5	0.68	3.51	1.12
18	66.02	28.73	38.35	37.13	0.69	55.56	1.00

Conclusión: ahora demostramos que el nilotinib, un inhibidor de c-abl más potente que el imatinib, tiene una mayor eficacia para crear sinergias de la citotoxicidad de CLB en linfocitos B de CLL.

**REIVINDICACIONES**

1. Una combinación para uso simultáneo, separado o secuencial que comprende (a) un agente que daña el ADN y (b) 4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-N-[5-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-3-(trifluorometil)fenil] benzamida, en la cual los ingredientes activos (a) y (b) están presentes en cada caso en forma libre o en la forma de un sal farmacéuticamente aceptable, y en donde el agente que daña el ADN es clorambucil.
2. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el compuesto (b) es utilizado en la forma de sus monohidrato de monoclóhidrato.
3. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para uso en un método de tratamiento de la leucemia linfocítica crónica.
4. La combinación de acuerdo con la reivindicación 3 en donde el uso es en un método de tratamiento de la leucemia linfocítica crónica que es resistente al clorambucil.
5. Una composición farmacéutica que comprende una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Un empaque comercial que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 junto con instrucciones para uso simultáneo, separado o secuencial del mismo en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica.