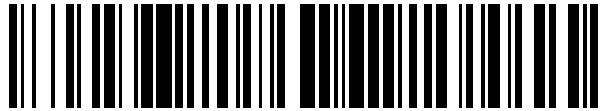


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 778**

51 Int. Cl.:

A61K 31/433 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2009 E 09748884 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 2349259**

54 Título: **Inhibidores de mitosis para incrementar la apoptosis en terapia**

30 Prioridad:

16.10.2008 US 106086 P

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

06.04.2016

73 Titular/es:

**ARRAY BIOPHARMA, INC. (100.0%)
3200 Walnut Street
Boulder, CO 80301, US**

72 Inventor/es:

**TUNQUIST, BRIAN, J.;
WALKER, DUNCAN, H. y
WOESSNER, RICHARD, DONALD**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 565 778 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

Inhibidores de mitosis para incrementar la apoptosis en terapia.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un inhibidor de la mitosis para la administración a un paciente que tiene células patogénicas en un estado de detención mitótica inducida por inhibidor mitótico, para incrementar la apoptosis de las células.

10

Descripción del estado de la técnica

Los inhibidores de la mitosis (también denominados inhibidores mitóticos o antimitóticos) son sustancias terapéuticas importantes para el tratamiento de enfermedades, y se usan en tratamientos para el cáncer, así como agentes contra la gota y antifúngicos, y para tratar la restenosis. Estas sustancias terapéuticas inhibidoras de la mitosis interrumpen la mitosis de manera que la célula ya no se dividirá. En el cáncer, los inhibidores de la mitosis pueden detener el crecimiento canceroso y conducir a la apoptosis o salida de la mitosis seguida de la muerte celular.

15

20

Se conocen muchos inhibidores de la mitosis. Algunos inhibidores de la mitosis son agentes antitubulínicos. Los agentes antitubulínicos actúan sobre la tubulina, una proteína que es necesaria para la mitosis. Los agentes antitubulínicos incluyen alcaloides de la vinca, taxanos y epotilonas. Los inhibidores de la mitosis no dirigidos contra la tubulina también se han investigado como sustancias terapéuticas contra el cáncer. Diferentes inhibidores de la mitosis afectan a diferentes porciones del ciclo celular, y algunas veces otras funciones fuera de la mitosis. Por ejemplo, los agentes antitubulínicos pueden afectar a funciones citoesqueléticas no mitóticas en células que proliferan y en células terminalmente diferenciadas. La neurotoxicidad periférica se ha asociado con agentes tubulínicos. De este modo, diferentes inhibidores de la mitosis pueden tener diferentes toxicidades.

25

30

Los alcaloides de la vinca inhiben la polimerización de los microtúbulos, que inhibe de ese modo la mitosis. Los alcaloides de la vinca incluyen vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina. La vinblastina se ha usado para tratar ciertos tipos de cáncer, incluyendo linfoma de Hodgkin, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama y cáncer testicular. La vincristina se ha usado para tratar ciertos tipos de cáncer, incluyendo linfoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón y leucemia linfoblástica aguda. La vinblastina y la vincristina también se han usado en regímenes paliativos para algunos de los tumores sólidos importantes (véase Wood, Kenneth W., *et al.* "Past and future of the mitotic spindle as an oncology treatment". *Current Opinion in Pharmacology*. Vol. 1, Issue 4 (1 de agosto de 2001): p. 370-377). La vindesina se ha usado para tratar ciertos tipos de cáncer, incluyendo leucemia, linfoma, melanoma, cáncer de mama y cáncer de pulmón. La vinorelbina se ha usado para tratar ciertos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama y cáncer de pulmón no microcítico.

35

40

Los taxanos estabilizan los microtúbulos, inactivando de ese modo la función de los microtúbulos de una célula e inhibiendo la división celular. Los taxanos incluyen paclitaxel (incluyendo Abraxane*) y docetaxel. El paclitaxel se usa para tratar ciertos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de mama, y formas avanzadas de sarcoma de Kaposi. Docetaxel se usa para tratar ciertos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, cáncer ovárico y cáncer de pulmón no microcítico. También están en desarrollo nuevos taxanos, por ejemplo BMS275183 (véase 2006 EJC Poster: Broker, L.E., *et al.* "The novel oral taxanes BMS275183 has a favorable activity and toxicity profile in a twice weekly schedule; Preliminary findings from an extended phase 1 trial." *EJC Supl.* 2006 Abstract 644, p. 194).

45

50

Adicionalmente, la colchicina es un inhibidor de la mitosis que actúa como un agente antitubulínico. La colchicina inhibe la mitosis inhibiendo la polimerización de los microtúbulos. La colchicina se usa para tratar la gota.

55

Las epotilonas son una clase de agentes quimioterapéuticos que estabilizan los microtúbulos con actividad en estirpes celulares cancerosas resistentes a paclitaxel (véase Denduluri, Neelima, *et al.* "Phase II trial of ixabepilone, an epothilone B analog, given daily for three days every three weeks, in metastatic breast cancer." *Invest. New Drugs*. 25 (25 de agosto de 2006): p. 63-67). Las epotilonas incluyen epotilona A, epotilona B, epotilona D, y el análogo de epotilona ixabepilona. Ixabepilona ha sido aprobada para el tratamiento de cáncer de mama metastásico agresivo o localmente avanzado que ya no responde a quimioterapias actualmente disponibles.

60

La dolastatina y análogos de dolastatina son inhibidores de la mitosis. Estos compuestos incluyen dolastatina 10, dolastatina 15, sintadotina (o SYN-D o ILX651; véase 2004 ASCO Abstract No. 3068, Hammond, L.A., *et al.* "Phase (Ph) 1 evaluation of the dolastatin analogue synthadotin (SYN-D; ILX651): Pooled data analysis of three alternate schedules in patients (pts) with advanced solid tumors." *J. Clin. Oncology*. 2004 Suppl. Abstract 3068 14s (2004)), LU103793 y cemadotina.

65

Las Aurora cinasas, incluyendo Aurora A, Aurora B y Aurora C, son serina/treonina cinasas que funcionan en la mitosis. Las Aurora cinasas se han usado como dianas como inhibidores de la mitosis. Aurora A tiene su función en

la profase de la mitosis, y es necesaria para que los centrómeros funcionen correctamente. Aurora B funciona en la fijación del huso mitótico al centrómero. Los inhibidores de Aurora cinasas incluyen AZD-1152, CYC-116, AS-703569 (o R-763), MLN-8054, PHA-739358, AT-9283, SNS-314, AZD-1152-HQPA, MLN-8237, KW-2449, PF-3814735, ENMD-2076 (o ENMD-981693), PHA-739385, MK-0457 (o VX-680) y MK-5108 (o VX-689). Para más, véase: Gautschi, Oliver, *et al.* "Aurora Kinases as Anticancer Drug Targets". Clin. Cancer Res. 14(6) (15 de marzo de 2008): p. 1639-48.

Las cinasas tipo Polo (Plks"), incluyendo cinasa 1 tipo Polo ("Plk1"), cinasa 2 tipo Polo ("Plk2"), cinasa 3 tipo Polo ("Plk3") y cinasa 4 tipo Polo ("Plk4"), están implicadas en la formación y cambios en el huso mitótico y en la activación de complejos de CDK/ciclina durante la mitosis. Las cinasas tipo Polo se han usado como dianas como inhibidores de la mitosis. Los inhibidores de cinasas tipo Polo incluyen ON-01910Na (o ON-1910Na o Onc-01910), BI-2536 (véase: Steegmaier, Martin, *et al.* "BI 2536, a Potent and Selective Inhibitor of Polo-like Kinase 1, Inhibits Tumor Growth In Vivo." Current Biology, 17 (20 de febrero de 2007): p. 316-322) y GSK-61364 (o GSK-461364A).

Las quinesinas son un tipo de proteína motora. Las quinesinas mitóticas son enzimas esenciales para el ensamblaje y función del huso mitótico. Las quinesinas mitóticas desempeñan papeles esenciales durante todas las fases de la mitosis. Durante la mitosis, las quinesinas organizan los microtúbulos en la estructura bipolar que es el huso mitótico. La inhibición de la quinesina mitótica provoca malformación o disfunción del huso mitótico, dando frecuentemente como resultado la detención del ciclo celular y la apoptosis (muerte celular).

Entre las quinesinas mitóticas identificadas está la proteína del huso quinesina ("KSP"). Durante la mitosis, KSP se asocia con los microtúbulos del huso mitótico. La inhibición de KSP evita la separación de los polos del huso durante la prometafase, dando lugar a husos monopolares que provocan la detención mitótica y la inducción de la muerte celular programada. La KSP humana también se denomina HsEg5.

La Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos de América 2006/0100161 describe compuestos que incluyen 2-(3-aminopropil)-5-(3-fluorofenil)-N-(2-metoxietil)-N-metil-2-fenil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamida (aquí en lo sucesivo "Compuesto 1"), 2-(3-aminopropil)-5-(3-fluorofenil)-N-metoxi-N-metil-2-fenil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamida (aquí en lo sucesivo "Compuesto 2"), 2-(3-aminopropil)-5-(2,5-difluorofenil)-N-metoxi-N-metil-2-fenil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamida (aquí en lo sucesivo "Compuesto 3"), (S)-2-(3-aminopropil)-5-(2,5-difluorofenil)-N-metoxi-N-metil-2-fenil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamida (aquí en lo sucesivo "Compuesto 4"), (R)-2-(3-aminopropil)-5-(2,5-difluorofenil)-N-metoxi-N-metil-2-fenil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamida (aquí en lo sucesivo "Compuesto 5"), y 2-(3-aminopropil)-5-(2,5-difluorofenil)-N-hidroxi-N-metil-2-fenil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamida (aquí en lo sucesivo "Compuesto 6"). Los Compuestos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (colectivamente los "inhibidores '161 de KSP") son inhibidores de KSP.

Los inhibidores de KSP incluyen ispinesib (o SB-715992 o CK-0238273; véase 2008 ASCO Poster: "A Phase I-II Open-Label Trial of Ispinesib on an Alternating Dosing Schedule in Chemotherapy-Naive Patients with Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer (MBC)". www.cytokinetics.com/pdf/ASCO2008A.pdf), los inhibidores '161 de KSP, AZD-4877, CRx-026, SB-743921 (SB-921), MK-0731, EMD-534085 y ARQ 621. Ispinesib se ha ensayado en un amplio abanico de tipos tumorales, y se está ensayando en ensayos clínicos humanos.

Entre las otras proteínas motoras que actúan durante la mitosis, los inhibidores de moléculas pequeñas también se han descrito para la proteína E asociada con el centrómero ("CENP-E"). CENP-E es una proteína motora (véase Chan, G.K.T., *et al.* "Characterization of the Kinetochores Binding Domain of CENP-E Reveals Interactions with the Kinetochores Proteins CENP-F and hBUBRI". J. Cell Biology. Vol. 143, No. 1 (5 de octubre de 1998): p. 49-63), y se puede clasificar como un tipo de quinesina motora. Los inhibidores de CENP-E incluyen GSK-295 (o GSK-923295).

Muchos inhibidores de la mitosis se han ensayado como sustancias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades. Algunos inhibidores de la mitosis se han administrado en un programa de una vez al día, ya sea semanalmente, bisemanalmente, mensual, e incluyendo infusiones de 24 horas. Administrando solamente una dosis, los inhibidores de la mitosis pueden no mantener las células en detención mitótica durante un tiempo suficiente para que las células vayan a la apoptosis o salgan de la mitosis y vayan a la muerte celular. También, algunos inhibidores de la mitosis se han administrado dos veces a la semana, tres veces a la semana, o tres veces al mes. La administración de varias dosis durante un período de tiempo más prolongado a menudo disminuye la dosis que los pacientes son capaces de tolerar, y las dosis individuales pueden no alcanzar un nivel biológicamente eficaz.

Sumario de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado que después de que se ha administrado una primera dosis de un inhibidor de la mitosis a un mamífero con células patogénicas, y las células han entrado en detención mitótica, la administración de una segunda dosis del inhibidor de la mitosis uno o dos días después de la primera dosis incrementa la apoptosis o salida de la mitosis, seguido de la muerte celular.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un inhibidor de la mitosis para la administración a un paciente que

tiene células patogénicas en un estado de detención mitótica inducida por inhibidores de la mitosis, para incrementar la apoptosis de las células.

- 5 Otro aspecto de la presente invención proporciona los inhibidores '161 de KSP para la administración a un paciente que tiene células patogénicas en un estado de detención mitótica inducida por el inhibidor '161 de KSP, para incrementar la apoptosis de las células.

Breve descripción de las figuras

- 10 La figura 1 muestra un experimento de lavado de la apoptosis.
- La figura 2 muestra la actividad de caspasa 3/7 a lo largo del tiempo en células HT-29 in vitro.
- La figura 3 muestra la actividad de caspasa 3/7 a lo largo del tiempo en células RPMI 8226 in vitro.
- 15 La figura 4 muestra la cantidad de husos monopolares en xenoinjertos de HT-29 subcutáneos en ratones atímicos en diversos puntos de tiempo para dos calendarios de dosificación diferentes.
- La figura 5 muestra la cantidad de husos monopolares en xenoinjertos de HT-29 subcutáneos en ratones atímicos en diversos puntos de tiempo para dos calendarios de dosificación diferentes.
- 20 La figura 6 muestra el porcentaje de células apoptóticas en xenoinjertos de HT-29 subcutáneos en ratones atímicos en diversos puntos de tiempo para dos calendarios de dosificación diferentes.
- La figura 7 muestra el porcentaje de células apoptóticas en xenoinjertos de HT-29 subcutáneos en ratones atímicos en diversos puntos de tiempo para dos calendarios de dosificación diferentes.
- 25 La figura 8 muestra el porcentaje de células con husos monopolares y husos bipolares en xenoinjertos de HT-29 subcutáneos en ratones atímicos a 24 horas y 48 horas para diversas cantidades de dosis.
- 30 La figura 9 muestra el porcentaje de células apoptóticas en xenoinjertos de HT-29 subcutáneos en ratones atímicos a 24 horas y 48 horas para diversas cantidades de dosis.
- La figura 10 muestra un experimento de inhibición del crecimiento tumoral ("TGI") en ratones atímicos con xenoinjertos de HT-29 subcutáneos.
- 35 La figura 11 muestra un experimento de TGI en ratones atímicos con xenoinjertos de HT-29 subcutáneos.
- La figura 12 muestra un experimento de TGI en ratones atímicos con xenoinjertos de HT-29 subcutáneos.
- 40 La figura 13 muestra un experimento de TGI en ratones atímicos con xenoinjertos de HT-29 subcutáneos.
- La figura 14 muestra un experimento de TGI en ratones atímicos con xenoinjertos de HT-29 subcutáneos.
- 45 La figura 15 muestra un experimento de TGI en ratones atímicos con xenoinjertos de HT-29 subcutáneos.
- La figura 16 muestra un experimento de TGI en ratones atímicos con xenoinjertos de HT-29 subcutáneos.
- La figura 17 muestra el porcentaje de usos monopolares en xenoinjertos de RPMI 8226 subcutáneos en ratones SCID-beige en diversos puntos de tiempo para diferentes calendarios de dosificación.
- 50 La figura 18 muestra el porcentaje de células apoptóticas en xenoinjertos de RPMI 8226 subcutáneos en ratones SCID-beige en diversos puntos de tiempo después para diferentes calendarios de dosificación.
- 55 La figura 19 muestra el porcentaje de usos bipolares en xenoinjertos de RPMI 8226 subcutáneos en ratones SCID-beige en diversos puntos de tiempo para diferentes calendarios de dosificación.

Descripción detallada de la invención

- 60 Ahora se hará referencia con detalle a ciertas formas de realización de la invención. Aunque la invención se describirá junto con las formas de realización enumeradas, se entenderá que no se pretende que no estén destinadas a limitar la invención a esas formas de realización. Por el contrario, la invención está destinada a cubrir todas las alternativas, modificaciones, y equivalentes, que se pueden incluir en el alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones. Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí, que se podrían usar en la práctica de la presente invención. La presente invención no está limitada de ningún modo a los métodos y materiales descritos. En el caso de que uno o más de los
- 65

materiales bibliográficos y similares incorporados difieran de o contradigan esta solicitud, incluyendo, pero sin limitarse a, términos definidos, uso de términos, técnicas descritas, o similares, prevalece esta solicitud.

Definiciones

5 Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a describen el estado fisiológico en mamíferos – que se caracteriza típicamente por el crecimiento celular no regulado. Un “tumor” comprende una o más células cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico (“NSCLC”), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer del riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer de piel, incluyendo melanoma, cáncer de cabeza y cuello, mieloma múltiple, y leucemia mieloidea aguda.

20 Los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren a medidas terapéuticas, profilácticas, paliativas o preventivas. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado de la enfermedad (es decir, no empeoramiento), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado mórbido, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la afección o trastorno, así como aquellos con tendencia a tener la afección o trastorno, o aquellos en los que se va a prevenir la afección o trastorno.

Inhibidores de la mitosis para incrementar apoptosis en terapia

30 La presente invención proporciona un inhibidor de la mitosis para la administración a un paciente que tiene células patogénicas en un estado de detención mitótica inducida por inhibidores de la mitosis, para incrementar la apoptosis de las células.

35 La administración de un inhibidor de la mitosis a las células pone a las células en detención mitótica. Sin embargo, la detención mitótica no conduce necesariamente a las células a la apoptosis o da como resultado eficacia antitumoral (véanse, por ejemplo: Shi, Jue, *et al.* “Cell Type Variation in Responses to Antimitotic Drugs that Target Microtubules and Kinesin-5”. *Cancer Research*. 68(9) (1 de mayo de 2008): p. 3269-76; y 2002 AACR Poster: “A Pharmacodynamic marker of mitosis demonstrates the anti-mitotic activity of SB-715992, an inhibitor of the mitotic kinsin KSP”. www.cytokinetics.com/pdf/AACR_2002_Poster_1336.pdf). Se ha encontrado que las células deben de permanecer en detención durante un tiempo antes de que la apoptosis alcance un pico (véase la figura 1). La duración del tiempo necesario para la apoptosis es variable entre tipos celulares y tipos de tumores (véanse las figuras 2 y 3). También, la administración de dos dosis en lugar de una dosis incrementa la duración del efecto biológico (véanse las figuras 4 y 5), que en el caso de inhibidores de la mitosis incrementa la duración y magnitud de la apoptosis (véanse las figuras 6 y 7). Por lo tanto, el mantenimiento de las células en detención para que un período de tiempo apropiado sea eficaz es necesario para incrementar la apoptosis usando un inhibidor de la mitosis.

50 La administración de un inhibidor de la mitosis a las células interfiere con la mitosis. Por ejemplo, la administración de un inhibidor de KSP incrementa la cantidad de husos monopolares. Sin embargo, se debe de administrar una cantidad mínima del inhibidor a fin de lograr la respuesta biológica deseada (véase la figura 8). Por lo tanto, la administración de un inhibidor de la mitosis debe de lograr una dosis biológicamente eficaz del inhibidor para que sea efectiva. La dosis biológicamente eficaz de un inhibidor de KSP es la dosis del inhibidor que da como resultado la aparición de husos moleculares detenidos. Éstos se pueden observar mediante técnicas inmunohistoquímicas (véanse las figuras 4, 5 y 8). La dosis biológicamente eficaz de otros inhibidores de la mitosis dará como resultado aberraciones mitóticas consistente con su perfil diana.

60 Si la administración del inhibidor de la mitosis fracasa en alcanzar la dosis biológicamente eficaz, entonces no sucederá la respuesta biológica apropiada. También, si la administración del inhibidor fracasa a la hora de mantener las células en detención durante un tiempo suficiente, las células no irán a la apoptosis. Por lo tanto, incrementar eficazmente la apoptosis usando un inhibidor de la mitosis requiere que el inhibidor de la mitosis se administre al menos a la dosis biológicamente eficaz para conseguir el efecto biológico pretendido (es decir, la detención mitótica), así como que se dosifique durante un período de tiempo suficientemente largo para mantener las células en detención e inducir apoptosis (véanse las figuras 4-9 y 17-19).

65 Se ha encontrado que la administración de un inhibidor de la mitosis como una dosis partida dividida a lo largo de dos días puede ser más eficaz que la misma dosis total administrada en un día (véase la figura 16).

Para tumores en los que las células entran rápidamente en apoptosis tras el bloqueo mitótico (véase la figura 3), la detención mitótica (véase la figura 17) o la apoptosis (véase la figura 18) pueden no correlacionarse directamente con la eficacia potenciada para inhibir el crecimiento tumoral en un calendario de dosis dividida (véase la figura 16).
 5 En tales casos, las pocas células observadas en detención mitótica y apoptosis pueden reflejar la muerte celular rápida, de manera que ya no son detectables en el tumor. Sin embargo, la cantidad de células con husos bipolares, indicativa de células normalmente en ciclo en mitosis, se puede correlacionar de forma inversa con la eficacia potenciada (véase la figura 19). En tales casos, las pocas células con husos bipolares indican un bloqueo mitótico más completo, escapando las pocas células al bloqueo y volviendo a entrar en el ciclo celular.

10 Una forma de realización de la presente invención proporciona un inhibidor de la mitosis para la administración a un paciente que tiene células patogénicas en un estado de detención mitótica inducida por inhibidores de la mitosis, para incrementar la apoptosis de las células.

15 Otra forma de realización de la presente invención proporciona un inhibidor '161 de KSP para la administración a un paciente que tiene células patogénicas en un estado de detención mitótica inducida por un inhibidor '161 de KSP, para incrementar la apoptosis de las células.

20 La presente invención se refiere a administrar el mismo inhibidor de la mitosis para incrementar la apoptosis, ya que el inhibidor de la mitosis administrado induce detención mitótica.

25 La presente invención es útil para tratar células patogénicas provocadas por división celular o que son tratadas inhibiendo la mitosis. Los inhibidores de la mitosis se pueden usar para tratar una variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades hiperproliferativas y gota. Las enfermedades hiperproliferativas incluyen cáncer, enfermedad autoinmune, artritis, rechazo de injertos, enfermedad inflamatoria del intestino, o proliferación inducida tras un procedimiento médico.

30 En ciertas formas de realización, la invención proporciona una mayor apoptosis para células cancerosas patogénicas. Más particularmente, las células cancerosas patogénicas incluyen, pero no se limitan a: cánceres de tejidos blandos: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rhabdomioma, liposarcoma), mixoma, rhabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma; pulmón: carcinoma broncogénico (célula escamosa, célula pequeña no diferenciada, célula grande no diferenciada, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquioloalveolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; gastrointestinal: esófago (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomioma, leiomioma), estómago (carcinoma, linfoma, leiomioma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucosarcoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, emangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, amartoma, leiomioma); aparato genitourinario: riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm [nefroblastoma], linfoma, leucemia), vejiga y uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma), próstata (adenocarcinoma, sarcoma), testículos (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma); hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, emangioma; huesos: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, istiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, cordoma tumoral de células gigantes malignas, osteosarcoma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; sistema nervioso: cráneo (osteoma, emangioma, granuloma, xantoma, osteitis deformante), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de la médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma); ginecológicos: útero (carcinoma endometrial), cuello uterino (carcinoma cervical, displasia cervical pretumoral), ovarios (carcinoma ovárico [cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma sin clasificar], tumores de células granulosas-tecales, tumores de células de Sertoli-Leidig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioides (rhabdomioma embrionario), trompas de falopio (carcinoma); hematológicos: sangre y médula ósea (leucemia mielode [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin [linfoma maligno]; piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, nevos displásicos lunares, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis; y glándulas suprarrenales: neuroblastoma. La expresión "célula cancerosa", como se proporciona aquí, incluye una célula aquejada por una cualquiera de las afecciones identificadas anteriormente.

65 En ciertas formas de realización, la presente invención es útil para incrementar la apoptosis de células cancerosas patogénicas, en el que las células cancerosas patogénicas son células de tumores sólidos. Las células de tumores sólidos incluyen células tumorales de la piel, mama, cerebro, carcinoma cervical, células de carcinoma testicular, etc. En ciertas formas de realización, los tumores sólidos se seleccionan de entre cáncer de mama, cáncer colorrectal,

cáncer de pulmón no microcítico, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de las glándulas salivares (adenocarcinoma cístico), cáncer esofágico, cáncer de mesotelioma, y cáncer de pulmón microcítico/cáncer de pulmón no microcítico mixtos.

5 En ciertas formas de realización, la presente invención es útil para incrementar la apoptosis de células cancerosas patogénicas, en el que las células cancerosas patogénicas son células de tumores hematológicos. Las células de tumores hematológicos incluyen linfomas, leucemia, células de mieloma múltiple, y similares. En ciertas formas de realización, la presente invención es útil para incrementar la apoptosis de células cancerosas patogénicas, en el que las células cancerosas patogénicas se seleccionan de entre células de linfoma, de leucemia y de mieloma múltiple.
10 En una realización adicional, la presente invención es útil para incrementar la apoptosis de células cancerosas patogénicas, en el que las células cancerosas patogénicas son leucemia mieloide avanzada, o células de mieloma múltiple recidivante o refractario. En una forma de realización adicional, la presente invención es útil para incrementar la apoptosis de células cancerosas patogénicas, en el que las células cancerosas patogénicas son células de mieloma múltiple recidivante o refractario.

15 Hay múltiples variables cuando se busca una mayor apoptosis a la hora de administrar inhibidores de la mitosis. Particularmente con inhibidores de la mitosis, es necesario continuar la administración durante un período de tiempo suficientemente largo y a un nivel de exposición suficiente para que sean biológicamente eficaces.

20 A fin de inducir la detención mitótica en células patogénicas, se administra en primer lugar un inhibidor de la mitosis. Se dice que esta primera administración es en el día uno. Después se puede producir una mayor apoptosis cuando se proporciona una segunda administración del inhibidor de la mitosis en el día dos o en el día tres. Como alternativa, la segunda dosis está dentro de las 24 a 48 horas de la primera dosis. Este aspecto del presente método permite una mayor apoptosis de las células patogénicas debido a que el inhibidor está siendo dosificado de forma
25 suficientemente elevada para lograr la dosis biológicamente eficaz para obtener el efecto biológico pretendido, es decir, las células se mantienen en detención mitótica, así como lograr la detención mitótica durante un tiempo suficiente para promover la apoptosis o salir de la mitosis, que conduce a la muerte celular.

30 El tiempo de esta segunda dosis no necesita ser exactamente 24 a 48 horas después de la primera dosis. Esto es solamente una manera conveniente de decir que la segunda dosis debería de administrarse uno o dos días después de la primera dosis. Por lo tanto, la segunda dosis se administra aproximadamente 24 a 48 horas después de la primera dosis. Esta segunda dosis se puede administrar 12 a 60 horas después de la primera dosis.

35 Cuando se administra la segunda dosis del inhibidor de la mitosis, la administración en días consecutivos permite una mayor conveniencia para los pacientes. Es preferible tener un calendario de dosificación conveniente para los pacientes para incrementar el cumplimiento del paciente con el método de tratamiento. Esto es especialmente cierto de sustancias terapéuticas que se administran a pacientes vía inyección intravenosa, ya que dosis adicionales pueden requerir visitas adicionales a un hospital o a un médico para recibir las inyecciones.

40 Se conocen muchos tipos de inhibidores de la mitosis, incluyendo alcaloides de la vinca, taxanos, epotilonas, dolastatina y análogos de dolastatina, Aurora cinasas, cinasas tipo Polo, e inhibidores de quinesinas mitóticas.

45 El inhibidor de la mitosis se puede seleccionar del grupo que consiste en alcaloides de la vinca, taxanos, epotilonas, dolastatina y análogos de dolastatina, inhibidores de Aurora cinasa, inhibidores de cinasas tipo Polo, e inhibidores de quinesinas mitóticas.

El inhibidor de la mitosis puede ser un inhibidor de quinesinas mitóticas. El inhibidor de las quinesinas mitóticas puede ser un inhibidor de CENP-E, o un inhibidor de KSP.

50 El inhibidor de la mitosis puede ser un inhibidor de KSP.

El inhibidor de la mitosis se puede seleccionar del grupo que consiste en GSK-295, ispinesib, los inhibidores '161 de KSP, AZD-4877, CRx-026, SB-743921 (SB-921), MK-0731, EMD-534085 y ARQ 621.

55 El inhibidor de la mitosis se puede seleccionar del grupo que consiste en ispinesib, los inhibidores '161 de KSP, AZD-4877, CRx-026, SB-743921 (SB-921), MK-0731, EMD-534085 y ARQ 621.

60 El inhibidor de la mitosis se puede seleccionar del grupo que consiste en ispinesib, los inhibidores '161 de KSP y AZD-4877.

El inhibidor de la mitosis se puede seleccionar del grupo que consiste en los inhibidores '161 de KSP. El inhibidor de la mitosis puede ser el Compuesto 1. El inhibidor de la mitosis puede ser el Compuesto 2. El inhibidor de la mitosis puede ser el Compuesto 3. El inhibidor de la mitosis puede ser el Compuesto 4. El inhibidor de la mitosis puede ser el Compuesto 5. El inhibidor de la mitosis puede ser el Compuesto 6.

65 El inhibidor de la mitosis se puede seleccionar del grupo que consiste en SU-6668, AZD-1152, CYC-116, AS-

703569, MLN-8054, R763, PHA-739358, AT-9283, SNS-314, AZD-1152-HQPA, MLN-8237, KW-2449, PF-3814735, ENMD-2076, PHA-739385, MK-0457, MK-5108, ON-01910Na, BI-2536, GSK-461364, ispinesib, los inhibidores '161 de KSP, AZD-4877, CRx-026, SB-743921 (SB-921), MK-0731, EMD-534085, ARQ 621 y GSK-295.

- 5 El inhibidor de la mitosis se puede seleccionar del grupo que consiste en vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel, Abraxane[®], colchicina, epotilona A, epotilona B, epotilona D, ixabepilona, dolastatina 10, dolastatina 15, sintadotina, LU103793, cemadotina, SU-6668, AZD-1152, CYC-116, AS-703569, MLN-8054, R763, PHA-739358, AT-9283, SNS-314, AZD-1152-HQPA, MLN-8237, KW-2449, PF-3814735, ENMD-2076, PHA-739385, MK-0457, MK-5108, ON-01910Na, BI-2336, GSK-461364, GSK-295, ispinesib, el inhibidor '161 de KSP, AZD-4877. CRx-026, SB-743921 (SB-921), MK-0731, EMD-534085, ARQ 621 y GSK-295.

El inhibidor de la mitosis puede ser un alcaloide de la vinca. El alcaloide de la vinca se puede seleccionar del grupo que consiste en vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.

- 15 El inhibidor de la mitosis puede ser un taxano. El inhibidor de la mitosis se puede seleccionar del grupo que consiste en paclitaxel, Abraxane[®] y docetaxel.

El inhibidor de la mitosis puede ser colchicina.

- 20 El inhibidor de la mitosis puede ser epotilona. El inhibidor de la mitosis se puede seleccionar del grupo que consiste en epotilona A, epotilona B, epotilona D e ixabepilona.

El inhibidor de la mitosis puede ser dolastatina y análogos de dolastatina. El inhibidor de la mitosis se puede seleccionar del grupo que consiste en dolastatina 10, dolastatina 15, sintadotina, LU103793 y cemadotina.

- 25 El inhibidor de la mitosis puede ser un inhibidor de Aurora cinasas. El inhibidor de la mitosis se puede seleccionar del grupo que consiste en SU-6668, AZD-1152, CYC-116, AS-703569, MLN-8054, R763, PHA-739358, AT-9283, SNS-314, AZD-1152-HQPA, MLN-8237, KW-2449, PF-3814735, ENMD-2076, PHA-739385, MK-0457 y MK-5108.

- 30 El inhibidor de la mitosis puede ser un inhibidor de cinasas tipo Polo. El inhibidor de la mitosis se puede seleccionar del grupo que consiste en ON-01910Na, BI-2536 y GSK-461364.

El inhibidor de la mitosis puede ser un inhibidor de CENP-E. El inhibidor de la mitosis puede ser GSK-295.

- 35 Como se explica anteriormente, se debe de administrar la cantidad apropiada de inhibidor de la mitosis a fin de alcanzar el efecto biológico deseado. De este modo, para incrementar la apoptosis administrando un inhibidor de la mitosis, se administrará al menos una cantidad mínima que alcanza el efecto biológico deseado, o dosis biológicamente activa. Sin embargo, la cantidad no debería de ser tan elevada para sobrepasar con efectos secundarios inaceptables el beneficio del efecto biológico. Por lo tanto, al incrementar la apoptosis administrando un inhibidor de la mitosis, no se administrará más de la dosis máxima tolerada ("MTD"). Cada administración del inhibidor de la mitosis está entre la dosis biológicamente eficaz y la dosis máxima tolerada.

- 45 La dosis máxima tolerada se define como la dosis más elevada que produce una incidencia aceptable de toxicidades limitantes de la dosis ("DLT"). Las dosis que provocan una tasa inaceptable de DLT son consideradas no toleradas. Típicamente, la MTD para un calendario particular se establece en ensayos clínicos en fase 1. Éstos se realizan habitualmente en pacientes partiendo de una dosis de partida segura de 1/10 de la dosis tóxica severa ("STD10") en roedores (en una base de mg/m²) y reuniendo los pacientes en cohortes de tres, aumentando en escala la dosis según una secuencia de Fibonacci modificada en la que etapas de escalación siempre mayores tienen incrementos relativos siempre decrecientes (por ejemplo, la dosis incrementa de 100%, 65%, 50%, 40%, y 30% a 35% después).
- 50 La escalación de la dosis se continúa en cohortes de tres pacientes hasta que se alcanza una dosis no tolerada. El siguiente nivel de dosis más baja que produce una tasa aceptable de DLT se considera que es la MTD.

- También, la MTD de un inhibidor de la mitosis varía dependiendo del inhibidor, de la especie, de la formulación y del calendario de dosificación. Por ejemplo, la administración de un inhibidor de la mitosis solamente en el día uno frente a los días uno y dos frente a los días uno a tres a lo largo de siete, catorce, veintiún o veintiocho días puede tener diferentes MTDs. Sin embargo, como se explica anteriormente, el incremento de la apoptosis usando un inhibidor de la mitosis requiere administrar el inhibidor en una cantidad suficientemente elevada para que sea biológicamente eficaz, así como durante un tiempo suficiente para mantener a las células en detención mitótica. La administración solamente en el día uno puede alcanzar la dosis biológicamente eficaz, pero puede no ser suficientemente prolongada para incrementar la apoptosis en las células. Como alternativa, la administración del inhibidor de la mitosis en los días uno a tres puede ser suficientemente prolongada, pero puede no administrar cantidad suficiente para alcanzar la dosis biológicamente eficaz, y de este modo la apoptosis no aumentará. Esto puede ser debido a que la MTD de la dosificación para tres días es menor que la dosis biológicamente eficaz.

- 65 Típicamente, cuando se tratan células patogénicas tales como cáncer, la MTD de un compuesto particular se administra a un paciente de manera que se pueda alcanzar el beneficio máximo en el tratamiento. En consecuencia,

una forma de realización de la presente invención proporciona un inhibidor de la mitosis para la administración a un paciente que tiene células patogénicas en un estado de detención mitótica inducida por inhibidores de la mitosis, para incrementar la apoptosis de las células, en el que el inhibidor de la mitosis se administra a la dosis máxima tolerada.

5 Otra forma de realización de la presente invención proporciona los inhibidores '161 de KSP para la administración a un paciente que tiene células patogénicas en un estado de detención mitótica inducida por un inhibidor '161 de KSP, para incrementar la apoptosis de las células, en el que el inhibidor '161 se administra a la dosis máxima tolerada.

10 Cuando se tratan células patogénicas tales como cáncer, se establece un ciclo de dosificación de manera que después de que se completa el primer ciclo, entonces se pueden administrar ciclos adicionales hasta que tal tratamiento ya no es necesario o eficaz. Uno de los factores para determinar la duración de un ciclo es permitir la recuperación para disminuir los efectos secundarios. Tras administrar una composición farmacéutica o sustancia terapéutica, particularmente un inhibidor de la mitosis, los pacientes pueden experimentar efectos secundarios.
15 Dependiendo del tipo de efectos secundarios, puede ser necesario una recuperación o disminución de los efectos secundarios. Esta recuperación o disminución de los efectos secundarios puede tomar tiempo, que a su vez puede controlar la duración del ciclo antes de que pueda comenzar un segundo ciclo.

20 Uno de los efectos secundarios de los inhibidores de la mitosis, y particularmente inhibidores de KSP, es la neutropenia aguda. La neutropenia es un trastorno hematológico caracterizado por un número anormalmente bajo de granulocitos neutrófilos, un tipo de glóbulo blanco. Generalmente, los pacientes que experimentan este tipo de efecto secundario de un inhibidor de la mitosis (o inhibidor de KSP) se recuperan o la neutropenia disminuye a medida que el tiempo pasa sin dosis adicionales del inhibidor.

25 Tras una única administración de un inhibidor de KSP, muchos pacientes se recuperan de los efectos secundarios, o los efectos secundarios disminuyen en el día 14 al día 21 del ciclo.

30 La presente invención proporciona un inhibidor de la mitosis para la administración a un paciente que tiene células patogénicas en un estado de detención mitótica inducida por inhibidores de la mitosis, para incrementar la apoptosis de las células, en el que el ciclo permite la recuperación o se logra la disminución de los efectos secundarios.

35 Una primera dosis induce detención mitótica. La presente invención proporciona una mayor apoptosis con una segunda dosis administrada uno o dos días después de la primera dosis. La presente invención proporciona que el ciclo que incluye la administración de la dosis primera y segunda es 14 a 21 días. Esto es una forma conveniente de decir 2 o 3 semanas, y no tiene que ser necesariamente 14 a 21 días exactamente. Por lo tanto, el ciclo dura aproximadamente 14 a 21 días. El ciclo puede durar de 11 a 24 días. El ciclo puede durar 14 días, u 11 a 17 días. El ciclo también puede durar 21 días, o 18 a 24 días.

40 Otra forma de realización de la presente invención proporciona un inhibidor '161 de KSP para la administración a un paciente que tiene células patogénicas en un estado de detención mitótica inducida por inhibidor '161 de KSP, para incrementar la apoptosis de las células. En ciertas formas de realización, el inhibidor '161 de KSP es el Compuesto 1. En ciertas formas de realización, el inhibidor '161 de KSP es el Compuesto 2. En ciertas formas de realización, el inhibidor '161 de KSP es el Compuesto 3. En ciertas formas de realización, el inhibidor '161 de KSP es el Compuesto 4. En ciertas formas de realización, el inhibidor '161 de KSP es el Compuesto 5. En ciertas formas de realización, el inhibidor '161 de KSP es el Compuesto 6. En ciertas formas de realización, las células patogénicas son células cancerosas. En ciertas formas de realización, las células patogénicas son células de tumores hematológicos. En ciertas formas de realización, las células patogénicas se seleccionan de entre células de linfoma, de leucemia y de mieloma múltiple. En ciertas formas de realización, las células patogénicas son células de tumores sólidos. En ciertas formas de realización, las células patogénicas se seleccionan de entre células tumorales de la piel, mama, cerebro, carcinoma cervical, y células de carcinoma testicular. En ciertas formas de realización, las células de tumores sólidos se seleccionan de entre cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de las glándulas salivares (adenoide cístico), cáncer esofágico, cáncer de mesotelioma, y cáncer de pulmón microcítico/cáncer de pulmón no microcítico mixtos. En ciertas formas de realización, el inhibidor se dosifica a la dosis máxima tolerada.

55 Otra realización de la presente invención proporciona un inhibidor '161 de KSP para la administración a un paciente que tiene células patogénicas en un estado de detención mitótica inducida por el inhibidor '161 de KSP, para incrementar la apoptosis de las células, en el que el inhibidor se administra a la dosis máxima tolerada. En ciertas formas de realización, el inhibidor '161 de KSP es el Compuesto 1. En ciertas formas de realización, el inhibidor '161 de KSP es el Compuesto 2. En ciertas formas de realización, el inhibidor '161 de KSP es el Compuesto 3. En ciertas formas de realización, el inhibidor '161 de KSP es el Compuesto 4. En ciertas formas de realización, el inhibidor '161 de KSP es el Compuesto 5. En ciertas formas de realización, el inhibidor '161 de KSP es el Compuesto 6. En ciertas formas de realización, las células patogénicas son células cancerosas. En ciertas formas de realización, las células patogénicas son células de tumores hematológicos. En ciertas formas de realización, las células patogénicas se seleccionan de entre células de linfoma, de leucemia y de mieloma múltiple. En ciertas formas de realización, las células patogénicas son células de tumores sólidos. En ciertas formas de realización, las células patogénicas se
60
65

seleccionan de entre células tumorales de la piel, mama, cerebro, carcinoma cervical, y células de carcinoma testicular. En ciertas formas de realización, las células de tumores sólidos se seleccionan de entre cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de las glándulas salivares (adenoide cístico), cáncer esofágico, cáncer de mesotelioma, y cáncer de pulmón microcítico/cáncer de pulmón no microcítico mixtos.

Ejemplos

A fin de ilustrar la invención, se incluyen los siguientes Ejemplos. Sin embargo, se ha de entender que estos Ejemplos no limitan la invención, y solo pretenden apoyar y sugerir un método para poner en práctica la invención.

Ejemplo I

Lavado de la apoptosis

Células HT-29, tratadas con control de vehículo (DMSO) o con 10 nM de Compuesto 4, se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos idénticas. Después de 8 o 24 horas, el Compuesto 4 se eliminó de las células HT-29 y se sustituyó por medio de crecimiento reciente, a fin de determinar si se pudo evitar la inducción de la apoptosis. La actividad de caspasa 3/7 se midió como luminiscencia del producto de reacción en los tiempos indicados usando el reactivo CaspaseGlo 3/7 (Promega) y un luminómetro. Los valores se dan como actividad de caspasa 3/7 de células tratadas con el Compuesto 4 dividida entre la actividad de caspasa 3/7 de células tratadas con DMSO. Los resultados se muestran en la figura 1.

Ejemplo 2

Apoptosis en HT-29 tras el tratamiento continuo con Compuesto 4

Células HT-29, tratadas de forma continua con control de vehículo (DMSO), o 100 nM, 10 nM, 1 nM, o 0,1 nM de Compuesto 4, se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos idénticas. La actividad de caspasa 3/7 se midió como producto de reacción luminiscente en los tiempos indicados usando el reactivo CaspaseGlo 3/7 (Promega) y un luminómetro. Los valores se dan como actividad de caspasa 3/7 de células tratadas con el Compuesto 4 dividida entre la actividad de caspasa 3/7 de células tratadas con DMSO. Los datos incluyen valores de la media y de la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Los resultados se muestran en la figura 2.

Ejemplo 3

Apoptosis en RPMI 8226

Células RPMI 8226, tratadas con control de vehículo (DMSO), 10 nM de Compuesto 4, o 10 nM de vincristina, se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos idénticas. La actividad de caspasa 3/7 se midió como producto de reacción luminiscente en los tiempos indicados usando el reactivo CaspaseGlo 3/7 (Promega) y un luminómetro. Los valores se dan como actividad de caspasa 3/7 de células tratadas con fármaco dividida entre la actividad de caspasa 3/7 de células tratadas con DMSO. Los datos incluyen valores de la media y de la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Los resultados se muestran en la figura 3.

Ejemplo 4

Duración de husos monopolares y magnitud de la apoptosis (xenoinjertos de HT-29)

A ratones hembra atímicos se les implantaron subcutáneamente 5×10^6 células HT-29 en 100 μ l de PBS. Diez días más tarde, se midieron los tumores, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de tres con un volumen tumoral medio en cada grupo de aproximadamente 240 mm^3 . El Compuesto 4 se disolvió en disolución salina normal inmediatamente antes de la dosificación. Se determinó que 20 mg/kg fue la MTD para el Compuesto 4. El volumen de la dosis fue 10 ml/kg. La dosificación fue vehículo solo en el día 1; y Compuesto 4 a 20 mg/kg en el día 1; y 20 mg/kg en los días 1 y 3. En diversos puntos de tiempo tras la dosificación (24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas), los ratones se eutanasiaron mediante inhalación de CO_2 , y los tumores se recolectaron y se colocaron inmediatamente en formalina. Las muestras del grupo de control de vehículo se recogieron 24 y 72 horas tras la dosificación. Las muestras del grupo del día 1 se recogieron 24, 48, 72 y 96 horas después de esa dosis. Las muestras del grupo del día 1 y día 3 se recogieron 72, 96, 120 y 144 horas después de la primera dosis. Se prepararon mediante procedimientos estándar bloques de parafina de tejido tumoral. La visualización de los husos monopolares se llevó a cabo tiñendo secciones cortadas con anticuerpo primario de ratón anti-alfa-tubulina humana (clon B-7, Santa Cruz Biotechnology), seguido de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con Alexafluor 488 (Invitrogen). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 para el recuento celular. Las estructuras de los husos se contaron manualmente en tres áreas 40X de cada muestra, usando un microscopio fluorescente. La apoptosis se cuantificó contando manualmente las células positivas para TUNEL, también en tres áreas 40X de cada muestra (tinción de

TUNEL usando el Kit de Detección de Muerte Celular In Situ, AP de Roche). Los resultados se muestran en las figuras 4 y 6.

Ejemplo 5

Duración de husos monopolares y magnitud de la apoptosis (xenoinjertos de HT-29)

Los métodos del Ejemplo 5 son los mismos que los del Ejemplo 4, excepto que la dosificación fue vehículo solo en el día 1; y compuesto 4 a 8 mg/kg en el día 1; y 8 mg/kg en los días 1 y 3. Las muestras del grupo de control de vehículo se recogieron 24 y 72 horas después de la dosificación. Las muestras del grupo del día 1 se recogieron 24, 48, 72 y 96 horas después de esa dosis. Las muestras del grupo de los días 1 y 3 se recogieron 72, 96, 120 y 144 horas después de la primera dosis. Los resultados se muestran en las figuras 5 y 7.

Ejemplo 6

Bloqueo mitótico y apoptosis (HT-29)

A ratones hembra atímicos se les implantaron subcutáneamente 3×10^6 células HT-29 en 100 μ l de PBS. Catorce días más tarde, se midieron los tumores, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de tres con un volumen tumoral medio en cada grupo de aproximadamente 300 mm³. La dosificación fue vehículo solo, y el Compuesto 4 a 5, 10, 20 y 30 mg/kg. Todas las muestras se recogieron 24 y 48 horas tras la dosificación. Todos los otros métodos fueron como se describieron para el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en las figuras 8 y 9.

Ejemplo 7

Inhibición del crecimiento tumoral en diferentes calendarios de dosificación (HT-29)

A ratones hembra atímicos se les implantaron subcutáneamente 4×10^6 células HT-29 en 100 μ l de PBS. Trece días más tarde, se midieron los tumores, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de ocho con un volumen tumoral medio en cada grupo de aproximadamente 210 mm³. El Compuesto 4 se disolvió en disolución salina normal inmediatamente antes de la dosificación, y se administró IP a un volumen de 10 ml/kg durante 12 días a dosis de 4 mg/kg cada día, 8 mg/kg cada dos días, y 16 mg/kg cada cuatro días. Los pesos de los animales y los volúmenes tumorales se midieron (usando calibres electrónicos) dos veces a la semana. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula: volumen = (anchura² x longitud)/2. Los resultados se muestran en la figura 10.

Ejemplo 8

Inhibición del crecimiento tumoral en diferentes calendarios de dosificación (HT-29)

A ratones hembra atímicos se les implantaron subcutáneamente 5×10^6 células HT-29 en 100 μ l de PBS. Once a catorce días más tarde, se midieron los tumores, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de siete con volumen tumoral medio en cada grupo de aproximadamente 230 mm³. El Compuesto 4 se disolvió en disolución salina normal inmediatamente antes de la dosificación, y se administró IP a un volumen de 10 ml/kg. La dosificación fue vehículo solo en el día 1 y día 2; y Compuesto 4 a 20 mg/kg en los días 1 y 2; 20 mg/kg en los días 1 y 3; 5 mg/kg en los días 1, 2 y 3; 10 mg/kg en los días 1, 2 y 3; 10 mg/kg en los días 1, 2, 3, 4 y 5; 10 mg/kg en los días 1 y 2; y 10 mg/kg en los días 1 y 3. Los pesos de los animales y los volúmenes tumorales se midieron (usando calibres electrónicos) dos veces a la semana. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula: volumen = (anchura² x longitud)/2. La dosificación a 10 mg/kg en los días 1, 2, 3, 4 y 5 no fue tolerada (pérdida de peso mayor de 20% y/o muerte en algunos de los ratones). Los resultados se muestran en las figuras 11-15.

Ejemplo 9

Inhibición del crecimiento tumoral en diferentes calendarios de dosificación (RPMI 8226)

A ratones hembra SCID-beige se les implantaron subcutáneamente 1×10^7 células RPMI 8226 en 100 μ l de PBS con 50% de Matrigel. Veinticinco días más tarde, se midieron los tumores, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de siete con volumen tumoral medio en cada grupo de aproximadamente 225 mm³. El Compuesto 4 se disolvió en disolución salina normal inmediatamente antes de la dosificación, y se administró IP a un volumen de 10 ml/kg. La dosificación fue vehículo solo en el día 1; y Compuesto 4 a 20 mg/kg en el día 1; 10 mg/kg en los días 1 y 2; 10 mg/kg en los días 1 y 3; y 20 mg/kg en los días 1, 5 y 9. Los pesos de los animales y los volúmenes tumorales se midieron (usando calibres electrónicos) dos veces a la semana. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula: volumen = (anchura² x longitud)/2. Los resultados se muestran en la figura 16.

Ejemplo 10Duración de husos monopolares, husos bipolares, y magnitud de la apoptosis (RPMI 8226)

5 A ratones hembra SCID-beige se les implantaron subcutáneamente 1×10^7 células RPMI 8226 en 100 μ l de PBS con 50% de Matrigel. Treinta y un días más tarde, se midieron los tumores, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de tres con un volumen tumoral medio en cada grupo de aproximadamente 210 mm³. El Compuesto 4 se disolvió en disolución salina normal inmediatamente antes de la dosificación. El volumen de la dosis fue 10 ml/kg. La dosificación fue vehículo solo en el día 1; y Compuesto 4 a 10 mg/kg en el día 1; 20 mg/kg en el día 1; 10 mg/kg en los días 1 y 2; y 10 mg/kg en los días 1 y 3. En diversos tiempos tras la dosificación (24, 48, 72 y 96 horas), los ratones se eutanasiaron mediante inhalación de CO₂, y los tumores se recolectaron y se colocaron inmediatamente en formalina. Las muestras del grupo de control de vehículo se recogieron 48 horas tras la dosificación. Las muestras de 10 mg/kg en el día 1 se recogieron 24 y 48 horas después de la dosificación. Las muestras de 20 mg/kg en el día 1 se recogieron 24, 48 y 72 horas después de la dosificación. Las muestras de 10 mg/kg en los días 1 y 2 se recogieron 48 y 72 horas después de la primera dosis. Las muestras de 10 mg/kg en los días 1 y 3 se recogieron 72 y 96 horas después de la primera dosis. Se prepararon mediante procedimientos estándar bloques de parafina de tejido tumoral. La visualización de los husos monopolares se llevó a cabo tiñendo secciones cortadas con anticuerpo primario de ratón anti-alfa-tubulina humana (clon B-7, Santa Cruz Biotechnology), seguido de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con Alexafluor 488 (Invitrogen). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 para el recuento celular. Las estructuras de los husos se contaron manualmente en tres áreas 40X de cada muestra, usando un microscopio fluorescente. La apoptosis se cuantificó contando manualmente las células positivas para TUNEL, también en tres áreas 40X de cada muestra (tinción de TUNEL usando el Kit de Detección de Muerte Celular In Situ, AP de Roche). Los resultados se muestran en las figuras 17, 18 y 19.

Ejemplo 11Determinación de MTD en un estudio de Fase 1

30 Se enroló en un ensayo clínico de fase 1 humano un total de 13 pacientes con diversos tumores sólidos y con una edad de la mediana de 66 años (intervalo 40-79 años de edad) (véase "Phase 1 Safety and Pharmacokinetic Study of ARRY-520 in Solid Tumors". <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00462358>). Los tumores sólidos tratados fueron cáncer de mama (2), cáncer colorrectal (2), cáncer de pulmón no microcítico (2), cáncer pancreático (2), cáncer de vejiga, cáncer de las glándulas salivares (adenoide cístico), cáncer esofágico, cáncer de mesotelioma, y un cáncer de pulmón microcítico/cáncer de pulmón no microcítico mixtos. El Compuesto 4 se proporcionó para la administración como un polvo liofilizado contenido en un vial de vidrio transparente Tipo 1 para uso IV. Los niveles de dosis administrados fueron 1,25 y 1,6 mg/m²/día de Compuesto 4 en los días 1 y 2 cada dos semanas. Se determinó que la MTD fue 1,25 mg/m²/día (dosis acumulativa por ciclo de 2,5 mg/m²), con DLTs de hiponatremia de Grado 3, anorexia, incremento de AST, y neutropenia febril.

40 Véase también "A Phase 1/2 Study of ARRY-520 in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma". <http://clinicaltrials.gov/et2/show/NCT00821249>.

45 Aunque la invención se ha descrito juntamente con las formas de realización enumeradas, se entenderá que no están destinadas a limitar la invención a esas formas de realización. Por el contrario, la invención está destinada a cubrir todas las alternativas, modificaciones y equivalentes, que pueden estar incluidos dentro del alcance de la presente invención como se define mediante las reivindicaciones. De este modo, la descripción anterior se considera solamente como ilustrativa de los principios de la invención.

50 Las palabras "comprender", "que comprende", "incluir", "que incluye", e "incluye", cuando se usan en esta memoria descriptiva y en las siguientes reivindicaciones, están destinadas a especificar la presencia de cifras, números enteros, componentes, o etapas señalados, pero no excluyen la presencia o adición de uno o más cifras, números enteros, componentes, etapas, o grupos adicionales de los mismos.

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor '161 de KSP para su uso en el tratamiento de células patogénicas en un estado de detención mitótica inducida por inhibidor '161 de KSP, para incrementar la apoptosis de las células, en el que el inhibidor '161 de KSP se selecciona de entre 2-(3-aminopropil)-5-(3-fluorofenil)-N-(2-metoxietil)-N-metil-2-fenil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamida, 2-(3-aminopropil)-5-(3-fluorofenil)-N-metoxi-N-metil-2-fenil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamida, 2-(3-aminopropil)-5-(2,5-difluorofenil)-N-metoxi-N-metil-2-fenil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamida, (S)-2-(3-aminopropil)-5-(2,5-difluorofenil)-N-metoxi-N-metil-2-fenil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamida, y (R)-2-(3-aminopropil)-5-(2,5-difluorofenil)-N-metoxi-N-metil-2-fenil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamida.
2. Inhibidor para su uso según la reivindicación 1, que es el mismo que el inhibidor que ha inducido detención mitótica.
3. Inhibidor para su uso según la reivindicación 1 o 2, que es (S)-2-(3-aminopropil)-5-(2,5-difluorofenil)-N-metoxi-N-metil-2-fenil-1,3,4-tiadiazol-3(2H)-carboxamida.
4. Inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células patogénicas son células cancerosas.
5. Inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células patogénicas son células tumorales hematológicas.
6. Inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las células patogénicas se seleccionan de entre células de linfoma, de leucemia y de mieloma múltiple.
7. Inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células patogénicas son células de tumores sólidos.
8. Inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 7, en el que las células patogénicas se seleccionan de entre células tumorales de la piel, mama, cerebro, carcinoma cervical y células de carcinoma testicular.
9. Inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 7, en el que las células patogénicas se seleccionan de entre cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de las glándulas salivares (adenoide cístico), cáncer esofágico, cáncer de mesotelioma, y cáncer de pulmón microcítico/cáncer de pulmón no microcítico mixtos.
10. Inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el inhibidor está destinado a una administración a la dosis máxima tolerada.
11. Inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en el que la dosis máxima tolerada es 1,25 mg/m²/día.
12. Inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el inhibidor '161 para administración se administra 12 a 60 horas tras el inhibidor '161 que indujo detención mitótica.
13. Inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el inhibidor '161 destinado a la administración se administra entre 24 y 48 horas tras el inhibidor '161 que indujo detención mitótica.
14. Inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el inhibidor '161 se administra en un ciclo de 11 a 24 días.
15. Inhibidor para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el inhibidor '161 se administra en un ciclo de 14 a 21 días.

Figura 1

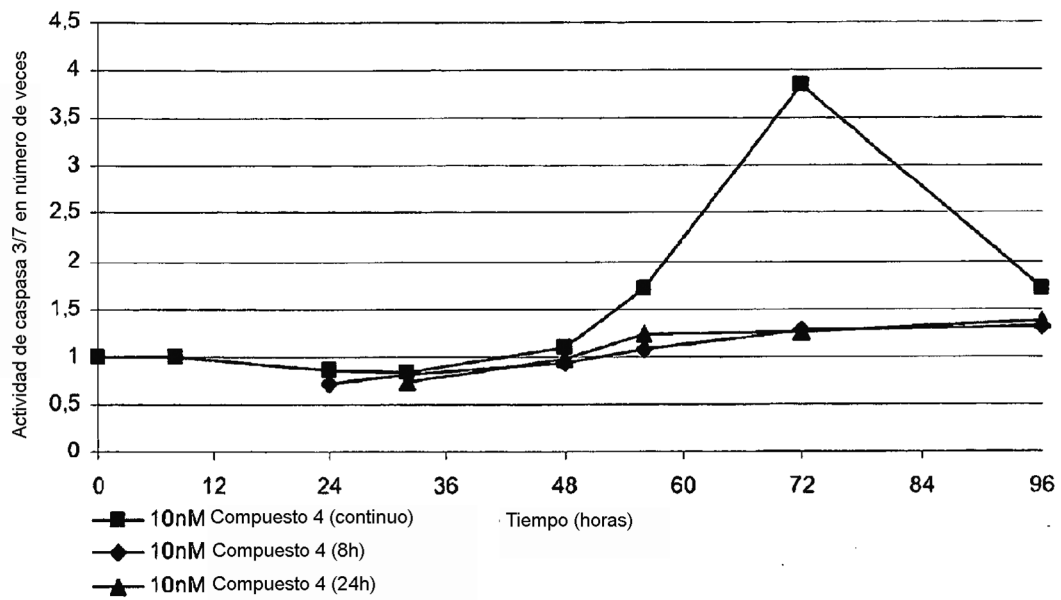


Figura 2

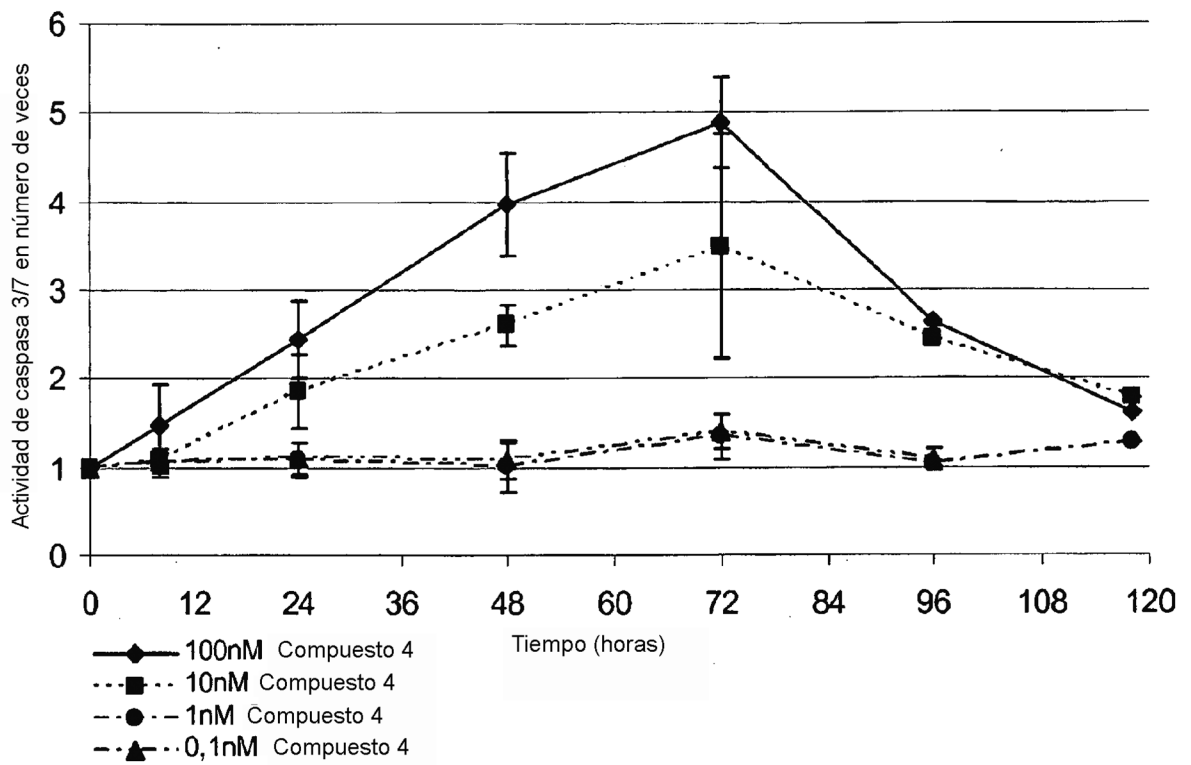


Figura 3

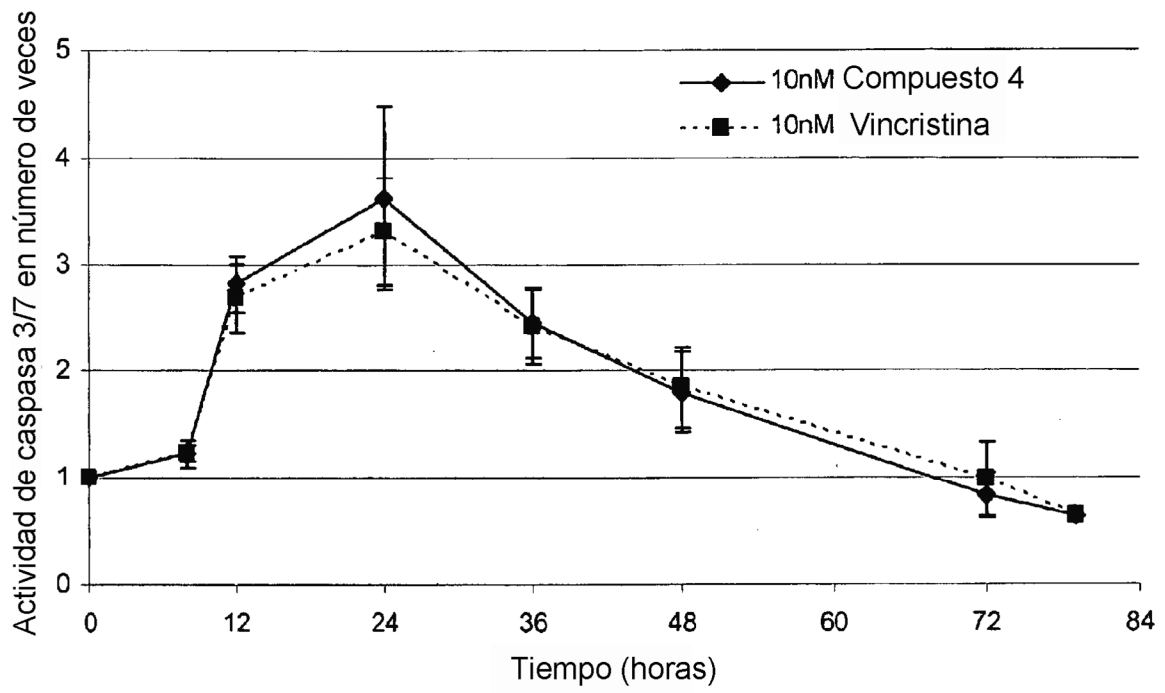


Figura 4

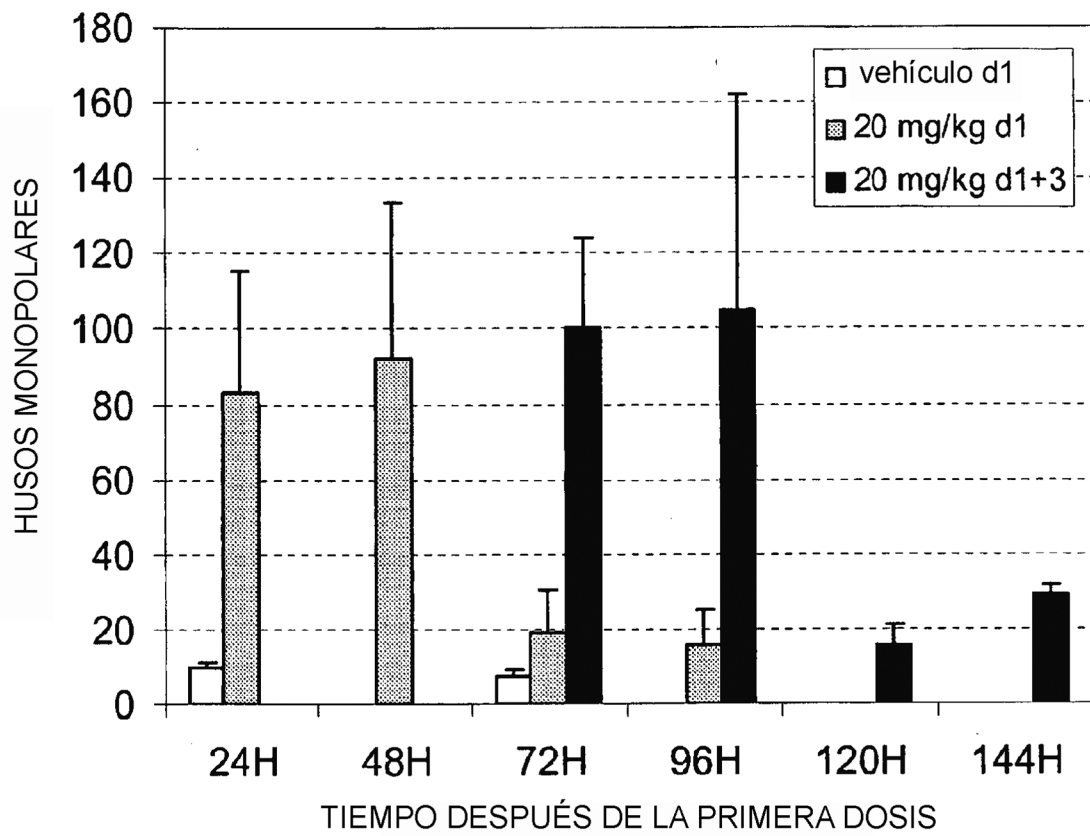


Figura 5

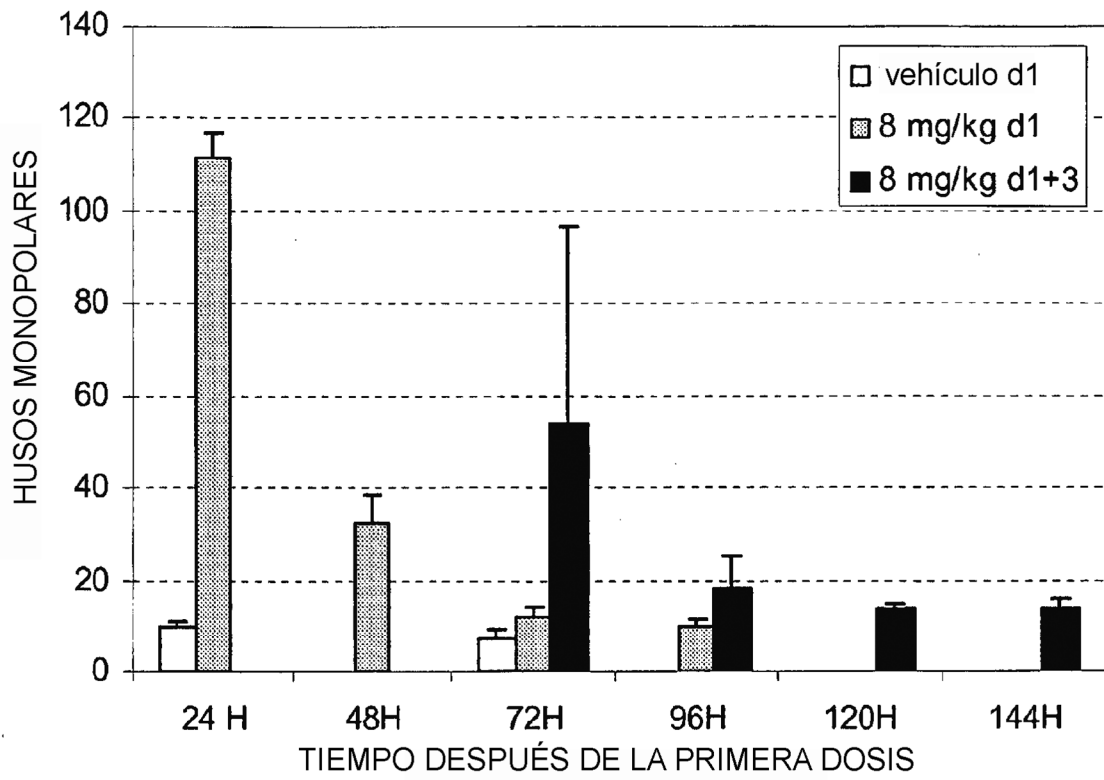


Figura 6

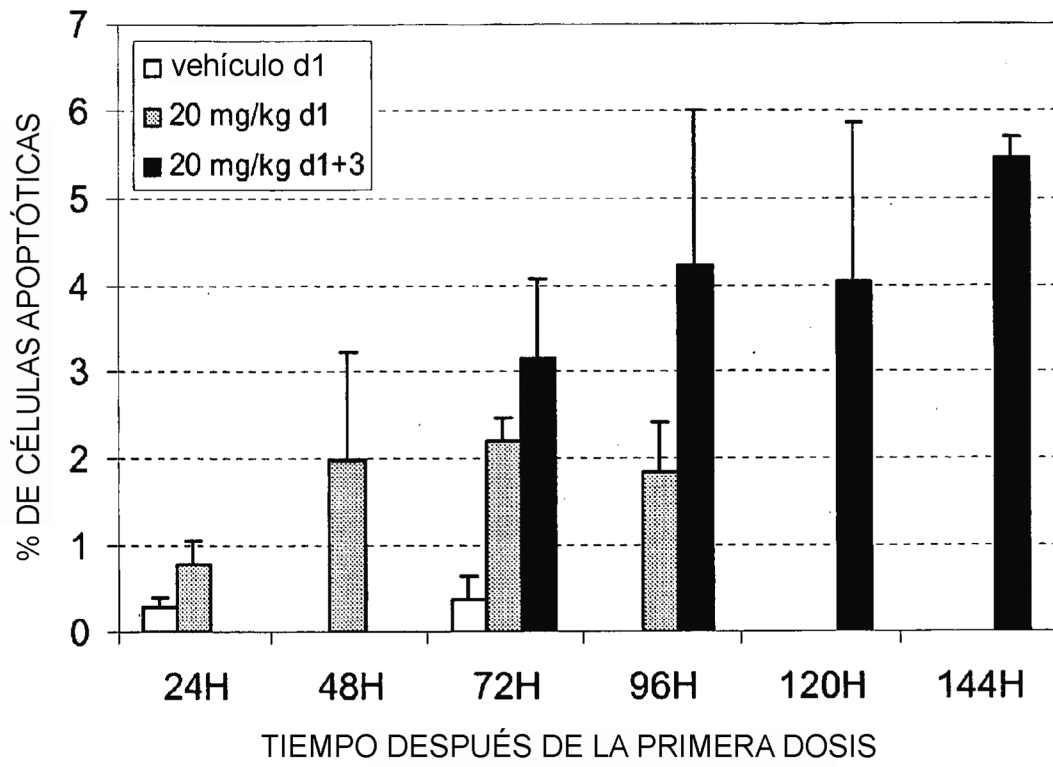


Figura 7

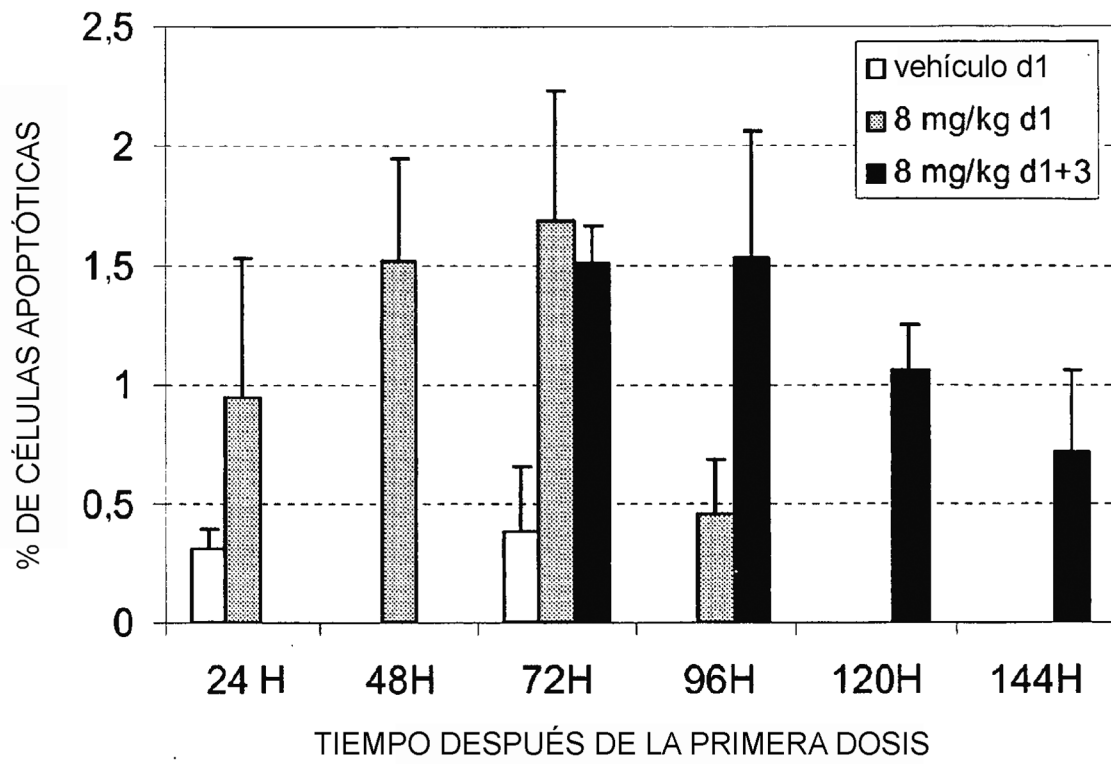


Figura 8

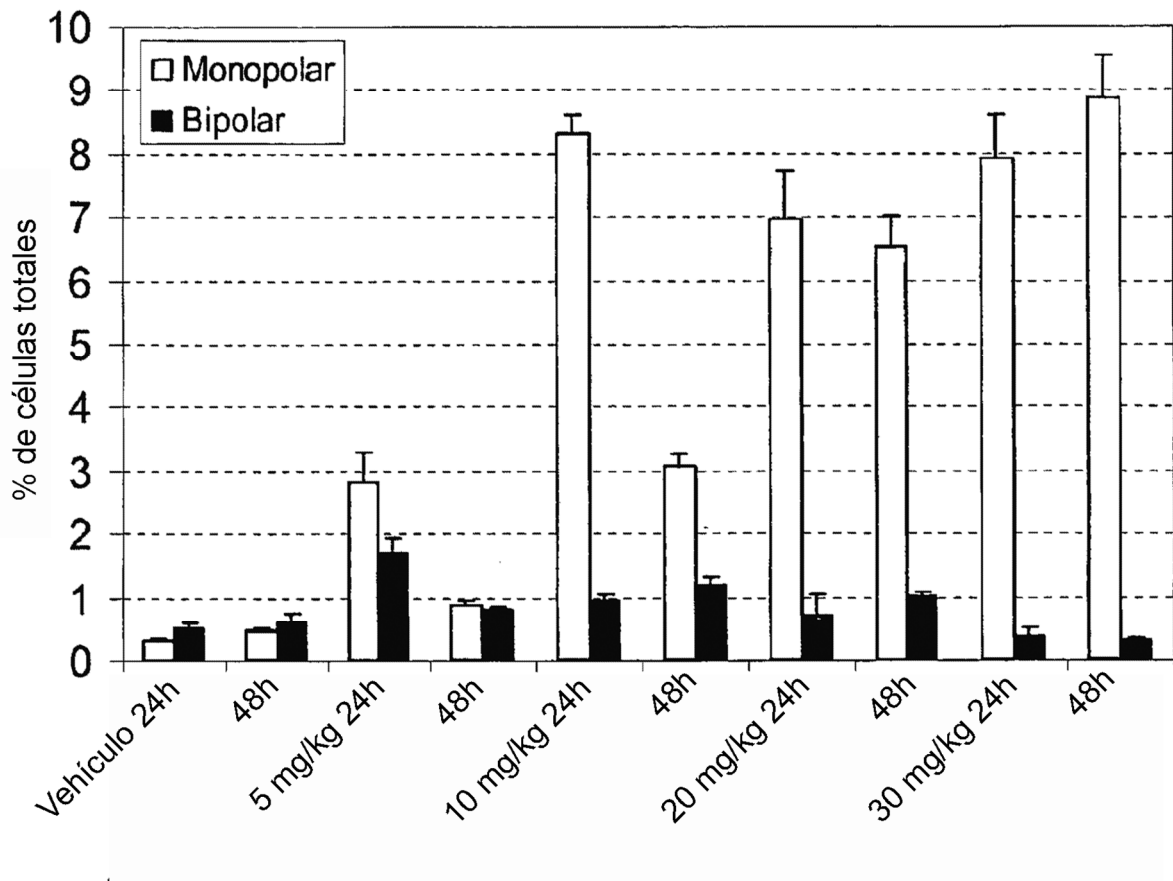


Figura 9

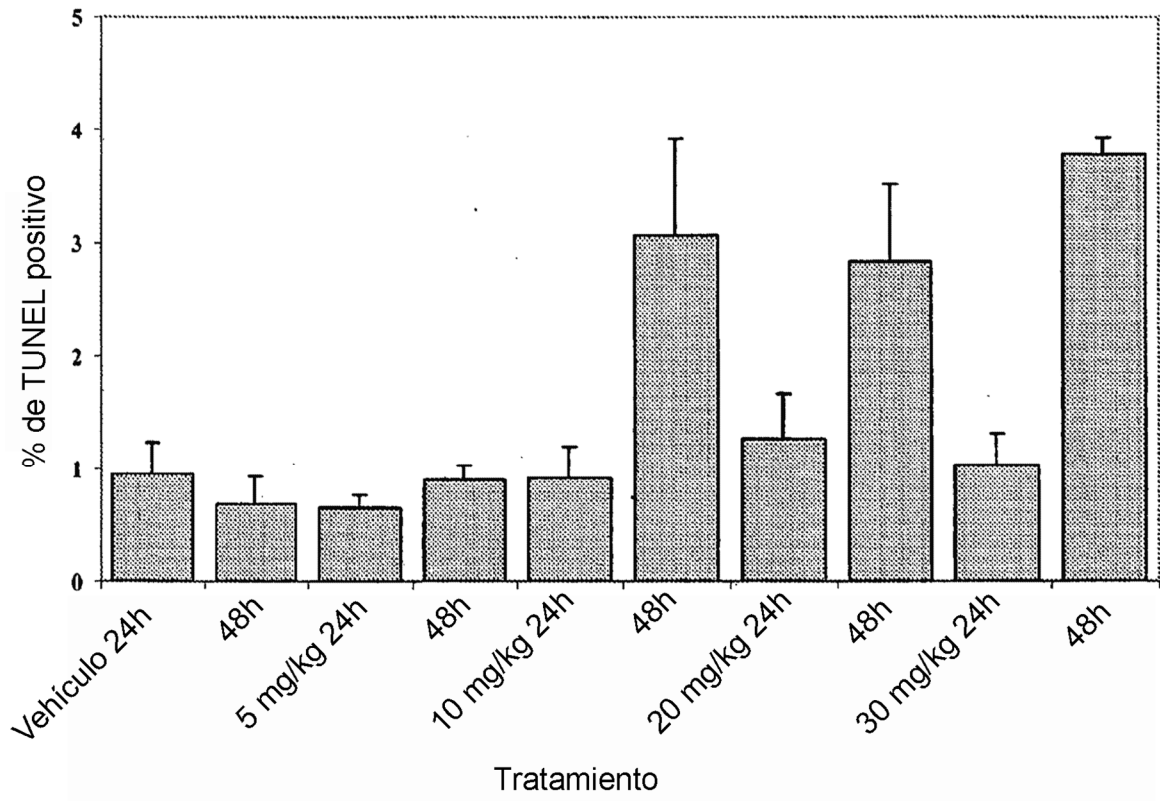


Figura 10

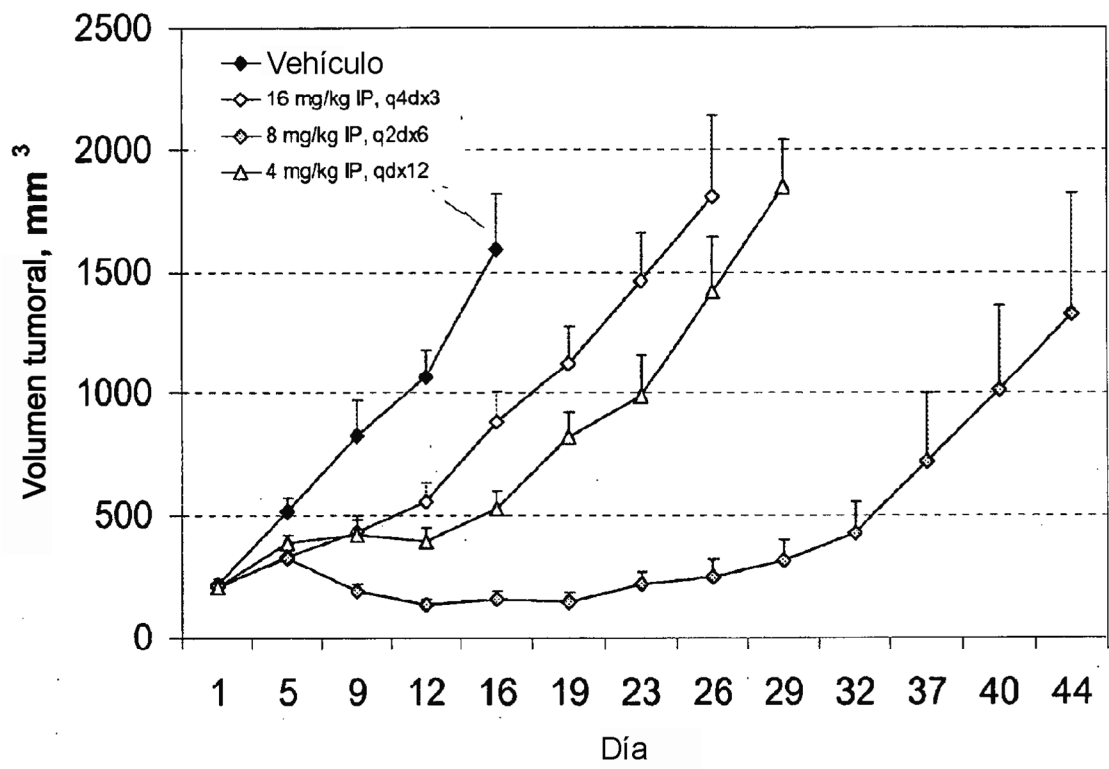


Figura 11

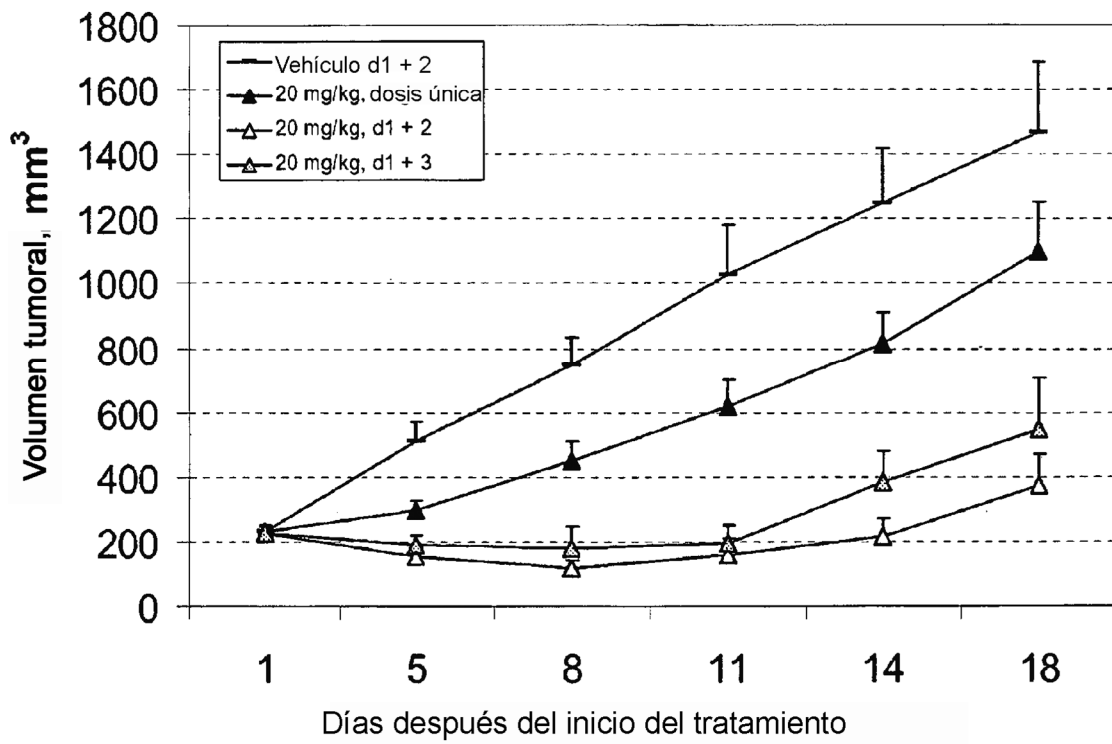


Figura 12

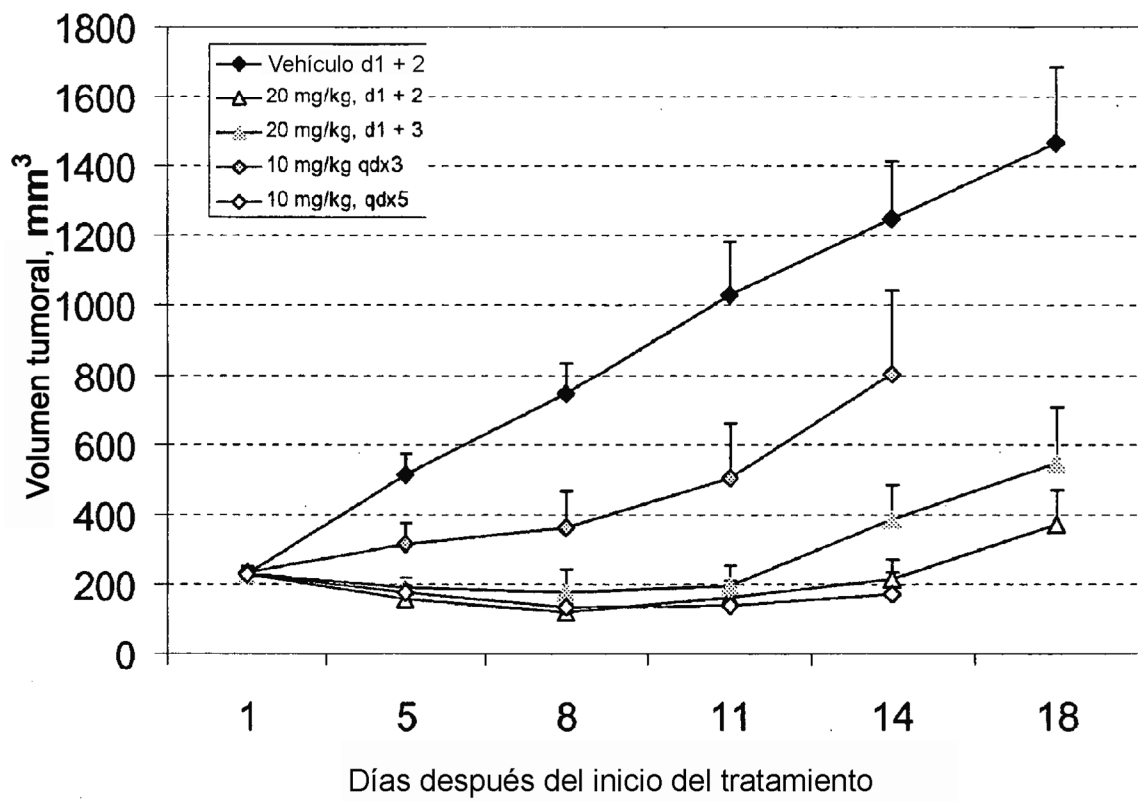


Figura 13

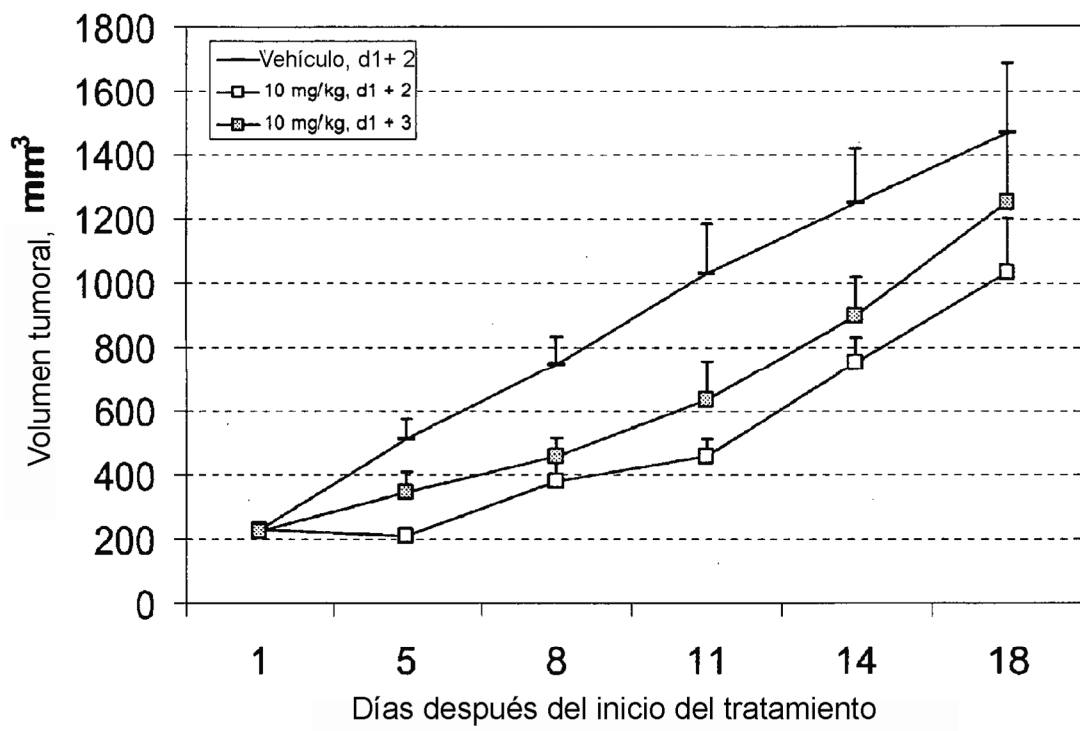


Figura 14

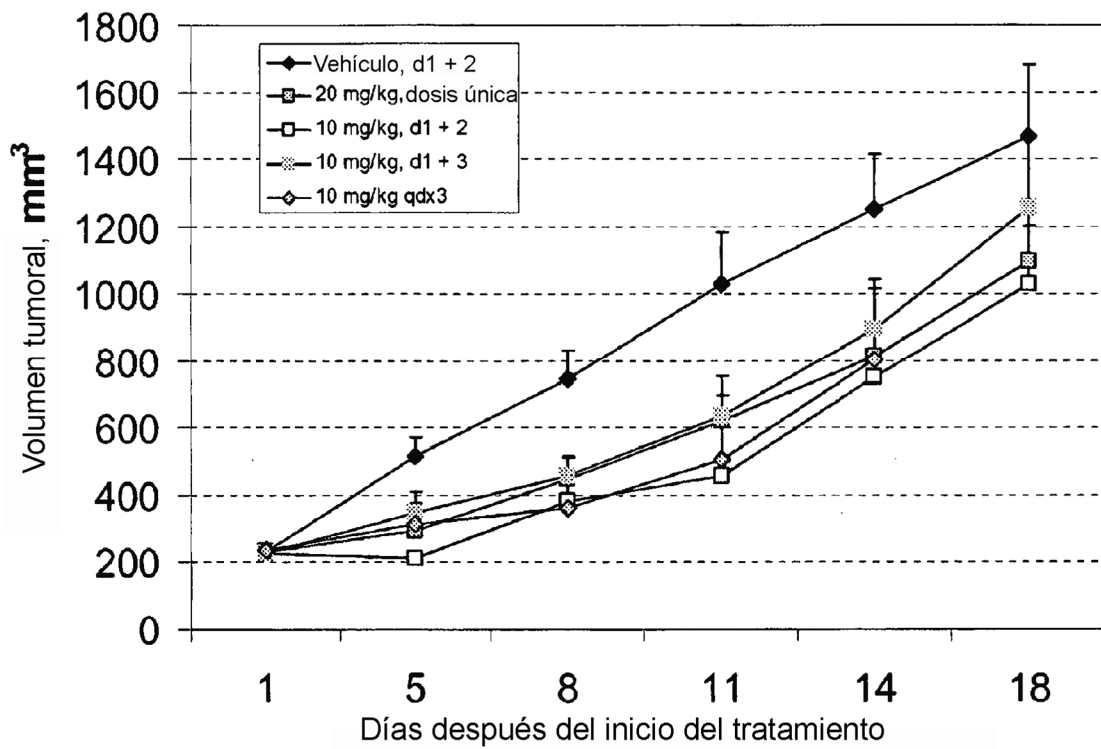


Figura 15

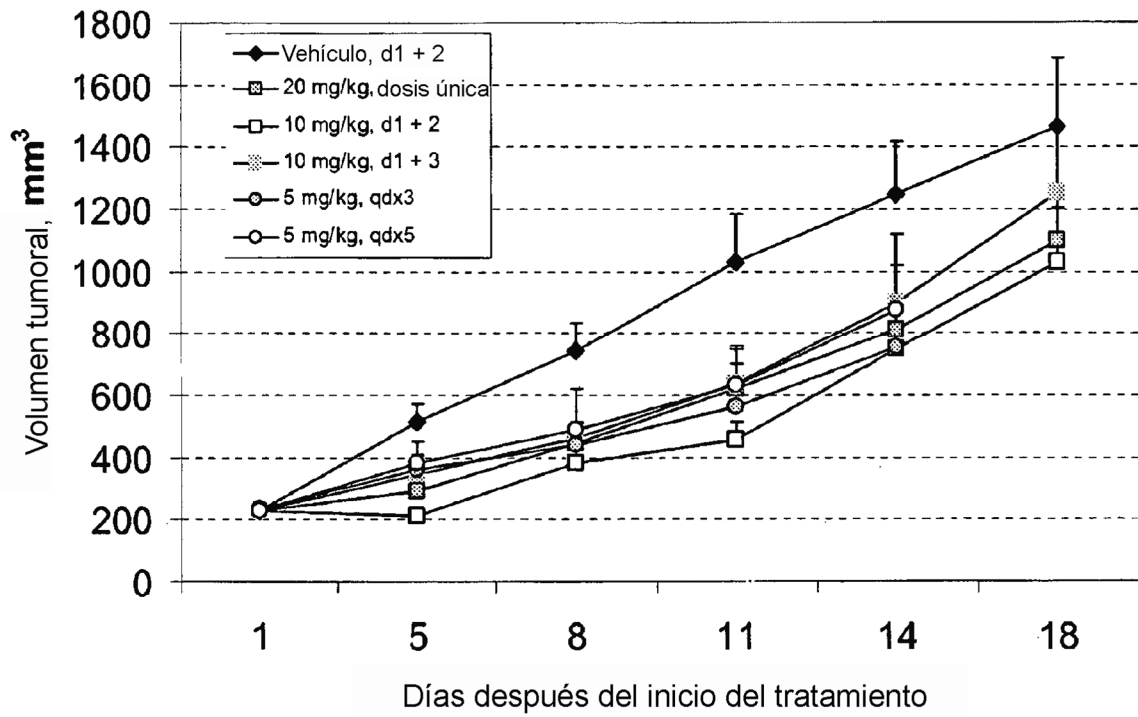


Figura 16

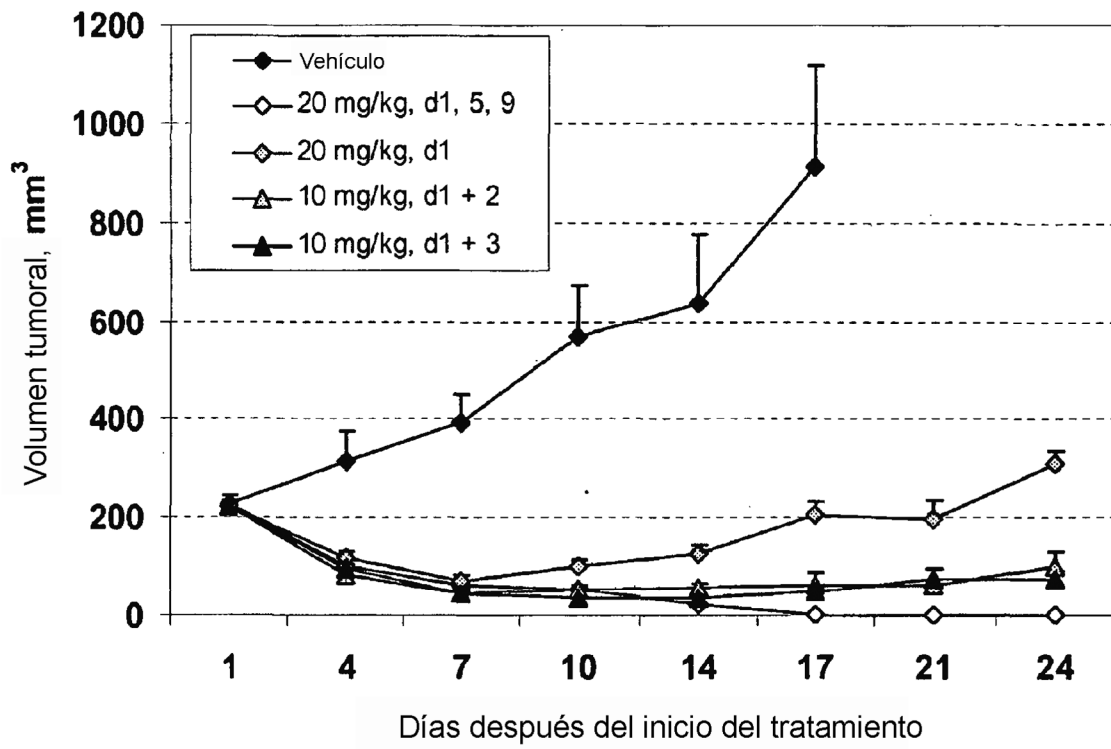


Figura 17

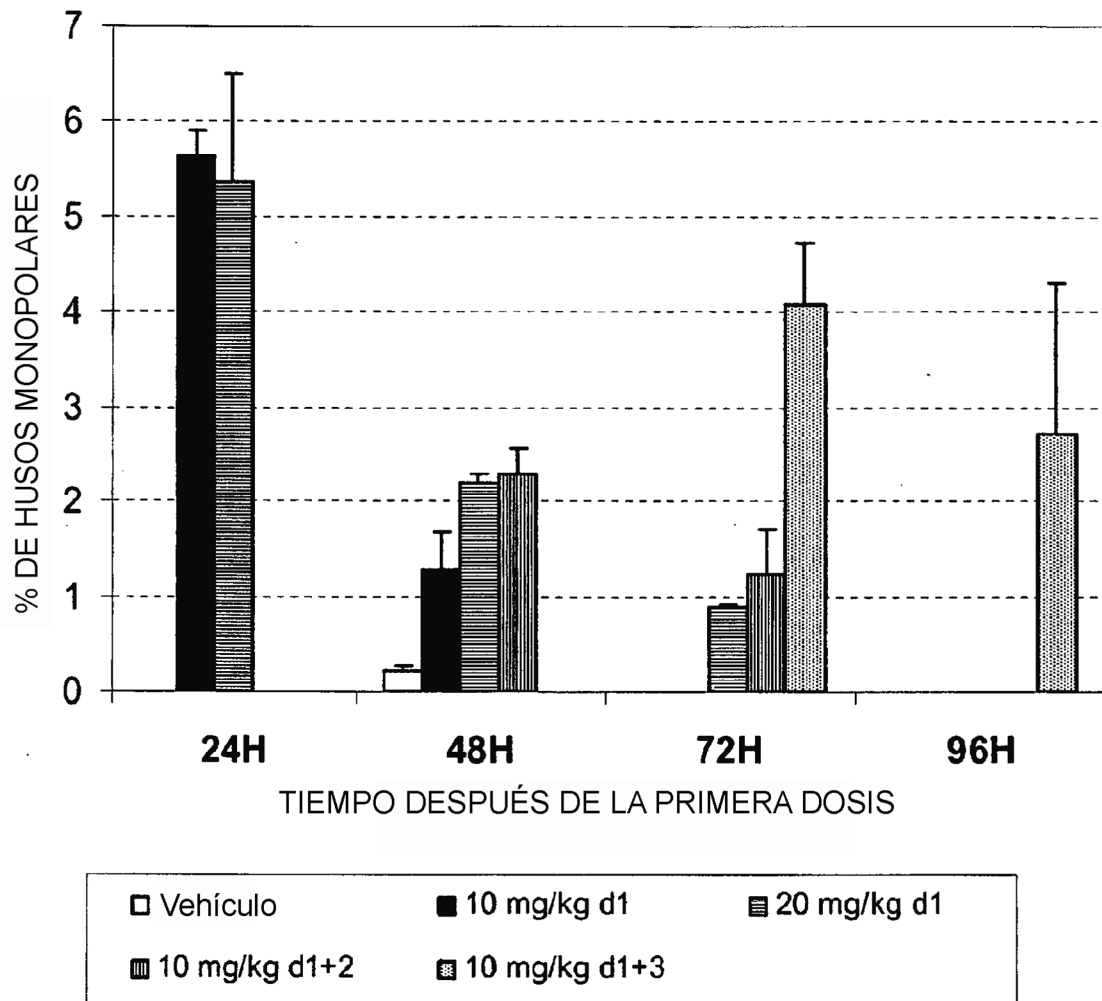


Figura 18

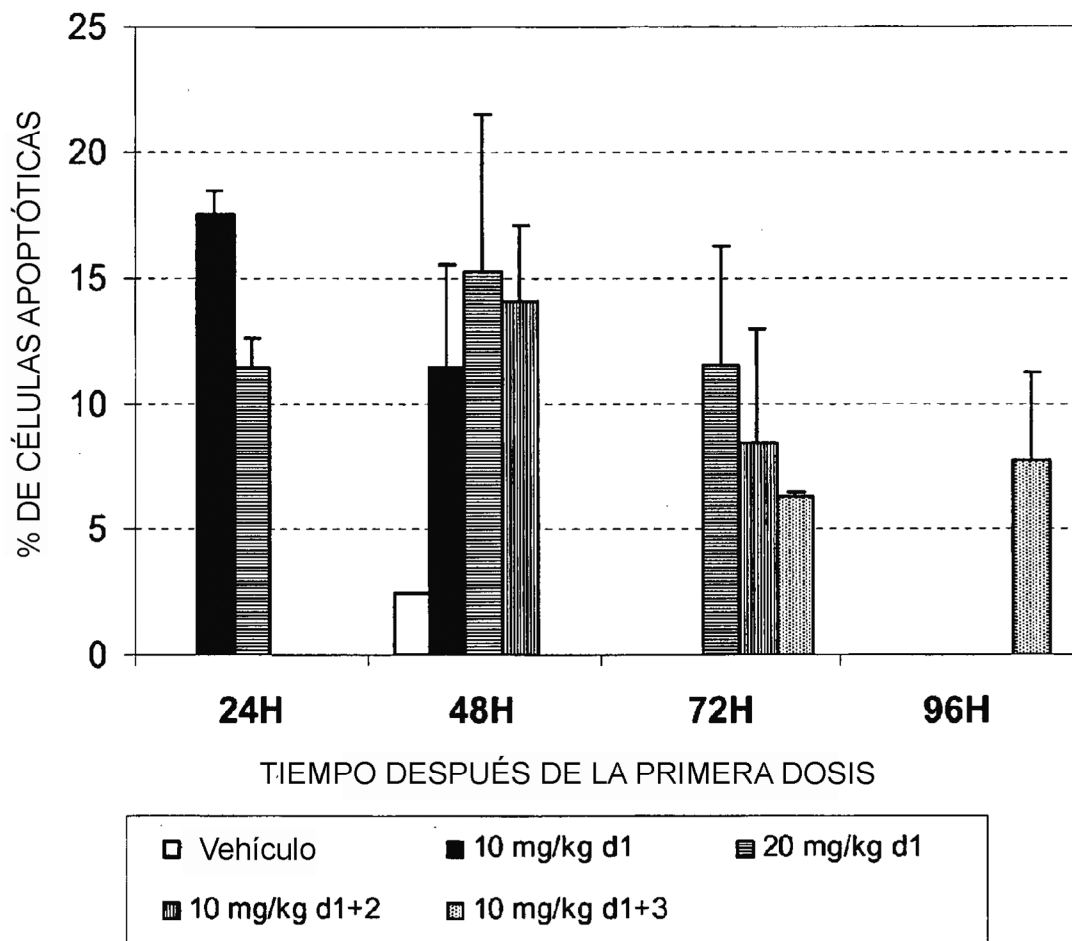


Figura 19

