

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 358**

51 Int. Cl.:

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2011 E 11748101 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2538944**

54 Título: **Compuesto para el tratamiento de cáncer cerebral**

30 Prioridad:

17.11.2010 US 414882 P

26.02.2010 US 308813 P

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

22.01.2015

73 Titular/es:

**NIKI PHARMA INC. (100.0%)
Suite 5D 80 River Street
Hoboken, New Jersey 07030, US**

72 Inventor/es:

**SHESHBARADARAN, HOOSHMAND;
BAERGA, REBECCA;
COBB, JENEL;
VALIAHDI, SEIED MOJTABA y
KEPPLER, BERNHARD**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 527 358 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

Compuesto para el tratamiento de cáncer cerebral

5 Referencia cruzada a solicitudes en EE UU relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional en EE UU No. 61/308.813 presentada el 26 de febrero de 2010 y la solicitud provisional en EE UU No. 61/414.882 presentada el 17 de noviembre de 2010.

10 Campo de la invención

La presente solicitud se refiere en general a composiciones y compuestos farmacéuticos para su uso en el tratamiento del cáncer, y particularmente a una composición farmacéutica que tiene tris(8-quinolinolato)galio(III), como se define en las reivindicaciones.

15

Antecedentes de la invención

Se estima que hay más de 40.000 casos nuevos de cáncer cerebral cada año en los Estados Unidos solo, y más de 13.000 mueren cada año de esta enfermedad. Aparte de cirugía y terapia de radiación, hay muy pocas opciones de tratamiento. Temozolomida y nitrosourea son los únicos agentes quimioterapéuticos aceptados para el cáncer cerebral, y han mostrado eficacia bastante limitada. Por tanto, hay una necesidad significativa para nuevos agentes en el tratamiento del cáncer cerebral.

20

La publicación de patente en EE UU no. 2009/0137620 divulga que se ha mostrado que el compuesto tris(8-quinolinolato)galio(III) es eficaz en causar apoptosis y muerte celular en líneas celulares de melanoma. Sin embargo, se desconoce si el compuesto es útil en el tratamiento de cáncer cerebral, especialmente los resistentes a otros fármacos anticancerosos.

25

Seied Mojtaba Valiahdí et al., MELANOMA RESEARCH, vol. 19, no. 5, 1 de octubre de 2009, páginas 283-293, divulga que tris(8-quinolinolato)galio(III) (KP46) es eficaz para inducir muerte celular en líneas celulares de glioblastoma de origen astrocítico tal como las líneas celulares T98G y U373.

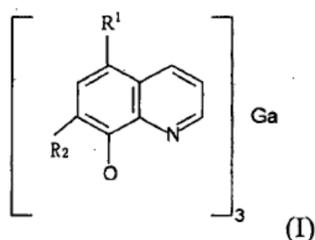
30

Compendio de la invención

La presente invención proporciona las siguientes formas de realización:

35

1. Un compuesto de fórmula (I)



en donde R^1 representa hidrógeno, un halógeno o un grupo sulfono SO_3M , en el que M es un ión metálico, y R^2 representa hidrógeno, o R^1 es Cl y R^2 es I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de cáncer cerebral, en donde dicho cáncer cerebral es un cáncer cerebral resistente, y además en donde dicho cáncer cerebral se trató previamente con BCNU.

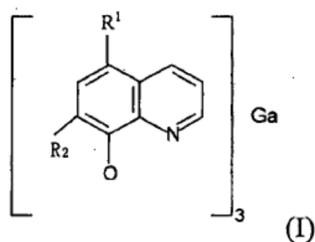
40

2. Uso de un compuesto como se define en la forma de realización 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la producción de un medicamento para el tratamiento del cáncer cerebral, en donde dicho cáncer cerebral es un cáncer cerebral resistente, y además en donde dicho cáncer cerebral se trató previamente con BCNU.

45

3. Un compuesto de fórmula (I)

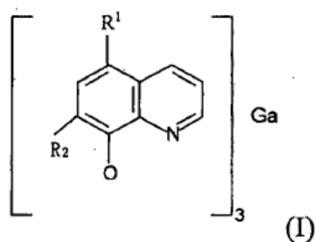
50



en donde R¹ representa hidrógeno, un halógeno o un grupo sulfono SO₃M, en el que M es un ión metálico, y R² representa hidrógeno, o R¹ es Cl y R² es I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de cáncer cerebral, en donde dicho compuesto se va a usar en combinación con temozolomida.

- 5
4. Uso de un compuesto como se define en la forma de realización 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la producción de un medicamento para el tratamiento de cáncer cerebral, en donde dicho compuesto se va a usar en combinación con temozolomida.
- 10
5. El compuesto para uso de la forma de realización 1 o 3 o el uso de la forma de realización 2 o 4, en donde dicho compuesto es tris(8-quinolinolato)galio(III).
- 15
6. El compuesto para uso de cualquiera de las formas de realización 1, 3 y 5 o el uso de cualquiera de las formas de realización 2, 4 y 5, en donde dicho cáncer cerebral no es glioblastoma.
7. El compuesto para uso de cualquiera de las formas de realización 1, 3, 5 y 6 o el uso de cualquiera de las formas de realización 2 y 4 a 6, en donde dicho cáncer cerebral es astrocitoma.
- 20
8. El compuesto para uso de cualquiera de las formas de realización 1, 3 y 5 o el uso de cualquiera de las formas de realización 2, 4 y 5, en donde dicho cáncer cerebral es glioblastoma.
9. El compuesto para uso de cualquiera de las formas de realización 3 a 8 o el uso de cualquiera de las formas de realización 4 a 8, en donde el cáncer cerebral es un cáncer cerebral resistente.
- 25
10. El compuesto para uso de la forma de realización 9 o el uso de la forma de realización 9, en donde dicho cáncer cerebral se trató previamente con BCNU.
11. El compuesto para uso de la forma de realización 9 o el uso de la forma de realización 9, en donde dicho cáncer cerebral se trató previamente con temozolomida.
- 30
12. Un kit que comprende:
una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I)

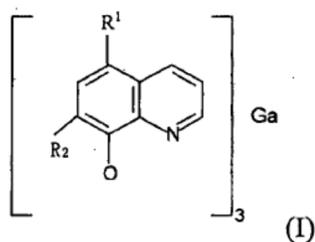
35



en donde R¹ representa hidrógeno, un halógeno o un grupo sulfono SO₃M, en el que M es un ión metálico, y R² representa hidrógeno, o R¹ es Cl y R² es I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad eficaz de temozolomida.

40

13. El kit de la forma de realización 12, en donde dicho compuesto es tris(8-quinolinolato)galio(III).
14. Una composición farmacéutica que comprende: una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I)



en donde R¹ representa hidrógeno, un halógeno o un grupo sulfono SO₃M, en el que M es un ión metálico, y R² representa hidrógeno, o R¹ es Cl y R² es I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad eficaz de temozolomida.

5 15. La composición farmacéutica de la forma de realización 14, en donde dicho compuesto es tris(8-quinolinolato)galio(III).

10 En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto según la fórmula (I) posteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)) para su uso en el tratamiento de un cáncer cerebral resistente, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto según la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)) a un paciente resistente a un tratamiento que comprende al menos BCNU y opcionalmente temozolomida.

15 En otro aspecto, se proporciona un compuesto según la fórmula (I) posteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)) para su uso en el tratamiento de un cáncer cerebral, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tratamiento, simultánea o secuencialmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de (1) el compuesto según la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)), y (2) temozolomida. En formas de realización específicas, la combinación se usa para el tratamiento de glioblastoma o astrocitoma.

20 También se proporciona el uso del compuesto según la fórmula (I) posteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)) para la producción de un medicamento para el tratamiento de cáncer cerebral como se define en las reivindicaciones.

25 Lo anterior y otras ventajas y características de la invención, y la forma en que se logra la misma, serán más fácilmente aparentes tras la consideración de la siguiente descripción detallada de la invención tomada junto con los ejemplos acompañantes, que ilustran formas de realización preferidas y ejemplares.

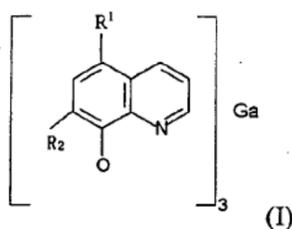
30 Breve descripción de las figuras

La **figura 1** es un gráfico que muestra la inhibición de crecimiento dependiente de la dosis por tris(8-quinolinolato)galio(III) (ensayo de MTT) en un modelo tumoral tridimensional (HuBiogel, Vivo Biosciences, Birmingham, AL) derivado de la línea celular de glioma U87. El eje X es concentración del fármaco en μM y el eje Y es porcentaje del control;

La **figura 2** es un gráfico de índice de combinación que ilustra la actividad de aditiva a sinérgica entre tris(8-quinolinolato)galio(III) y temozolomida en la línea celular de glioblastoma U251.

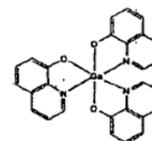
40 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa al menos en parte en el descubrimiento de que el compuesto tris(8-quinolinolato)galio(III) es especialmente eficaz en el tratamiento de cánceres cerebrales. Según esto, según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto según la fórmula (I) posteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)) para su uso en el tratamiento de un cáncer cerebral, como se define adicionalmente en las reivindicaciones. El uso comprende tratar un paciente de cáncer cerebral en necesidad de tratamiento con una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de galio de fórmula (I)



en donde R¹ representa hidrógeno, un halógeno o un grupo sulfono SO₃M, en el que M es un ión metálico, y R² representa hidrógeno, o R¹ es Cl y R² es I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en las reivindicaciones. El tumor cerebral es una neoplasia sólida intracraneal en el cerebro o el conducto vertebral central. En una forma de realización, el cáncer cerebral no es glioblastoma. Es decir, la presente invención se dirige al uso de una cantidad eficaz de un compuesto según la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la producción de medicamentos para el tratamiento de un cáncer cerebral en pacientes identificados o diagnosticados como que tienen cáncer cerebral, opcionalmente dicho cáncer cerebral no es glioblastoma, como se define en las reivindicaciones.

En las varias formas de realización de este aspecto de la presente invención, el tratamiento opcionalmente también comprende un paso de diagnosticar o identificar un paciente como que tiene un tumor cerebral. El paciente identificado se trata después con o se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la



presente invención, por ejemplo, tris(8-quinolinolato)gallio(III) que tiene una fórmula: . Se pueden diagnosticar varios cánceres cerebrales en cualquier método de diagnóstico convencional conocido en la técnica incluido IRM, TAC, TEP, biopsia, etc.

Además, también se ha descubierto sorprendentemente que el compuesto tris(8-quinolinolato)gallio(III) es igualmente eficaz en células de cáncer cerebral resistentes a nitrosourea (por ejemplo, bis-cloronitrosourea (BCNU)) o temozolomida. Según esto, otro aspecto de la presente invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento de cáncer cerebral resistente que comprende tratar un paciente identificado como que tiene un cáncer cerebral resistente con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)gallio(III)), en donde el paciente tiene un cáncer cerebral que es resistente a un tratamiento que comprende BCNU.

El término "cáncer cerebral resistente", como se usa en el presente documento se refiere a un cáncer cerebral que bien no logra responder favorablemente a un tratamiento antineoplásico que no incluye un compuesto de fórmula (I), o alternativamente, vuelve a aparecer o recae después de responder favorablemente a un tratamiento antineoplásico que no incluye un compuesto de fórmula (I). Según esto, "un cáncer cerebral resistente a un tratamiento" como se usa en el presente documento significa un cáncer cerebral que no logra responder favorablemente a, o es resistente, al tratamiento, o alternativamente, vuelve a aparecer o recae después de responder favorablemente al tratamiento.

Por tanto, en algunas formas de realización de la presente invención, se usa un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)gallio(III)) para tratar pacientes de cáncer cerebral que tienen un tumor previamente tratado con una pauta de tratamiento que comprende uno o más fármacos tal como nitrosourea (por ejemplo, BCNU) y temozolomida, como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, el compuesto se usa para tratar un paciente de cáncer cerebral que se ha tratado previamente con una pauta de tratamiento que incluye uno o más fármacos tal como BCNU y temozolomida, y cuyo cáncer cerebral se determinó que no respondía a la pauta de tratamiento o que ha desarrollado resistencia a la pauta de tratamiento. En otras formas de realización, el compuesto se usa para tratar un paciente de cáncer cerebral previamente tratado con un tratamiento que comprende uno o más fármacos tal como BCNU y temozolomida, pero el cáncer cerebral ha vuelto a aparecer o recaído, es decir, un paciente de cáncer cerebral que se ha tratado previamente con uno o más de tales fármacos y cuyo cáncer cerebral inicialmente respondió a uno o más de tales fármacos previamente administrados, pero que posteriormente se encontró que había recaído.

En formas de realización específicas, se usa un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)gallio(III)) para tratar pacientes de cáncer cerebral previamente tratados con BCNU.

En aún otras formas de realización específicas, se usa un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)gallio(III)) para tratar pacientes de cáncer cerebral previamente tratados con temozolomida, es decir, que tienen un cáncer cerebral que muestra resistencia a, o recaída después de, un tratamiento que incluye temozolomida, como se define en las reivindicaciones.

Para detectar un cáncer cerebral resistente, se puede seguir cuidadosamente a los pacientes que se someten al tratamiento inicial para signos de resistencia, insensibilidad o recaída del cáncer cerebral. Esto se puede lograr siguiendo la respuesta al cáncer del paciente al tratamiento inicial que, por ejemplo, puede incluir nitrosourea o temozolomida. La respuesta, falta de respuesta o recaída del cáncer al tratamiento inicial se puede determinar por cualquier método adecuado practicado en la técnica. Por ejemplo, esto se puede lograr mediante la evaluación del tamaño y número de tumores. Un aumento en el tamaño tumoral o, alternativamente, en el número de tumores, indica que el tumor no responde a la quimioterapia, o que se ha producido una recaída. La determinación se puede hacer según los criterios "RECIST" como se describe en detalle en Therasse et al, J. Natl. Cancer Inst. 92: 205-216 (2000).

Además, se ha descubierto sorprendentemente que la combinación de tris(8-quinolinolato)galio(III) y temozolomida proporcionó una sinergia significativa en producir apoptosis en células de glioblastoma. Por tanto, la presente invención también proporciona una terapia de combinación, en la que se usan juntos temozolomida y el compuesto de fórmula (I) (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)) en la misma pauta de tratamiento. Es decir, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de cáncer cerebral, que comprende administrar a un paciente de cáncer cerebral en necesidad de tratamiento, simultánea o secuencialmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de (1) el compuesto según la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)), y (2) temozolomida. También se puede incluir opcionalmente una cantidad eficaz de fármacos adicionales tales como bevacizumab, nitrosourea y procarbacin en la terapia de combinación y administrar al paciente de cáncer cerebral. En formas de realización específicas, la combinación se usa para el tratamiento de glioblastoma multiforme (GBM) o astrocitoma anaplásico. En formas de realización preferidas, el complejo de galio es tris(8-quinolinolato)galio(III) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los varios aspectos de la presente invención pueden ser útiles en varias neoplasias malignas cerebrales incluyendo neuroma acústico, astrocitoma (por ejemplo, astrocitoma pilocítico, astrocitoma de grado bajo, astrocitoma anaplásico), glioblastoma multiforme (GBM) y otros gliomas (glioma de tronco encefálico, glioma de nervio óptico, ependimoma, glioma mezclado, glioma del nervio óptico, oligodendroglioma, y subependimoma), cordoma, linfoma del SNC, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, tumores hipofisarios, neuroectodérmico primitivo (NETP), schwannoma, tumor pineal y tumor rabdoide.

Como se usa en el presente documento, la frase "tratar... con..." o una paráfrasis de la misma significa administrar un compuesto al paciente o causar la formación de compuesto dentro del cuerpo del paciente.

Según la presente invención y como se define en las reivindicaciones, el cáncer cerebral se puede tratar con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)) solo como un único agente, o alternativamente en combinación con uno u otros más agentes anticancerosos.

Los compuestos farmacéuticos de fórmula (I) se pueden administrar a través de inyección intravenosa o administración oral o cualquier otro medio adecuado en una cantidad desde 0,1 mg hasta 1000 mg por kg de peso corporal del paciente basado en el peso corporal total. Los principios activos se pueden administrar a intervalos predeterminados de tiempo, por ejemplo, tres veces al día. Se debe entender que los intervalos de dosis mostrados anteriormente son ejemplares solo y no se pretende que limiten el ámbito de esta invención. La cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo puede variar con factores que incluyen, pero no se limitan a, la actividad del compuesto usado, la estabilidad del principio activo en el cuerpo del paciente, la gravedad de las afecciones que se van a aliviar, el peso total del paciente tratado, la vía de administración, la facilidad de absorción, distribución y excreción del principio activo por el cuerpo, la edad y sensibilidad del paciente que se va a tratar, y similares, como será aparente para el experto en la materia. La cantidad de administración se puede ajustar según cambian los diferentes factores a lo largo del tiempo.

Según la presente invención, se proporciona un uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)) para la producción de un medicamento útil para el tratamiento de cáncer cerebral solo o en combinación de temozolomida, como se define en las reivindicaciones. El medicamento puede estar, por ejemplo, en una forma oral o inyectable, por ejemplo, adecuada para la administración intravenosa, intradérmica o intramuscular. Las formas inyectables generalmente se conocen en la técnica, por ejemplo, en solución tamponada o suspensión.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit farmacéutico que comprende en un envase una forma farmacéutica unitaria de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)), y opcionalmente instrucciones para usar el kit según la presente invención, por ejemplo, tratamiento de cáncer cerebral o tratamiento de cáncer cerebral resistente, como se define en las reivindicaciones. En una forma de realización, se proporciona un kit farmacéutico que comprende en un envase compartimentado (1) una forma farmacéutica unitaria de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)); y (2) una forma farmacéutica unitaria de

temozolomida. Como será aparente para el experto en la materia, la cantidad de un compuesto terapéutico en la forma farmacéutica unitaria está determinada por las dosis que se van a usar en un paciente según la presente invención. En el kit, un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)) puede estar en forma de un comprimido en una cantidad de, por ejemplo, 1 mg. La temozolomida que se va a usar en la terapia de combinación y está incluida en el kit puede estar en cualquier forma farmacéutica en general conocida o usada en la técnica, por ejemplo, comprimido, cápsula, una forma liofilizada para la reconstitución de una forma inyectable, etc. Opcionalmente, el kit comprende además instrucciones para usar el kit en la terapia de combinación según la presente invención.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz de (1) un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)); y (2) temozolomida. La composición farmacéutica puede estar en cualquier forma posológica farmacéuticamente aceptable incluyendo comprimido, cápsula, una forma liofilizada para la reconstitución de una forma inyectable, solución o suspensión, etc. La cantidad de los fármacos que se van a incluir en la composición puede variar y depende de la cantidad que se va a administrar a un paciente. Por ejemplo, se puede incluir el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, tris(8-quinolinolato)galio(III)) en la composición en una cantidad desde 1 mg hasta aproximadamente 1000 mg, y la temozolomida puede estar a 5 mg, 20 mg, 100 mg, 140 mg, 180 mg o 250 mg.

Ejemplo 1

Para probar las actividades de tris(8-quinolinolato)galio(III) ("fármaco"), se realizaron ensayos de MTT usando líneas celulares de glioblastoma. Las células se sembraron (2×10^3 células en 100 μ l/pocillo) en placas de 96 pocillos y se dejaron recuperar durante 24 horas. El fármaco se añadió en otros 100 μ l de medio de crecimiento y se dejó incubar con las células cultivadas durante 3 horas antes de sustituir el medio de cultivo celular para eliminar el fármaco. Se midió la muerte celular 72 horas después de la incubación inicial mediante el ensayo de MTT según las recomendaciones del fabricante (EZ4U, Biomedica, Viena, Austria). Las líneas celulares ensayadas y los valores de CI_{50} (concentración de fármaco con inhibición del crecimiento del 50%) se resumen en la tabla 1. Tris(8-quinolinolato)galio(III) era eficaz en inducir muerte celular en todas las líneas celulares en la tabla 1 con valores de CI_{50} que varían desde aproximadamente 0,3 μ M hasta aproximadamente 2,5 μ M. Los datos históricos sobre la inhibición de las líneas celulares por el fármaco de nitrosourea BCNU se proporcionan en la tabla 1 a continuación. Se indica que tris(8-quinolinolato)galio(III) es activo contra la línea celular U87 que es relativamente resistente a BCNU. Además, tris(8-quinolinolato)galio(III) es activo en células T98G que se ha mostrado que son resistentes a temozolomida. Véase, Kanzawa *et al.*, *J. Neurosurg.*, 99:1047-1052 (2003).

Tabla 1

Línea celular	CI_{50} del fármaco (μ M)	BCNU (% de citostasis con BCNU 50 μ g/ml)*
ACHU	0,3	
T98G	2,0	37,5 \pm 8,6
U87	0,94	18,5 \pm 8,2
U373	2,5	30,4 \pm 8,6

* datos históricos de Bowles *et al.*, *J. Neurosurg.*, 73:248-253 (1990).

Ejemplo 2

Se probó el compuesto tris(8-quinolinolato)galio(III) en un modelo tumoral tridimensional derivado de la línea celular de glioma U87. Específicamente, las células se tripsinizaron, lavaron, contaron por exclusión de azul de tripán. A continuación se prepararon bolas de tumor mezclando 20.000 células/10 μ l de HuBiogel (4 mg/ml) (véase la solicitud de patente en EE UU con número de serie 10/546.506, que se incorpora en el presente documento mediante referencia). Las bolas de tumor tridimensionales se cultivaron durante 72 horas en placas multipocillo con medio completo (SBF al 10%) en un incubador a 37°C + CO₂ al 5%. Se trataron minitumores con varias concentraciones del compuesto de prueba tris(8-quinolinolato)galio(III) en medio (DMSO final al 0,2-03%) o control (DMSO). Se hizo el tratamiento repetido con el fármaco eliminando el medio de cultivo y sustituyéndolo con medio reciente con compuesto fármaco o DMSO. El día 3, se realizaron un ensayo de MTT o tinción de células vivas con Calceína AM (conjunto de 5 bolas/ensayo).

El tris(8-quinolinolato)galio(III) mostró aniquilación de tumor dependiente de la dosis eficaz en tinción de células vivas/análisis por imágenes, e inhibió significativamente la actividad de proliferación tumoral. Véase la figura 1. El análisis estadístico de los conjuntos de datos (media, prueba de la t, GI-50) se realizó usando el programa MS-Excel. El resultado de la prueba de la t se muestra en la tabla 2 a continuación. La GI-50 media (la concentración de fármaco requerida para la inhibición del crecimiento al 50%) es 0,94 μ m.

Tabla 2

Prueba de la t	Concentración (µM)			
	8	4	2	1
HuBiogel (control frente a experimento)	1,12672E-11	7,18966E-10	3,82139E-11	3,60697E-06
	control frente a 8 µM	control frente a 4 µM	control frente a 2 µM	control frente a 1 µM

Ejemplo 3

5 Actividades de tris(8-quinolinolato)galio(III) en una línea celular de glioblastoma humano resistente a temozolomida y BCNU

Se probaron tris(8-quinolinolato)galio(III) y temozolomida en la línea celular de glioblastoma humano U251 (que es resistente a BCNU, véase, Beljanski et al., *Anticancer Res.*, 13(6A):2301-8 (1993)). Específicamente se llevó a cabo un ensayo de proliferación celular de MTT de ATCC usando la línea celular de glioblastoma U251. Se dejó que cultivos madre crecieran hasta el 70-80% de confluencia para este estudio. Se evaluó la actividad antiproliferativa de tris(8-quinolinolato)galio(III) o temozolomida contra la línea celular *in vitro* usando el ensayo de proliferación celular de MTT de ATCC (número de catálogo 30-1010K). Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%/aire al 95% a 37°C. Las células se trataron con tris(8-quinolinolato)galio(III) o temozolomida a 1.000 µM o una serie de diluciones 4x de las mismas (250 µM, 62,5 µM, etc.). Se eliminaron 100 µl de medio de cada pocillo 72 horas después del tratamiento y se añadieron 10 µl de reactivo MTT a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas y después se añadieron 100 µl de detergente. Las placas se dejaron durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad y se leyeron en un lector de placas usando SoftMax® Pro (versión 5.2, Molecular Devices).

Los datos de absorbancia se analizaron como sigue: los valores de absorbancia se convirtieron a porcentaje del control y se representaron frente a la concentración de agente de prueba para cálculos de CI₅₀ usando SoftMax® Pro (versión 5.2, Molecular Devices). La media de la señal en blanco de la placa se restó de todos los pocillo antes de calcular el porcentaje del control. Los valores de porcentaje del control se calcularon dividiendo los valores de absorbancia para cada pocillo de prueba por la media de control sin fármaco (valores de la columna 11; células + vehículo control) y multiplicando por 100. Los gráficos de la concentración del compuesto frente al porcentaje del control se analizaron usando la ecuación de 4 parámetros para obtener los valores de CI₅₀ y otros parámetros que describen la curva de respuesta a la dosis sigmoideal.

Los valores de CI₅₀ para el agente de prueba se estimaron mediante un ajuste de curva de los datos usando la siguiente ecuación de cuatro parámetros:

$$Y = \frac{\text{Superior} - \text{Inferior}}{1 + (X/CI_{50})^n} + \text{Inferior}$$

en donde "superior" es el % máximo de la absorbancia control (100%), "inferior" es el % mínimo de la absorbancia control a la mayor concentración del agente (hasta cero), Y es la absorbancia del porcentaje del control, X es la concentración del agente de prueba, CI₅₀ es la concentración del agente que inhibe el crecimiento celular en un 50% comparado con las células control, n es la pendiente de la curva.

La CI₅₀ de tris(8-quinolinolato)galio(III) en la línea celular U251 fue 4,04 µM mientras que la CI₅₀ de temozolomida fue 283 µM y la de BCNU fue 53,7 µM. Por tanto, tris(8-quinolinolato)galio(III) es eficaz en células de glioblastoma resistentes de temozolomida o BCNU.

Ejemplo 4

Estudios de combinación

Se cultivaron células de la línea celular de glioblastoma humano U251 en las condiciones descritas en el ejemplo 3. Las células se subcultivaron regularmente para mantener el crecimiento en fase logarítmica. El día de la siembra en placa de CE₅₀, las células se procesaron y sembraron en placas tratadas de cultivo celular de 96 pocillos una línea celular cada vez. Las células se eliminaron de sus botellas de cultivo usando solución de tripsina se juntaron en un tubo cónico estéril y se centrifugaron a 350xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células precipitadas se resuspendieron en medio completo y después se contaron con un hemocitómetro de Neubauer Bright-Line® y tinción de viabilidad con azul de tripán. Las suspensiones de células se diluyeron (basado en los recuentos de células vivas) usando medio completo para dar una densidad en la suspensión final (células/ml) basada en densidades de siembra previamente determinadas para cada línea celular durante un ensayo en placa de 96 pocillo de 72 horas. Las placas tratadas para cultivo celular para el ensayo de CE₅₀ se sembraron a 1,5 x 10³ células/pocillo, y se incubaron durante la noche a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, aire al 95% para dejar que las células se adhieran.

Preparación del agente de prueba: Para cada agente único o combinación de agentes de prueba, la mezcla de concentración superior (concentración de tratamiento final 2x) se hizo en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml estériles y después se transfirió directamente al primer pocillo de las placas de dilución de tratamiento.

5 Se obtuvo tris(8-quinolinolato)galio(III) de Niiki Pharma, Inc. La temozolomida fue fabricada por Schering Corporation y suministrada en un vial de vidrio ámbar. Se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente y sellada con Parafilm® para limitar la exposición a la luz y la humedad. Se pesó temozolomida (20,7 mg) y se hizo una suspensión turbia, blanca 400 mM añadiendo 149 µl de DMSO al 100% y breve sonicación (~ 10-20 segundos) en un baño de agua de sonicación sin calor.

10 La actividad antiproliferativa de los agentes de prueba se evaluó usando en kit de ensayo de proliferación celular de MTT (ATCC número de catálogo 30-1010K). Se sembraron células en la fase logarítmica de crecimiento a la densidad indicada en placas de cultivo tratadas de 96 pocillos en 0,1 ml de medio completo en todos los pocillos excepto una columna reservada para el medio control solo. Las células se dejaron adherir durante una incubación de toda la noche antes del tratamiento con los agentes de prueba. Los agentes de prueba se diluyeron en serie en medio de cultivo completo (+ DMSO al 1% donde era apropiado) y se añadieron a cada pocillo en un volumen de 0,1 ml para un volumen final total de 0,2 ml/pocillo (DMSO final al 0,5%, donde se usó). Las células se expusieron a los agentes de prueba durante 72 horas. Después de la exposición de los agentes de prueba, se retiraron cuidadosamente 0,1 ml de sobrenadante de cultivo de todos los pocillos de cada placa y se añadieron a cada pocillo 20 0,01 ml de reactivo MTT. Las placas se devolvieron al incubador durante cuatro horas. Después del periodo de incubación, se añadió el reactivo detergente suministrado en el kit (0,1 ml) a todos los pocillos. Las placas se envolvieron en plástico para prevenir la evaporación y se dejaron reposar a temperatura ambiente en la oscuridad durante la noche. Se midió la absorbancia a 570 nm al día siguiente usando un lector de placas SpectraMAX Plus (Molecular Devices). Los valores de absorbancia se convirtieron en porcentaje del control y se representaron frente a 25 las concentraciones del agente de prueba para cálculos de la CE_{50} usando SoftMax® Pro (versión 5.2, Molecular Devices). La media de la señal en blanco de la placa se restó de todos los pocillo antes de calcular el porcentaje del control. Los valores de porcentaje del control se calcularon dividiendo los valores de absorbancia para cada pocillo de prueba por la media de control sin fármaco (valores de la columna 11; células + vehículo control) y multiplicando por 100. Los gráficos de la concentración del compuesto frente al porcentaje del control se analizaron usando la 30 ecuación de 4 parámetros para obtener los valores de CE_{50} y otros parámetros que describen la curva de respuesta a la dosis sigmoidal.

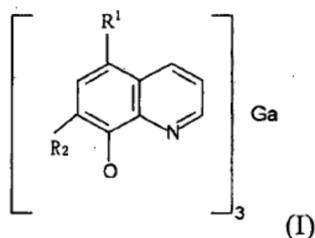
Los datos de combinación se analizaron usando el software CompuSyn® para calcular los valores del índice de combinación (IC) para evaluar la sinergia. Se calculó la afección fraccional (Af) a partir del porcentaje del control (de 35 SoftMax® Pro) usando la fórmula: $1 - (\text{porcentaje del control}/100)$. Se introdujeron la dosis, afectación fraccional y proporción molar de los compuestos ensayados en combinación en el software CompuSyn® para la evaluación de la presencia/ausencia de sinergia. CompuSyn® asigna un valor de índice de combinación (IC) que estima el nivel de afección de los compuestos en proliferación. Valores de IC por debajo de 1 indican la presencia de sinergia y valores de IC por encima de 1 indican antagonismo. Los valores de IC cercanos a 1 indican afección aditiva. Véase, Chou, 40 *Pharmacol. Rev.*, 58(3):621-81 (2006). La combinación de tris(8-quinolinolato)galio(III) y temozolomida tenía un IC de 0,812 en células U251, lo que indica una combinación sinérgica.

La **figura 2** es un gráfico de índice de combinación que ilustra la actividad de aditiva a sinérgica entre tris(8-quinolinolato)galio(III) y temozolomida en la línea celular de glioblastoma U251.

45

REIVINDICACIONES

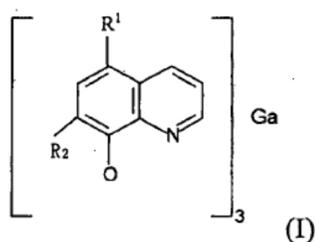
1. Un compuesto de fórmula (I)



en donde R^1 representa hidrógeno, un halógeno o un grupo sulfono SO_3M , en el que M es un ión metálico, y R^2 representa hidrógeno, o R^1 es Cl y R^2 es I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de cáncer cerebral, en donde dicho cáncer cerebral es un cáncer cerebral resistente, y además en donde dicho cáncer cerebral se trató previamente con BCNU (bis-cloronitrosourea).

2. Uso de un compuesto como se define en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la producción de un medicamento para el tratamiento de cáncer cerebral, en donde dicho cáncer cerebral es un cáncer cerebral resistente, y además en donde dicho cáncer cerebral se trató previamente con BCNU (bis-cloronitrosourea).

3. Un compuesto de fórmula (I)



en donde R^1 representa hidrógeno, un halógeno o un grupo sulfono SO_3M , en el que M es un ión metálico, y R^2 representa hidrógeno, o R^1 es Cl y R^2 es I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de cáncer cerebral, en donde dicho compuesto se va a usar en combinación con temozolomida.

4. Uso de un compuesto como se define en la reivindicación 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la producción de un medicamento para el tratamiento de cáncer cerebral, en donde dicho compuesto se va a usar en combinación con temozolomida.

5. El compuesto para uso de la reivindicación 1 o 3 o el uso de la reivindicación 2 o 4, en donde dicho compuesto es tris(8-quinolinolato)galio(III).

6. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 5 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 y 5, en donde dicho cáncer cerebral no es glioblastoma.

7. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 y 6 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 6, en donde dicho cáncer cerebral es astrocitoma.

8. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 5 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 y 5, en donde dicho cáncer cerebral es glioblastoma.

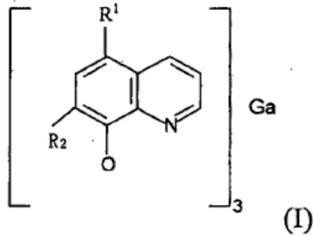
9. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde el cáncer cerebral es un cáncer cerebral resistente.

10. El compuesto para uso de la reivindicación 9 o el uso de la reivindicación 9, en donde dicho cáncer cerebral se trató previamente con BCNU.

11. El compuesto para uso de la reivindicación 9 o el uso de la reivindicación 9, en donde dicho cáncer cerebral se trató previamente con temozolomida.

12. Un kit que comprende:

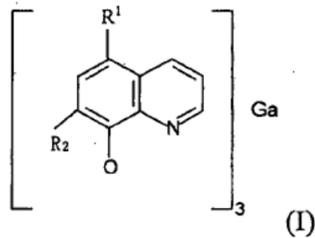
una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I)



5 en donde R¹ representa hidrógeno, un halógeno o un grupo sulfono SO₃M, en el que M es un ión metálico, y R² representa hidrógeno, o R¹ es Cl y R² es I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad eficaz de temozolomida.

10 13. El kit de la reivindicación 12, en donde dicho compuesto es tris(8-quinolinolato)galio(III).

14. Una composición farmacéutica que comprende: una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I)



15 en donde R¹ representa hidrógeno, un halógeno o un grupo sulfono SO₃M, en el que M es un ión metálico, y R² representa hidrógeno, o R¹ es Cl y R² es I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una cantidad eficaz de temozolomida.

20 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde dicho compuesto es tris(8-quinolinolato)galio(III).

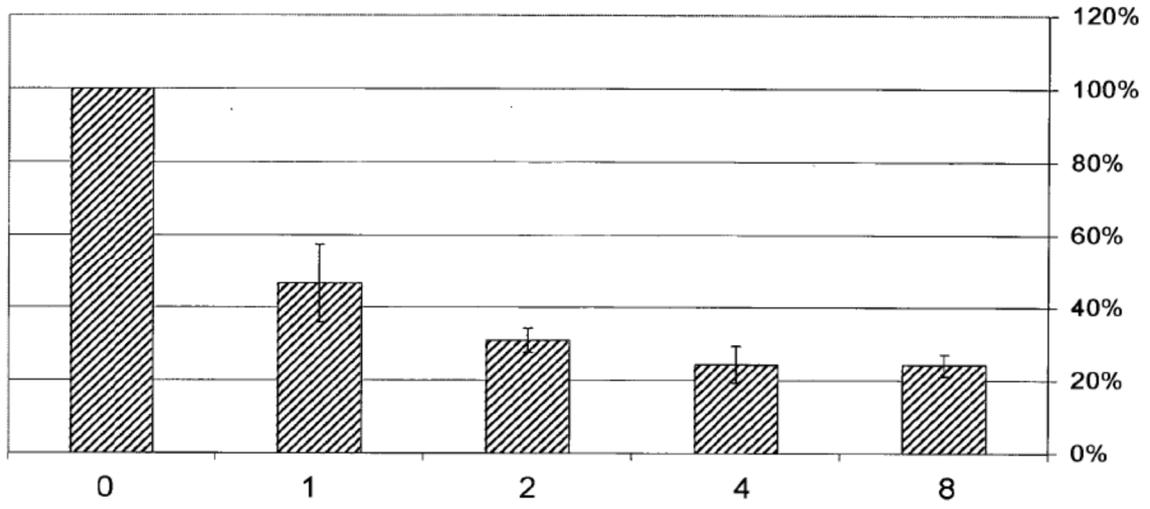


Figura 1

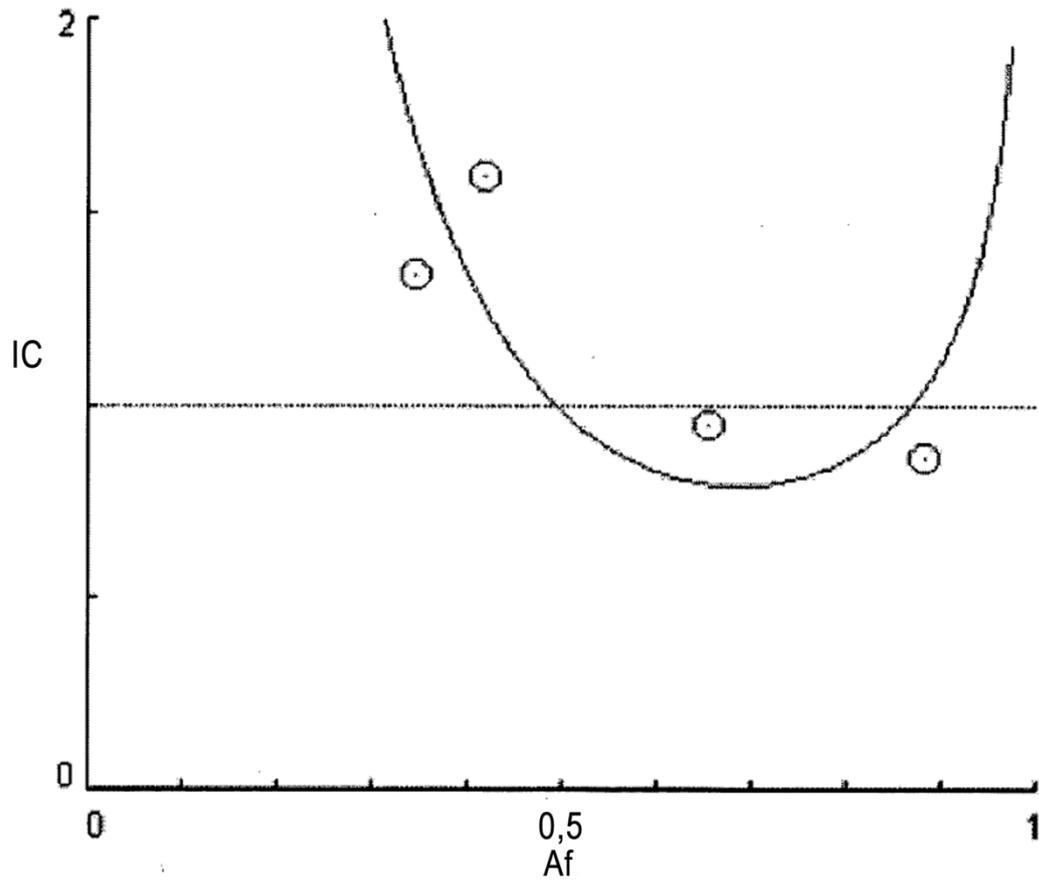


Figura 2