

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 407**

51 Int. Cl.:

A61B 5/055 (2006.01)

A61K 31/4015 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01)

A61K 51/04 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2011 E 11751125 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2542155**

54 Título: **Procedimiento de imaginología de una enfermedad**

30 Prioridad:

01.03.2010 US 309030 P

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

25.01.2016

73 Titular/es:

**TAU THERAPEUTICS LLC (100.0%)
600 E. Water Street, Suite E
Charlottesville, Virginia 22902, US**

72 Inventor/es:

GRAY, LLOYD S.

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 557 407 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

Procedimiento de imaginología de una enfermedad

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La imaginología convencional del cáncer es inexacta e imprecisa. Típicamente, se inyecta en el sistema circulatorio de un paciente un marcador, u otro compuesto químico, se espera aproximadamente 1 hora y se toman entonces imágenes usando tomografía de emisión de positrones (TEP). El marco temporal de 1 hora es bastante corto y puede no ser representativo de la actividad general del número total de células cancerosas.

La razón por la que la imaginología convencional del cáncer es inexacta e imprecisa es porque, en parte, la captación metabólica de un marcador de imaginología tiene un mecanismo de acción específico del ciclo celular. Más específicamente la captación del marcador de imaginología es función de en cuál parte del ciclo estén las células diana. Durante cualquier hora dada, que es el tiempo de espera típico entre la administración del marcador y la imaginología, las células cancerosas de las que tomar imágenes pueden estar en cualquier etapa del ciclo celular y pueden captar y absorber el marcador a diferentes índices y cantidades. Esta variación, que existe entre todas las células cancerosas por todo el paciente, puede causar resultados engañosos y diagnósticos inapropiados.

El ciclo celular es la serie de eventos que ocurren en una célula que conducen a su división y duplicación. En células eucarióticas, el ciclo puede dividirse en dos periodos, interfase y mitosis. El tránsito entre estos dos periodos del ciclo celular es conocido como proliferación. Durante la interfase, la célula crece, acumula nutrientes necesarios para la mitosis y duplica su ADN. Durante la mitosis, la célula se escinde en dos células hija distintas. La interfase incluye tres fases distintas, la fase de intervalo 1 (G_1), la fase S y la fase de intervalo 2 (G_2), mientras que la mitosis incluye dos procesos. La fase G_1 incluye el aumento de tamaño de la célula, el aumento de las actividades biosintéticas de la célula y la síntesis de las enzimas necesarias para la replicación de ADN en la siguiente etapa. La fase S incluye el inicio de la síntesis de ADN y la replicación de todos los cromosomas, La fase G_2 dura hasta que la célula entra en mitosis e incluye la síntesis de proteína que incluye la producción de microtúbulos para mitosis. La mitosis incluye un proceso en que los cromosomas de la célula se dividen entre las dos células hija y un proceso de citocinesis en que el citoplasma de la célula original se divide formando dos células hija distintas. El ciclo celular incluye también una fase de reposo, a la que se hace referencia típicamente como G_0 . Se hace referencia a los límites entre las diversas fases, por ejemplo el límite entre la fase G_1 y S, como un punto de control del ciclo celular.

Puede inhibirse la progresión del ciclo celular, de modo que una célula particular detenga el ciclo en un punto, un punto de control celular, antes de proceder a la siguiente fase. Los puntos de control celular están localizados entre las diferentes fases del ciclo celular, estando dos de los puntos de control en la interfase entre la fase G_1 y S (G_1/S) y en la interfase entre la fase G_2 y M. Un inhibidor del ciclo celular puede detener la progresión de una célula de pasar a la siguiente fase, por ejemplo una célula puede inhibirse en el punto de control del ciclo celular G_1/S , lo que fuerza a la célula a permanecer en la fase G_1 hasta que se retira el inhibidor.

En cualquier población de células cancerosas particulares o tumor de un individuo, la longitud del ciclo celular es variable. Esta variabilidad es debida a los diferentes periodos pasados en G_1 o G_0 , mientras que el periodo de tiempo desde el inicio de la fase S al final de la fase M es relativamente constante.

La imaginología usando marcadores tradicionales se basa en la captación aumentada del marcador debido a la actividad metabólica aumentada de las células cancerosas. Esta captación aumentada es más evidente una vez las células cancerosas están en la fase S, en contraposición a las demás etapas del ciclo celular. Si la mayoría de las células cancerosas de las que tomar imágenes no están en la fase S durante el intervalo de tiempo de típicamente 1 hora entre la administración y la imaginología, el resultado de la imagen puede no ser representativo de la concentración y localización reales de células cancerosas.

El documento W02008018642 se refiere a los genes humanos A7322 y F3374, cuya expresión se eleva notablemente en cáncer de mama, y a su uso, por ejemplo, en el diagnóstico de cáncer de mama, y como moléculas diana para desarrollar fármacos contra el cáncer de mama. La publicación presenta procedimientos de cribado de moduladores de la actividad de cinasa de PBK/TOPK y de cribado de agentes para prevenir o tratar cáncer, tal como cáncer de mama, y menciona el bloqueo del ciclo celular en la fase S temprana con afidicolina.

HONG FRANK D *et al.*, *Carcinogenesis*, vol. 20, nº 7, julio de 1999 (1999-07), páginas 1161-1168, reseña que Taxol, vincristina o nocodazol inducen mortalidad en células U373MG de astrocitoma humano defectivas del punto de control G1 al desencadenar la progresión hiperploide y menciona la sincronización de las células con hidroxiurea.

El documento W002092127 se refiere a procedimientos terapéuticos que comprenden administrar anticuerpos anti-CD26 para la prevención y el tratamiento de cánceres y enfermedades inmunitarias asociadas a la expresión de CD26.

Lo que se desea es un tratamiento para detener el ciclo celular en una fracción clínicamente relevante de células en

el punto de control celular G₁/S, de modo que pueda potenciarse la eficacia de los marcadores de imaginología.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona un procedimiento de imaginología de una enfermedad o afección en un mamífero, que comprende las etapas de:

- a) administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de canal de calcio de tipo T que inhibe la proliferación de células eucarióticas al inhibir la progresión del ciclo celular a través del punto de control entre las fases G₁ y S;
- 10 b) detener la administración del inhibidor de canal de calcio de tipo T durante un periodo de tiempo para permitir a las células que se han acumulado en el punto de control G₁/S entrar en la fase S del ciclo celular;
- c) administrar posteriormente un marcador de imaginología al mamífero; y
- 15 d) tomar imágenes del mamífero con un aparato de imaginología.

Se definen aspectos adicionales de la invención en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La Figura 1 es una representación esquemática del ciclo celular. El anillo externo incluye las etapas de interfase (I) y mitosis (M), exagerándose la duración de la mitosis con relación a las demás fases. El anillo interno incluye las fases de intervalo 1 (G₁), intervalo 2 (G₂) y síntesis (S). No se muestra la fase de intervalo 0 (G₀) o de reposo.

25 La Figura 2 es una representación gráfica de la capacidad de varios agentes químicos de inhibir el flujo de entrada de calcio en comparación con la capacidad del mismo agente químico de inhibir la proliferación celular.

La Figura 3 es una representación esquemática del ciclo celular y de la influencia que tienen varios bloqueantes de canal de calcio sobre la progresión del ciclo celular.

30 La Figura 4 es una representación gráfica de los datos que miden el impacto del mibefradilo sobre los ciclos celulares.

35 La Figura 5 es una representación gráfica de los datos que miden el impacto del mibefradilo sobre los ciclos celulares.

La Figura 6 es una representación gráfica de los datos que miden la captación de un marcador de imaginología después de la administración de mibefradilo.

40 La Figura 7 es una representación gráfica de los datos que miden la captación de un marcador de imaginología después de la administración de mibefradilo.

DEFINICIONES

45 En la descripción y reivindicación de la invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones expuestas a continuación.

50 Como se usa en la presente memoria, el término "portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los portadores farmacéuticos estándares, tales como solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua o agua/aceite y diversos tipos de agentes humectantes. El término engloba también cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de EE.UU. o enumerado en la Farmacopea de EE.UU. para uso en animales, incluyendo seres humanos.

55 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto de la presente invención que mejora, atenúa, reduce o elimina una enfermedad o afección particular o que previene o retarda el inicio de una enfermedad o afección particular.

60 Se pretende hacer referencia con "mamífero" a todos los mamíferos, incluyendo por ejemplo primates tales como seres humanos y monos. Son ejemplos de otros mamíferos incluidos en la presente memoria conejos, perros, gatos, bovinos, cabras, ovejas, ratones, ratas y caballos. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano femenino o masculino.

65 La expresión "afección precancerosa" hace referencia a un crecimiento que no es maligno pero que es probable que se convierta si no se trata. Una "afección precancerosa" es también conocida como "afección premaligna" por un especialista en la materia.

Se entiende por un especialista en la materia que los "bloqueantes de canal de calcio de tipo T" son también

conocidos como "inhibidores de canal de calcio de tipo T".

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 El procedimiento de imaginología de una enfermedad o afección en un mamífero incluye varias etapas. El procedimiento puede realizarse por muchas razones, incluyendo el diagnóstico de una posible enfermedad o afección, el cribado del impacto de diversos tratamientos y la monitorización de la progresión del tratamiento. Basándose en las imágenes generadas por el procedimiento descrito, un profesional sanitario puede determinar más fácilmente un diagnóstico, el impacto de un tratamiento y la progresión de un tratamiento actual.

10 El procedimiento puede usarse para tomar imágenes de diversas enfermedades o afecciones, incluyendo angina inestable, hipertensión, epilepsia, dolor neuropático, convulsiones epilépticas, convulsiones de ausencia, degeneración macular relacionada con la edad, cáncer y afecciones precancerosas. En otras realizaciones, el procedimiento puede usarse para tomar imágenes de tumores y tumores precancerosos.

15 En el procedimiento de imaginología de una enfermedad o afección, se administra en primer lugar un inhibidor del ciclo celular, que es un inhibidor de canal de calcio de tipo T, en una cantidad terapéuticamente eficaz para detener la proliferación de células eucarióticas en el punto de control celular entre las fases G₁ y S (G₁/S). Se determinan duraciones variables del ciclo celular predominantemente por el tiempo pasado en la fase G₁. Las duraciones de las fases S, G₂ y M son relativamente invariables. Debido a esto, cualquier célula particular de una población residirá en G₁ durante un periodo de tiempo antes de que la célula entre en la fase S del ciclo celular. Para detener el paso continuo del ciclo celular por un punto de control del ciclo celular, puede administrarse un inhibidor del ciclo celular.

20 La administración de un inhibidor del ciclo celular causa la proliferación asincrónica de células cancerosas en una población acumulada en G₁/S a medida que proceden por el ciclo celular, debido a que su capacidad de proceder hasta la fase S se detiene por el inhibidor del ciclo celular. Para que una célula se desplace de la fase G₁ a la fase S a través del punto de control del ciclo celular, la célula requiere el flujo de entrada de calcio extracelular para desencadenar cascadas bioquímicas que son necesarias para la progresión. La retirada del calcio del medio extracelular bloquea el tránsito del ciclo celular para cada célula. Por tanto, cada célula continúa en la fase G₁ siempre que esté en presencia de calcio extracelular, pero se fija en el sitio cuando se alcanza G₁/S sin calcio, sincronizando así las células en G₁/S. El flujo de entrada de calcio en una célula es necesario para la proliferación y tránsito a través del ciclo celular. Esto se describe además en el ejemplo 1 siguiente.

25 La administración del inhibidor del ciclo celular aumenta el porcentaje de células en G₁/S. Para aprovechar el aumento de células en G₁/S, se continúa la administración del inhibidor del ciclo celular al mamífero durante un periodo de tiempo antes de la imaginología. Este periodo de tiempo puede estar entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 10 días, inclusive. En otra realización, este periodo de tiempo puede estar entre aproximadamente 5 días y aproximadamente 7 días, inclusive. Aunque los límites superiores de estas realizaciones son de 10 días y 7 días, el inhibidor del ciclo celular puede administrarse durante periodos más largos de tiempo. La dosificación del inhibidor del ciclo celular crea una concentración en el plasma de un mamífero de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 10 µM.

35 El inhibidor del ciclo celular puede administrarse mediante varias vías, incluyendo parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, por supositorio, transdérmica, tópica u oral. La administración oral del inhibidor del ciclo celular es la más preferida. Puede administrarse una administración oral en forma de unidad de dosificación, típicamente una píldora o cápsula, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

40 El inhibidor del ciclo celular es un inhibidor de canal de calcio de tipo T, por ejemplo mibefradilo. Se dan a conocer también en la presente memoria efonidipina, etosuxamida, TTL-1177 (un compuesto registrado descrito en la referencia: Gray, L.S., Pérez-Reyes, E., Gomora, J.C., Haverstick, D.M., Shattock, M., McLatchie, L., Harper, J., Brooks, G., Heady, T. y MacDonald, T.L. (2004) *Cell Calcium* 36, 489-497) y níquel.

45 Estos inhibidores del ciclo celular inhiben el flujo de entrada de calcio extracelular en la célula, lo que es crítico para una serie de procesos celulares vitales. El calcio necesario para estos procesos proviene del medio extracelular mediante flujo de entrada a través de canales de calcio. Los canales de calcio se agrupan en varias familias basadas en el análisis de secuencia, características biofísicas y sensibilidad farmacológica. Entre estas, está la familia de canales de calcio de tipo T. Estos canales de calcio se han implicado en la regulación de la presión sanguínea, el ritmo cardiaco y la proliferación celular. Los estudios sugieren también que los canales de calcio de tipo T pueden desempeñar un papel importante en la degeneración macular relacionada con la edad. Se ha probado que al menos un agente farmacológico, el mibefradilo, es clínicamente eficaz debido a la inhibición de la función del canal T. Los inhibidores de la entrada de calcio son útiles para tratar hipertensión, arritmia cardiaca y proliferación celular dañina.

50 Los canales de calcio de tipo T están presentes en células, líneas celulares y específicamente líneas celulares cancerosas. Específicamente, se ha mostrado que la isoforma Cav3.2 de canales de calcio de tipo T se expresa aberrantemente en tejido de cáncer de mama en comparación con tejido de mama adyacente normal en mujeres japonesas, como se discute en la referencia Asaga, S., Ueda, M., Jinno, H., Kikuchi, K., Itano, O., Ikeda, R. y

Kitajima, M. (2006) *Anticancer Res.* 26, 35-42.

Los inhibidores del ciclo celular detienen eficazmente la proliferación de células eucarióticas en los puntos de control del ciclo celular, incluyendo G₁/S, lo que se explica además en los ejemplos 2-4 siguientes.

Posteriormente a la administración del inhibidor del ciclo celular, se administra un marcador de imagenología que está orientado a captarse en la fase S del ciclo celular. El periodo entre la primera administración del inhibidor del ciclo celular y el marcador de imagenología permite la acumulación de células en G₁/S del ciclo celular. Este procedimiento aumenta el porcentaje de células que están en fase S, aumentando así la captación del marcador de imagenología en estas células.

Posteriormente a la administración del inhibidor del ciclo celular, hay un periodo durante el que se no se añade inhibidor del ciclo celular. Este periodo puede oscilar de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 72 horas. Este periodo permite que las células que se han acumulado en G₁/S entren en la fase S del ciclo celular. Se habrá acumulado en G₁/S de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 25 % de las células. El aumento del número de células en la fase S hace a la dosis administrada posterior de marcador de imagenología más eficaz, debido a que un gran porcentaje de células captarán el marcador de imagenología en cada dosis.

Posteriormente al periodo en que no se añade inhibidor del ciclo celular, se administra un marcador de imagenología para captar o absorber por células en fase S. El marcador de imagenología específico estará dictado por la experiencia clínica del especialista en la materia, tomando imágenes de diferentes enfermedades con diferentes marcadores de imagenología. Se capta la misma dosis de marcador de imagenología más fácil y más específicamente en comparación con un marcador de imagenología cuando se usa solo. El aumento del marcador de imagenología que se capta se describe además en el ejemplo 5 siguiente.

Las células cancerosas pueden estar localizadas en el ser vivo al administrar una sustancia que se une a canales de calcio de tipo T o proteínas accesorias de canal de calcio de tipo T. La localización del fármaco en el cuerpo puede determinarse marcándolo con sustancias que sean detectables desde fuera del cuerpo. Por ejemplo, los átomos radiactivos pueden localizarse en el cuerpo mediante medidas tomadas fuera y los ejemplos de dichos átomos útiles con este fin incluyen ^{99m}Tc, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸F, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ³H, ⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga y ¹⁶F, entre otros. Algunos de los ejemplos de los muchos marcadores de imagenología posibles incluyen ¹¹C-metionina, 2-desoxi-2-(¹⁸F)fluoro-D-glucosa (FDG), FDG tritizada (³H-FDG) y fluorodesoxitimidinas tales como [¹⁸F]-3'-fluoro-3'-desoxi-L-timidina). Adicionalmente, el deuterio por ejemplo, puede localizarse de forma similar usando resonancia magnética nuclear (RMN) y se localizan diversos tintes, tanto fluorescentes como no fluorescentes, usando técnicas ópticas. Adicionalmente, pueden combinarse uno o más marcadores de imagenología y administrarse al mamífero antes de la imagenología del mamífero.

La administración de un inhibidor del ciclo celular seguida de la detención de esa administración permite un mayor porcentaje de células en una fase particular del ciclo. Diversas actividades metabólicas celulares proceden en diferentes extensiones en las diversas fases del ciclo celular. Al alterar la proporción de células cancerosas en una fase particular del ciclo celular, una proporción alterada exhibirá las actividades metabólicas más características de esa fase. Es un ejemplo de un marcador de imagenología la FDG, que se acumula en células que requieren esta fuente de energía para el estado metabólico particular en el que están. Por tanto, la imagenología de FDG desde fuera del cuerpo localizaría aquellas células cancerosas que respondían a agentes activos de canal de calcio de tipo T por una alteración en la fracción de las células en aquella parte del ciclo celular más necesitada de glucosa. Debido a que, como ejemplo, las células cancerosas expresan preferentemente la función de canal de calcio de tipo T en comparación con células no cancerosas, las células cancerosas se afectarán preferentemente por los agentes orientados a calcio de tipo T y se detectarán.

Después de administrar el marcador de imagenología al mamífero, se toman entonces imágenes al mamífero. El marcador de imagenología puede administrarse a cualquier dosis adecuada, por ejemplo de aproximadamente 100 mBq a aproximadamente 600 mBq. Pueden tomarse imágenes del mamífero usando cualquier aparato de imagenología adecuado, por ejemplo un aparato capaz de reunir una imagen de resonancia magnética (IRM), un tomograma de emisión de positrones (TEP) o un tomograma computerizado (TAC). Las imágenes recogidas por un aparato de imagenología adecuado serán más sensibles que las imágenes tomadas de mamíferos sin pretratamiento de un inhibidor del ciclo celular. Los escáneres tomados después de la administración de inhibidores del ciclo celular serán más sensibles debido a que las células enfermas tendrán una mayor captación de los marcadores de imagenología en comparación con la captación de marcadores de imagenología de células sin la administración de un inhibidor del ciclo celular.

El procedimiento descrito anteriormente puede repetirse como se desee para cada caso en que se vaya a tomar imágenes del mamífero. Por ejemplo, después de que el mamífero reciba las administraciones de inhibidor del ciclo celular y la administración detenida del inhibidor del ciclo celular, se administró un marcador de imagenología y se tomaron imágenes; y el mamífero puede empezar de nuevo entonces el proceso recibiendo otra administración de un inhibidor del ciclo celular. Este procedimiento puede repetirse las veces que se desee, según los requisitos y consejos de un profesional sanitario cualificado.

El procedimiento anteriormente descrito no es solo útil para imaginología de enfermedades y afecciones tales como cáncer durante el tratamiento o diagnóstico, el procedimiento anteriormente descrito podría usarse para ayudar a cribar cuáles tipos de tumores están más y menos afectados por bloqueantes de canal de calcio de tipo T y cuáles tipos de tumores están más y menos afectados por un tratamiento. Por ejemplo, los bloqueantes de canal de calcio de tipo T son variablemente eficaces en la detención del ciclo celular basándose en el tipo de tumor al que se orienten. Por ejemplo, un tumor de cáncer pancreático puede reaccionar diferentemente en comparación con un tumor pancreático en respuesta a una dosificación de bloqueantes de canal de calcio de tipo T. Usando el régimen anteriormente descrito para cribar, puede determinarse cuáles tipos de tumores responden más eficazmente al régimen y cuáles tipos de tumores no responden tan eficazmente al régimen. Esta información puede determinarse para cada individuo antes de experimentar un régimen de tratamiento, y puede usarse para planear el régimen de tratamiento del modo más eficaz y ventajoso.

Ejemplo 1

Para medir la correspondencia entre la inhibición del flujo de entrada de calcio y la proliferación, se representó la capacidad de varios agentes químicos de inhibir el flujo de entrada de calcio frente a la capacidad del mismo agente de inhibir la proliferación, como puede observarse en la FIG. 2 siguiente. Estos agentes eran entidades químicas registradas sintetizadas en la Universidad de Virginia. Se obtuvo una línea de correlación de mínimos cuadrados con una pendiente de 0,98 y un valor de R^2 de 0,92. Convencionalmente, no puede usarse una correlación para inferir causalidad pero, en este caso, se garantiza un enfoque bayesiano debido a que el flujo de entrada de calcio es necesario *a priori* para la proliferación, de tal modo que bloquear la entrada de calcio bloquearía correspondientemente la proliferación. Una línea de regresión con una pendiente muy cercana a 1 significa que esencialmente toda la variación en las variables está explicada por la variación de las otras, lo que significa que no hay ninguna acción de estos agentes sobre la proliferación distinta de la inhibición de la entrada de calcio.

Ejemplo 2

Se efectuó el análisis del ciclo celular usando citometría de flujo y tinción con BUdR. En la FIG. 3, "Con" representa células de control no tratadas. Todos los demás cultivos celulares se trataron con nocodazol, que interfiere con la polimerización de microtúbulos y bloquea el ciclo celular durante la fase M. El tratamiento de células A10 con nocodazol solo bloqueaba el tránsito del ciclo celular a través de la fase M como se determina por citometría de flujo. Debido que las células A10 residen principalmente en el punto de control del ciclo celular entre G_0 y G_1 (véase "Con" en la FIG. 3), evaluar la posibilidad de que un agente farmacológico inhiba el tránsito de esa fase no es tan directo como determinar el bloqueo en otros puntos de control del ciclo celular. Por lo tanto, se trataron los cultivos celulares durante 24 horas con los bloqueantes de canal de calcio T mibefradilo (mib), níquel (Ni) o TTL-1177 (un compuesto registrado poseído por la cesionaria Tau Therapeutics), antes de añadir nocodazol. Ausente el efecto sobre los bloqueantes de canal T, las células se fijarían en el punto de control del ciclo celular entre G_2 y M por el nocodazol, como sucedía con células tratadas con el mismo solo. En lugar de ello, el tratamiento con los bloqueantes de canal de calcio de tipo T detenía las células en el punto de control del ciclo celular entre G_0 y G_1 y prevenía la acumulación en el punto de control del ciclo celular entre G_2 y M que habría resultado de otro modo por el nocodazol. Esto muestra que los bloqueantes de canal de calcio de tipo T detienen las células del ciclo en G_1/S .

Ejemplo 3

Para medir la eficacia del inhibidor del ciclo celular mibefradilo en la detención de la progresión a través del ciclo celular, se incubaron células de cáncer de pulmón humanas de la línea celular A549 y células de cáncer de próstata humanas de línea celular con mibefradilo 10 μM durante 48 horas (M48H). Como puede observarse en la FIG. 4, el mibefradilo aumentaba la proporción de células en la fase G_1 del ciclo celular, no permitiendo la progresión a la fase S para ambas líneas celulares. Se recogieron datos adicionales incubando las mismas líneas celulares con mibefradilo 10 μM durante 18 horas, seguido de un lavado de 12 horas, seguido de otra incubación de 8 horas con mibefradilo (M18-12-18h). Estos resultados muestran también una mayor proporción de células en la fase G_1 en comparación con las células de control no incubadas con mibefradilo.

Ejemplo 4

Para medir el efecto del mibefradilo sobre el ciclo celular de células de cáncer de próstata humanas de la línea celular PC3, se incubaron células PC3 con concentraciones variables de mibefradilo durante tiempos variables. Se incubaron las células PC3 con una concentración 5 μM o una concentración 10 μM durante 24 horas o 48 horas. Como puede observarse en la FIG. 5, un aumento en la concentración y el tiempo de contacto del mibefradilo aumenta la proporción de células en la fase G_1 .

Ejemplo 5

Se determinó la eficacia de la captación de marcadores de imaginología después del tratamiento con un inhibidor del ciclo celular. Se incubaron en primer lugar durante 24 horas células de cáncer de colon humanas, línea celular HT29, con el inhibidor del ciclo celular mibefradilo a concentraciones de 5 μM (5uM-FDG-HT29) y 10 μM (10uM-

FDG-HT29). Después de 24 horas de incubación con mibefradilo, se retiraron las células HT29 del contacto con mibefradilo. Después de 60 minutos de retirar del contacto con mibefradilo, se administró el marcador de imaginología 2-desoxi-2-(¹⁸F)fluoro-D-glucosa (de aquí en adelante "FDG").

5 Como puede observarse en la FIG. 6, la captación del marcador de imaginología FDG en células HT29 aumentó en las células incubadas con mibefradilo en comparación con las células que no se incubaron. Con una concentración de mibefradilo 10 μ M, el aumento de captación de FDG era de aproximadamente un 100 % en comparación con la captación de células no incubadas con mibefradilo.

10 Se determinó también la captación de un marcador de imaginología en células de cáncer de pulmón humanas de la línea celular A549. Se incubaron células A549 con concentraciones 5, 10 y 15 μ M del inhibidor del ciclo celular mibefradilo durante 24 horas. Después de 24 horas de incubación con mibefradilo, se retiraron las células A549 del contacto con mibefradilo. Después de 30 minutos de retirar del contacto con mibefradilo, se administró el marcador de imaginología tritioado FDG (de aquí en adelante "³H-FDG"). Como puede observarse por la FIG. 7, la captación de
15 ³H-FDG era máxima a 5 μ M, observándose un aumento de captación a todas las concentraciones de incubación de mibefradilo. Aunque no se muestra, la incubación de células de cáncer de próstata humanas de la línea celular PC3 con mibefradilo 10 μ M durante 72 horas aumentaba la captación del marcador de imaginología introducido posteriormente en aproximadamente un 60 %.

20 **Ejemplo 6**

Como ejemplo descriptivo, se describirá el procedimiento de imaginología de una enfermedad o afección en un mamífero como se emprendería en un entorno clínico. Inicialmente, se elige un mamífero para tomar imágenes, en esta realización el mamífero es un ser humano. Esta elección puede hacerse basándose en diversos factores,
25 incluyendo el tratamiento pasado de una enfermedad, en esta realización cáncer de próstata, o como una posible confirmación del diagnóstico. El ser humano recibe inicialmente una administración de un inhibidor del ciclo celular a una cantidad terapéuticamente eficaz, en esta realización una píldora oral que suministra una dosificación de mibefradilo dos veces al día durante 6 días antes de una sesión de imaginología programada. Después de administrar 6 días de dosificaciones, cesa la administración de mibefradilo. Después de cesar la administración, hay
30 un periodo de tiempo antes de emprender el procedimiento de imaginología. En este ejemplo, pasan 6 horas entre el cese de la administración de mibefradilo y la administración de un marcador de imaginología, que en este ejemplo es FDG. Después de pasar 6 horas, se inyecta FDG en el ser humano a una dosificación suficiente. Se toman entonces imágenes del ser humano con una TEP. Los datos producidos por la TEP son más precisos y más exactos que los datos disponibles de TEP en la que el paciente no recibía un inhibidor del ciclo celular.
35

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de imaginología de una enfermedad o afección en un mamífero, que comprende las etapas de:
 - 5 (a) administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de canal de calcio de tipo T que inhibe la proliferación de células eucarióticas al inhibir la progresión del ciclo celular a través del punto de control entre la fase G₁ y S;
 - (b) detener la administración del inhibidor de canal de calcio de tipo T durante un periodo de tiempo para permitir que las células que se han acumulado en el punto de control G₁/S entren en la fase S del ciclo celular;
 - 10 (c) administrar posteriormente un marcador de imaginología al mamífero; y
 - (d) tomar imágenes del mamífero con un dispositivo de imaginología.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la enfermedad o afección se selecciona del grupo consistente en angina inestable, hipertensión, epilepsia, dolor neuropático, convulsiones epilépticas, convulsiones de ausencia, degeneración macular relacionada con la edad, cáncer y afecciones precancerosas.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la enfermedad o afección es un cáncer o afección precancerosa.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la enfermedad o afección es un tumor canceroso o precanceroso.
- 20 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el mamífero es un ser humano.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el inhibidor de canal de calcio de tipo T es mibefradilo.
- 25 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el marcador de imaginología se selecciona del grupo consistente en ¹¹C-metionina, 2-desoxi-2-(¹⁸F)fluoro-D-glucosa y [¹⁸F]-3'-fluoro-3'-desoxi-L-timidina y combinaciones de las mismas.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el marcador de imaginología es 2-desoxi-2-(¹⁸F)fluoro-D-glucosa.
9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el marcador de imaginología es [¹⁸F]-3'-fluoro-3'-desoxi-L-timidina.
- 35 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el inhibidor de canal de calcio de tipo T se administra durante entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 días, inclusive, antes de detener la administración del inhibidor de canal de calcio de tipo T y administrar posteriormente el agente de imaginología.
- 40 11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el inhibidor de canal de calcio de tipo T se administra durante entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7 días, inclusive, antes de detener la administración del inhibidor de canal de calcio de tipo T y administrar posteriormente el marcador de imaginología.
- 45 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la administración del inhibidor de canal de calcio de tipo T se detiene durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 72 horas antes de la administración del marcador de imaginología.
- 50 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el dispositivo de imaginología se selecciona del grupo consistente en un dispositivo de imaginología de resonancia magnética, un tomógrafo de emisión de positrones y un tomógrafo computerizado.
- 55 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el inhibidor de canal de calcio de tipo T se administra a una concentración en el plasma del mamífero de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 10 μM.
- 60 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el procedimiento de imaginología diagnostica la enfermedad o afección en un mamífero.
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el procedimiento de imaginología criba la eficacia de un tratamiento para tratar la enfermedad o afección.
- 65 17. Un procedimiento según la reivindicación 1 de imaginología de un cáncer en un ser humano, que comprende las etapas de:
 - (a) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de mibefradilo, que inhibe la proliferación de células

- eucarióticas al inhibir la progresión del ciclo celular a través del punto de control entre la fase G₁ y S;
- (b) detener la administración de mibefradilo;
 - (c) administrar posteriormente un marcador de imaginología al ser humano; y
 - (d) tomar imágenes del ser humano con un dispositivo de imaginología.

5 18. Un procedimiento según la reivindicación 17, en el que el marcador de imaginología es 2-desoxi-2-(¹⁸F)fluoro-D-glucosa y el dispositivo de imaginología es un tomógrafo de emisión de positrones.

10 19. Un procedimiento de imaginología de una enfermedad o afección según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

- (a) administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de canal de calcio de tipo T durante un periodo de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 días, inclusive;
- (b) detener la administración del inhibidor de canal de calcio de tipo T durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 72 horas
- (c) administrar posteriormente un marcador de imaginología al mamífero; y
- (d) tomar imágenes del mamífero con un dispositivo de imaginología.

15 20. Un procedimiento según la reivindicación 19, en el que el marcador de imaginología es 2-desoxi-2-(¹⁸F)fluoro-D-glucosa y el dispositivo de imaginología es un tomógrafo de emisión de positrones.

20

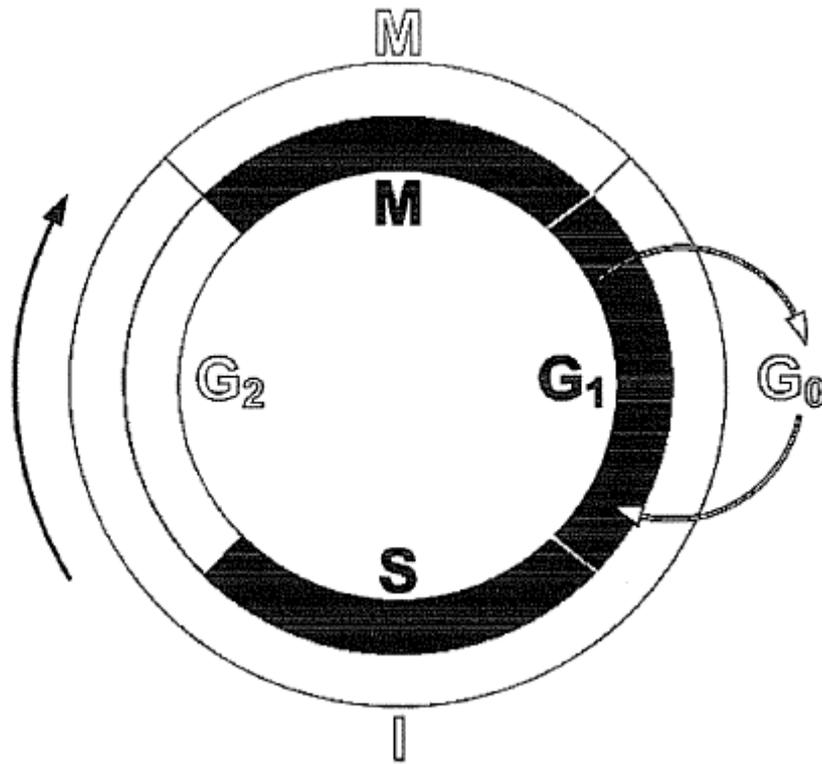


Figura 1

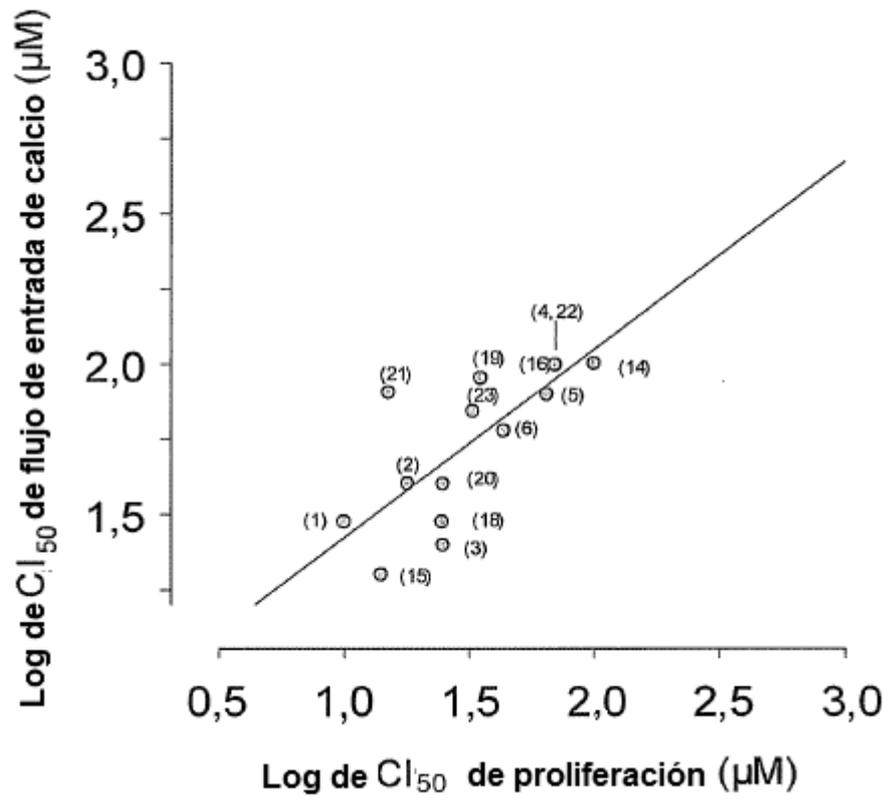


Figura 2

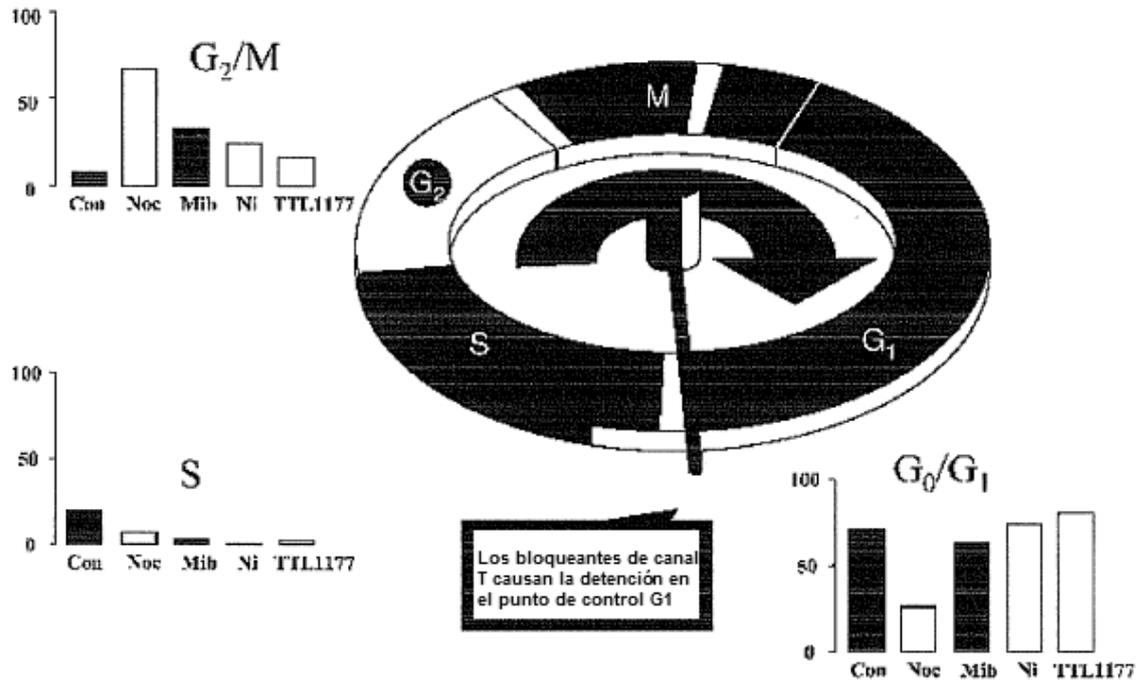


Figura 3

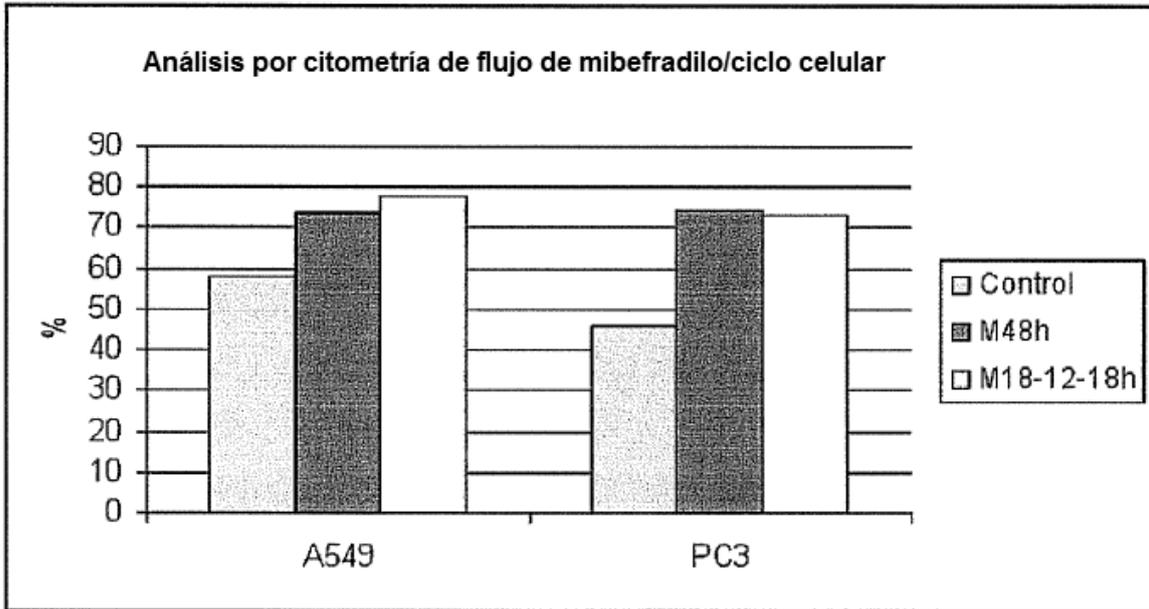


Figura 4

Ciclo celular de fase G1

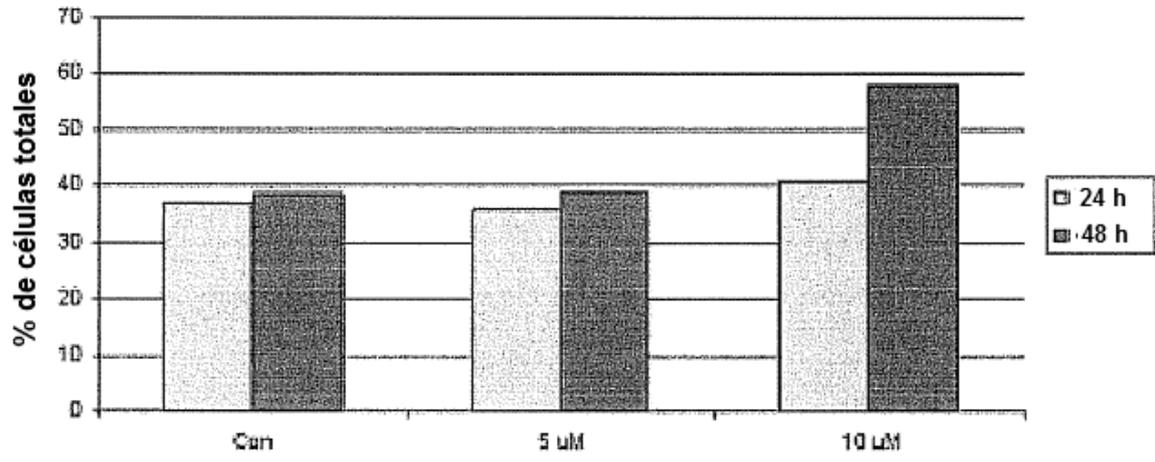


Figura 5

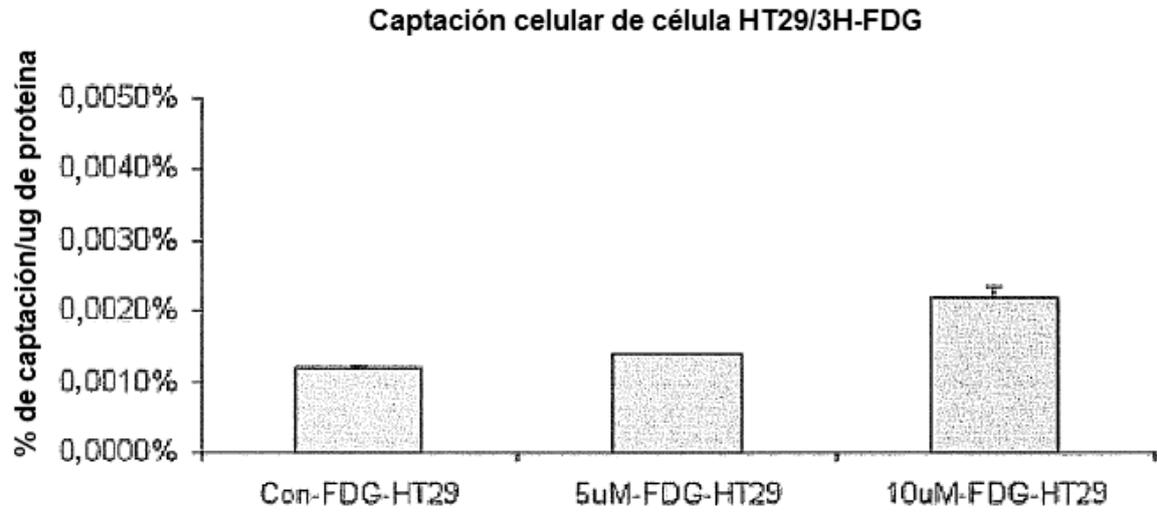


Figura 6

Captación de 3H-FDG de células A549

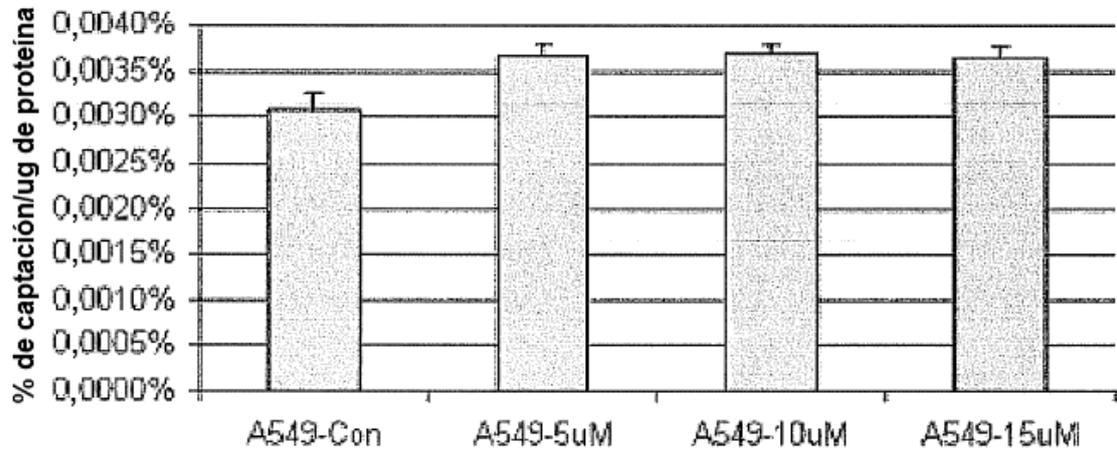


Figura 7