

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 425**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/325** (2006.01) **A61K 31/4188** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01) **A61K 31/495** (2006.01)  
**C07C 35/18** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 31/415** (2006.01)  
**C07D 231/12** (2006.01)  
**C07D 487/04** (2006.01)  
**C07D 207/26** (2006.01)  
**A61N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2011 E 15153140 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2883543**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden carbamatos de alcohol perilílico**

30 Prioridad:

**27.08.2010 US 377747 P**  
**04.04.2011 US 201161471402 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.04.2017**

73 Titular/es:

**NEONC TECHNOLOGIES INC. (100.0%)**  
**10524 S. La Cienega Blvd.**  
**Inglewood, CA 90304, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, THOMAS;**  
**LEVIN, DANIEL y**  
**PUPALLI, SATISH**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 610 425 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

Composiciones farmacéuticas que comprenden carbamatos de alcohol perilílico

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a derivados de POH. La presente invención se refiere además a métodos para usar derivados de POH tales como carbamatos de POH para tratar el cáncer.

### Antecedentes de la invención

10 Los gliomas malignos, la forma más frecuente de cáncer del sistema nervioso central (SNC), se consideran hoy en día esencialmente incurables. Entre los diferentes gliomas malignos, los astrocitomas anaplásicos (grado III) y el glioblastoma multiforme (GBM; grado IV) tienen un pronóstico especialmente malo debido a su crecimiento agresivo y su resistencia a los tratamientos disponibles en la actualidad. El tratamiento de referencia actual para los gliomas malignos consiste en intervención quirúrgica, radiación ionizante y quimioterapia. A pesar de los avances recientes de la medicina, en los últimos 50 años no se ha observado ninguna mejoría significativa del pronóstico de los gliomas malignos. Wen et al. «Malignant gliomas in adults». *New England J. Med.* 359: 492-507, 2008. Stupp et al. «Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma». *New England J. Med.* 352: 987-996, 2005.

15 El documento de EE.UU. 2002/177609 describe una composición que comprende un carbamato de alcohol graso conjugado a un agente terapéutico tal como el agente alquilante de ADN temozolomida, utilizado para tratar cánceres en humanos.

20 La mala respuesta de los tumores, entre ellos los gliomas malignos, a diferentes tipos de agentes quimioterapéuticos a menudo se debe a la resistencia intrínseca a los fármacos. Adicionalmente, la resistencia adquirida de los tumores que responden bien en el inicio y los efectos secundarios indeseados son otros problemas que frustran con frecuencia el tratamiento a largo plazo con agentes quimioterapéuticos. Así pues, se han preparado diferentes análogos de agentes quimioterapéuticos en un intento de superar estos problemas. Los análogos incluyen nuevos agentes terapéuticos que son moléculas híbridas de al menos dos agentes terapéuticos ya existentes. Por ejemplo, el cisplatino se ha conjugado con complejos de Pt-(II) con cofármacos citotóxicos, o se ha conjugado con componentes lanzadera bioactivos, tales como porfirinas, ácidos biliares, hormonas o moduladores que aceleran el transporte transmembranario o la acumulación del fármaco en el interior de la célula. Los complejos de (6-aminometilnicotinato)dichloruroplatino(II) esterificados con alcoholes terpénicos se analizaron en un panel de líneas de células tumorales de humano. Los grupos terpenilo de estos complejos realizan una función de lanzadera transmembranaria e incrementan la velocidad de la captación, y la cantidad capturada, de estos conjugados en diferentes líneas de células tumorales. Schobert et al. «Monoterpenes as Drug Shuttles: Cytotoxic (6-aminomethylnicotinate) dichloridoplatinum(II) Complexes with Potential to Overcome Cisplatin Resistance». *J. Med. Chem.* 2007, 50, 1288-1293.

35 El alcohol perilílico (POH), un monoterpreno que se produce en la naturaleza, se ha sugerido que es un agente eficaz contra una serie de cánceres, que incluyen cáncer del SNC, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, melanomas y cáncer de colon. Gould, M. «Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes». *Environ Health Perspect.* Junio de 1997; 105 (supl. 4): 977-979. Se prepararon moléculas híbridas que contenían tanto alcohol perilílico como retinoides para incrementar la actividad inductora de la apoptosis. Das et al. «Design and synthesis of potential new apoptosis agents: hybrid compounds containing perillyl alcohol and new constrained retinoids». *Tetrahedron Letters* 2010, 51, 1462-1466.

40 Todavía existe la necesidad de preparar derivados de alcohol perilílico, que incluyen el alcohol perilílico conjugado a otros agentes terapéuticos, y de utilizar este material para el tratamiento de los cánceres, tales como los gliomas malignos, así como otros trastornos cerebrales, tales como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer. Los derivados del alcohol perilílico se pueden administrar solos (monoterapia) o en combinación (politerapia) con otros métodos de tratamiento, que incluyen radiación, quimioterapia estándar e intervención quirúrgica. La administración también puede realizarse por diferentes vías, entre ellas las vías intranasal, oral, oral-traqueal para la administración pulmonar, y transdérmica.

### Compendio de la invención

50 La presente invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende un carbamato de alcohol perilílico. El carbamato de alcohol perilílico es alcohol perilílico conjugado con temozolomida (TMZ). El carbamato de alcohol perilílico es éster de ácido 3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carbonil-carbámico y 4-isopropenilciclohex-1-enilmetilo.

55 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria descriptiva se podrían administrar antes, durante o después de la radiación. Las composiciones farmacéuticas se podrían administrar antes, durante o después de la administración de un agente quimioterapéutico. Las vías de administración de las composiciones farmacéuticas incluyen inhalación o administración intranasal, oral, intravenosa, subcutánea o intramuscular.

La descripción proporciona además un método para tratar una enfermedad en un mamífero, que comprende la etapa de introducir en el mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un carbamato de alcohol perilílico. El método podría además comprender la etapa de tratar el mamífero con radiación y/o podría además comprender la etapa de administración de un agente quimioterapéutico al mamífero. Las enfermedades tratadas podrían ser cáncer, que incluye un tumor del sistema nervioso, tal como un glioblastoma. Las vías de administración del carbamato de alcohol perilílico incluyen la inhalación o la administración intranasal, oral, intravenosa, subcutánea o intramuscular.

La presente invención también da a conocer un procedimiento para fabricar un carbamato de POH, que comprende la etapa de hacer reaccionar un primer reactante de cloroformiato de perililo con un segundo reactante, oftemozolomida (TMZ). El cloroformiato de perililo también se podría preparar al hacer reaccionar el alcohol perilílico con fosgeno.

### Breve descripción de los dibujos

En la figura 1 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT que demuestran la eficacia de la temozolomida (TMZ) a la hora de destruir las células de glioma humano U87, A172 y U251.

En la figura 2 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT que demuestran la eficacia del conjugado POH-TMZ a la hora de destruir las células de glioma humano U87, A172 y U251 de acuerdo con la presente invención.

En la figura 3 se muestran los resultados de un ensayo de formación de colonias (EFC) que demuestra el efecto citotóxico de la TMZ y de TMZ-POH en las células U251 sensibles a la TMZ (U251) y en las resistentes a la TMZ (U251TR).

En la figura 4 se muestran los resultados de un ensayo de formación de colonias (EFC) que demuestra el efecto citotóxico del POH en las células U251 sensibles a la TMZ (U251) y en las resistentes a la TMZ (U251TR).

En la figura 5 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT que demuestran la eficacia del conjugado POH-TMZ a la hora de destruir las células U251, las células U251TR y los astrocitos normales.

En la figura 6 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT que demuestran la eficacia del conjugado POH-TMZ a la hora de destruir los astrocitos normales, las células endoteliales cerebrales (BEC, por su nombre en inglés; confluentes y subconfluentes) y las células endoteliales cerebrales tumorales (TuBEC, por su nombre en inglés).

En la figura 7 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT que demuestran la eficacia de la TMZ y del conjugado POH-TMZ a la hora de destruir las células madre cancerosas de glioma USC-04.

En la figura 8 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT que demuestran la eficacia del POH a la hora de destruir las células madre cancerosas de glioma USC-04.

En la figura 9 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT que demuestran la eficacia de la TMZ y del conjugado POH-TMZ a la hora de destruir las células madre cancerosas de glioma USC-02.

En la figura 10 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT que demuestran la eficacia del POH a la hora de destruir las células madre cancerosas de glioma USC-02.

En la figura 11 se muestra una transferencia de tipo Western que demuestra que TMZ-POH induce la sobrecarga del RE (SRE) en las células de glioma U251 sensibles («U251-TMZs») y resistentes («U251-TMZr») a la TMZ.

### Descripción detallada de la invención

La presente descripción da a conocer un derivado monoterpénico o sesquiterpénico, tal como un derivado de alcohol perilílico. La presente descripción también da a conocer una composición farmacéutica que comprende un derivado monoterpénico o sesquiterpénico, tal como un derivado de alcohol perilílico. Por ejemplo, el derivado del alcohol perilílico puede ser un carbamato de alcohol perilílico. El derivado de alcohol perilílico puede ser alcohol perilílico conjugado con un agente terapéutico tal como un agente quimioterapéutico. El derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) se podría formular en una composición farmacéutica, en la que el derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) está presente en cantidades que oscilan de aproximadamente el 0,01% (p/p) a aproximadamente el 100% (p/p), de aproximadamente el 0,1% (p/p) a aproximadamente el 80% (p/p), de aproximadamente el 1% (p/p) a aproximadamente el 70% (p/p), de aproximadamente el 10% (p/p) a aproximadamente el 60% (p/p) o de aproximadamente el 0,1% (p/p) a aproximadamente el 20% (p/p). Las presentes composiciones se pueden administrar en monoterapia o se podrían coadministrar junto con radiación u otro agente (p. ej., un agente quimioterapéutico), para tratar una enfermedad, tal como el cáncer. Los tratamientos podrían ser secuenciales, con el derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) administrándose antes o después de la administración de otros agentes. Por ejemplo, un carbamato de alcohol perilílico se podría utilizar para sensibilizar a un paciente con cáncer a la radiación o a la quimioterapia. Como alternativa, los agentes se podrían administrar a la vez. La vía de administración podría variar y puede incluir la inhalación o la inyección intranasal, oral, transdérmica, intravenosa,

subcutánea o intramuscular. La presente descripción también da a conocer un método para tratar una enfermedad, tal como cáncer, que comprende la etapa de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del derivado monoterpénico (o sesquiterpénico).

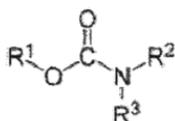
5 Las composiciones de la presente descripción pueden contener uno o más tipos de derivados monoterpénicos (o sesquiterpénico). Los monoterpenos incluyen terpenos que consisten en dos unidades de isopreno. Los monoterpenos pueden ser lineales (acíclicos) o contener anillos. Los derivados de monoterpénicos también está abarcados por la presente descripción. Los monoterpénicos se pueden producir mediante modificaciones bioquímicas tales como oxidación o reorganización de monoterpenos. Los ejemplos de monoterpenos y  
 10 monoterpénicos incluyen, alcohol perilílico (S(-) y (R(+)), ocimeno, mirceno, geraniol, citral, citronelol, citronelal, linalool, pineno, terpineol, terpineno, limoneno, terpinenos, felandrenos, terpinoleno, terpinen-4-ol (o aceite de árbol de te), pineno, terpineol, terpineno; los terpenoides tales como *p*-cimeno que se derivada de terpenos monocíclicos, tales como mentol, timol y carvacrol; monoterpénicos bicíclicos, tales como alcanfor, borneol y eucaliptol.

15 Los monoterpenos se pueden distinguir por la estructura de un esqueleto de carbono y se pueden agrupar en monoterpenos acíclicos (p.ej., mirceno, (Z)- y (E)-ocimeno, linalool, geraniol, nerol, citronelol, mircenol, geranial, citral a, neral, citral b, citronelal, etc.), monoterpenos monocíclicos (p.ej., limoneno, terpineno, felandreno, terpinoleno, mentol, carveol, etc.), monoterpenos bicíclicos (p. ej., pineno, mirtenol, mirtenal, verbanol, verbanon, pinocarveol, careno, sabineno, canfeno, tujeno, etc.) y monoterpenos tricíclicos (p.ej. tricicleno). Véase Encyclopedia of Chemical Technology, Cuarta Edición, Volumen 23, page 834-835.

20 Los sesquiterpenos de la presente descripción incluyen terpenos que consisten en tres unidades de isopreno. Los sesquiterpenos pueden ser lineales (acíclicos) o contener anillos. Los derivados de sesquiterpenoides también están englobados en la presente descripción. Los sesquiterpenoides se pueden producir mediante modificaciones bioquímicas tales como oxidación o reorganización de sesquiterpenos. Los ejemplos de sesquiterpenos incluyen farnesol, farnesal, ácido farnesílico y nerolidol.

25 Los derivados monoterpénicos (o sesquiterpénicos) incluyen, pero no se limitan a ellos, carbamatos, ésteres, éteres, alcoholes y aldehídos del monoterpeno (o sesquiterpeno). Los alcoholes de monoterpeno (o sesquiterpeno) se puede derivatizar a carbamatos, ésteres, éteres, aldehídos o ácidos.

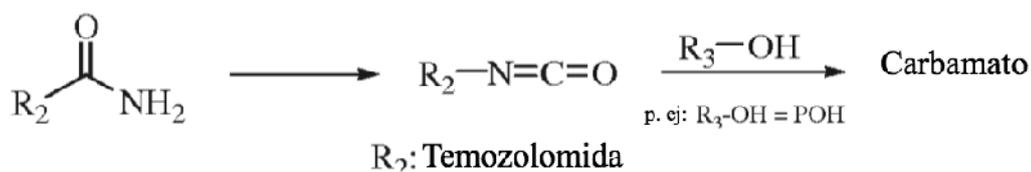
El término carbamato se refiere a una clase de compuestos químicos que comparten el grupo funcional



30 basado en un grupo carbonilo flanqueado por un oxígeno y un nitrógeno. R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> puede ser un grupo, tal como alquilo, arilo, etc., que puede tener alguna sustitución. Los grupos R del nitrógeno y el oxígeno podrían formar un anillo. El R<sup>1</sup>-OH podría ser un monoterpeno, p. ej., POH. El resto R<sup>2</sup>-N-R<sup>3</sup> podría ser un agente terapéutico.

35 Los carbamatos se podrían sintetizar al hacer reaccionar isocianato y alcohol, o al hacer reaccionar cloroformiato con amina. Los carbamatos se podrían sintetizar gracias a reacciones que utilizan fosgeno o equivalentes del fosgeno. Por ejemplo, los carbamatos se podrían sintetizar al hacer reaccionar gas de fosgeno, difosgeno o un precursor sólido del fosgeno, tal como trifosgeno, con dos aminas, o una amina y un alcohol. Los carbamatos (también conocidos como uretanos) también se pueden generar con la reacción de un intermedio de urea con un alcohol. El carbonato de dimetilo y el carbonato de difenilo también se utilizan para fabricar carbamatos. Como  
 40 alternativa, los carbamatos se podrían sintetizar a través de la reacción de alcohol y/ precursores de amina con un carbonato de diarilo con sustituciones en éster, tal como carbonato de bismetilsalicilo (BMSC, por su nombre en inglés). Publicación de patente de los EE. UU. n.º 20100113819.

Los carbamatos se pueden sintetizar por la siguiente aproximación:



45 Los solventes de reacción idóneos incluyen, pero sin limitarse a ellos, diclorometano, dicloroetano, tolueno, éter diisopropílico y tetrahidrofurano. La reacción se podría llevar a cabo a una temperatura que oscila de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 110 °C, o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 80 °C, o aproximadamente a 50 °C. La proporción molar de alcohol perilílico por el sustrato R-N=C=O podría oscilar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 2:1, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1,5:1, de

aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:1, o de aproximadamente 1,05:1 a aproximadamente 1,1:1.

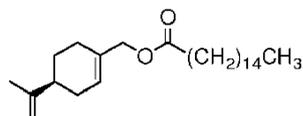
Los ésteres de los alcoholes de monoterpreno (o sesquiterpreno) de la presente descripción se pueden derivar de un ácido inorgánico o un ácido orgánico. Los ácidos inorgánicos incluyen, pero no se limitan a ellos, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido nítrico. Los ácidos orgánicos incluyen, pero no se limitan a ellos, ácido carboxílico tal como ácido benzoico, ácido graso, ácido acético y ácido propiónico, y cualquier agente terapéutico que tiene al menos un grupo funcional ácido carboxílico. Ejemplos de ésteres de alcoholes de monoterpreno (o sesquiterpreno) incluyen, pero no se limitan a ellos, ésteres de ácido carboxílico (tales como ésteres benzoato, ésteres de ácido grado (p.ej., éster de palmitato, éster de linoleato, éster de estearato, éster butirílico y éster de oleato), acetatos, propionatos (o propanoatos), y formiatos), fosfatos, sulfatos y carbamatos (p.ej., N,N-dimetilaminocarbonilo). Wikipedia - Ester. Recuperado de URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ester>.

Un ejemplo específico de un monoterpreno como se describe en la presente memoria es alcohol perilílico (comúnmente abreviado como POH). Los derivados de alcohol perilílico incluyen, carbamatos de alcohol perilílico, ésteres de alcohol perilílico, aldehídos perilílicos, ácido dihidroperilílico, ácido perilílico, derivados de aldehído perilílico, ésteres de ácido dihidroperilílico y ésteres de ácido perilílico. Los derivados de alcohol perilílico también pueden incluir sus derivados de adición oxidativa nucleófila/electrófila. Publicación de Patente de EE.UU No. 20090031455, Patentes de EE.UU. Nos. 6.133.324 y 3.957.856. Se recogen muchos ejemplos de derivados de alcohol perilílico en la bibliografía de química (véase apéndice A: CAS Scifinder search output file, recuperado el 25 de enero de 2010).

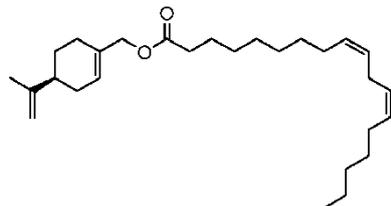
En una realización, se sintetiza un carbamato de POH mediante un procedimiento que comprende la etapa de hacer reaccionar un primer reactante de cloroformiato de perililo con un segundo reactante, tal como temozolomida (TMZ). La reacción se podría llevar a cabo en presencia de tetrahidrofurano y una base, tal como n-butil-litio. El cloroformiato de perililo se podría fabricar al hacer reaccionar el POH con fosgeno. Por ejemplo, el POH conjugado con temozolomida a través de un enlace de carbamato se podría sintetizar al hacer reaccionar la temozolomida con cloruro de oxalilo seguido de la reacción con el alcohol perilílico. La reacción se podría llevar a cabo en presencia de 1,2-dicloroetano.

Los carbamatos de POH abarcados por la presente invención incluyen éster de ácido (3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carbonil)carbámico y 4-isopropenilciclohex-1-enilmetilo. Los detalles de las reacciones químicas que generan este compuesto se describen en los ejemplos que vienen a continuación.

En cierto aspectos de la descripción, los derivados de alcohol perilílico pueden ser ésteres de ácido graso de alcohol perilílico, tal como éster palmitoilo de POH y éster linoleoilo de POH, cuyas estructuras químicas se muestran a continuación:



Éster de ácido hexadecanoico y 4-isopropenil-ciclohex-1-enilmetilo (éster palmitoilo de POH)



Éster de ácido octadeca-9,12-dienoico y 4-isopropenil-ciclohex-1-enilmetil (éster lineoilo de POH).

El derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) puede ser un monoterpreno (o sesquiterpreno) conjugado con un agente terapéutico. Un conjugado de monoterpreno (o sesquiterpreno) que abarca la presente descripción es una molécula que tiene un monoterpreno (o sesquiterpreno) unido covalentemente a través de un grupo químico enlazante a un agente terapéutico. La proporción molar del monoterpreno (o sesquiterpreno) al agente terapéutico en el conjugado de monoterpreno (o sesquiterpreno) puede ser 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 2:1, 3:1, 4:1 o cualesquiera otras proporciones molares idóneas. El monoterpreno (o sesquiterpreno) y el agente terapéutico pueden estar unidos covalentemente a través de enlaces carbamato, éster, éter o cualesquiera otros grupos funcionales químicos adecuados. Cuando el monoterpreno (o sesquiterpreno) y el agente terapéutico están conjugados a través de un enlace carbamato, el agente terapéutico puede ser cualquier agente que lleve al menos un grupo funcional de ácido carboxílico o cualquier agente que lleve al menos un grupo funcional de amina. Como ejemplo, un conjugado de alcohol perilílico es el alcohol perilílico unido covalentemente a través de un grupo químico enlazante a un agente quimioterapéutico.

Según la presente invención, el agente terapéutico es temozolomida (TMZ).

La pureza de los derivados monoterpénicos (o sesquiterpénicos) se podría analizar por cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Otras técnicas para analizar la pureza de los derivados monoterpénicos (o sesquiterpénicos) y para determinar la presencia de las impurezas incluyen, pero sin limitarse a ellas, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (MS), GC-MS, espectroscopia de infrarrojos (IR) y cromatografía en capa fina (TLC). La pureza quiral se puede valorar por GC quiral o con la medición de la rotación óptica.

Los derivados monoterpénicos (o sesquiterpénicos) se podrían purificar por métodos tales como la cristalización o mediante la separación del derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) de las impurezas de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas únicas (p. ej., solubilidad o polaridad) del derivado. Por consiguiente, el derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) se puede separar del monoterpene mediante las técnicas de separación idóneas conocidas en el campo, tales como cromatografía preparativa, destilación (fraccionada) o cristalización (fraccionada).

La presente descripción también proporciona métodos para utilizar derivados monoterpénicos (o sesquiterpénicos) para tratar una enfermedad, tal como el cáncer u otros trastornos del sistema nervioso. Un derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) se podría administrar en monoterapia, o en combinación con radiación, intervención quirúrgica o agentes quimioterapéuticos. Un derivado monoterpénico o sesquiterpénicos también se podría coadministrar con antiviricos, antiinflamatorios o antibióticos. Los agentes se podrían administrar a la vez o secuencialmente. Un derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) se puede administrar antes, durante o después de la administración del otro u otros agentes activos.

El derivado monoterpénico o sesquiterpénico se podría utilizar en combinación con la radioterapia. En una realización, la presente descripción proporciona un método para tratar las células tumorales, tales como las células de glioma maligno, con radiación, en donde las células se tratan con una cantidad eficaz de un derivado monoterpénico, tal como un carbamato de alcohol perillílico, y a continuación se exponen a la radiación. El tratamiento con el derivado monoterpénico podría ser antes, durante y/o después de la radiación. Por ejemplo, el derivado monoterpénico o sesquiterpénico se podría administrar de forma continua empezando una semana antes del inicio de la radioterapia y continuarlo durante dos semanas después de terminar la radioterapia. Patentes de los EE. UU. n.ºs 5.587.402 y 5.602.184.

En una realización, la presente descripción proporciona un método para tratar las células tumorales, tales como las células de glioma maligno, con quimioterapia, en donde las células se tratan con una cantidad eficaz de un derivado monoterpénico, tal como un carbamato de alcohol perillílico, y a continuación se exponen a la quimioterapia. El tratamiento con el derivado monoterpénico podría ser antes, durante y/o después de la quimioterapia.

Los derivados de monoterpene (o sesquiterpene) se pueden usar para el tratamiento de cánceres del sistema nervioso, tal como un glioma maligno (p. ej., astrocitoma, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme), retinoblastoma, astrocitomas polocíticos (grado I), meningiomas, tumores de cerebro metastásicos, neuroblastoma, adenomas de pituitaria, meningiomas de base de cráneo y cáncer de base de cráneo. Según se usa en la presente memoria "tumores del sistema nervioso" se refiere a una condición en la que un sujeto tiene una proliferación maligna de células del sistema nervioso.

Los cánceres que se pueden tratar con los derivados monoterpénicos (o sesquiterpénicos) descritos en la presente memoria, incluyen, pero sin limitarse a ellos, cáncer de pulmón, de oído, de nariz y de garganta, leucemia, cáncer de colon, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer mamario, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer hematopoyético, cáncer de ovario, carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares; cáncer de vejiga; cáncer de hueso; cáncer de mama; cáncer cervicouterino; coriocarcinoma; cáncer de colon y de recto; cáncer del tejido conjuntivo; cáncer del aparato digestivo; cáncer de endometrio; cáncer de esófago; cáncer del ojo; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de estómago; neoplasia intraepitelial; cáncer de riñón; cáncer de laringe; leucemia que incluye leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica; cáncer de hígado; linfoma entre ellos el linfoma de Hodgkin y no de Hodgkin; mieloma; fibroma; neuroblastoma; cáncer de la cavidad oral (p. ej., labios, lengua, boca y faringe); cáncer de ovario; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; retinoblastoma; rabdomiosarcoma; cáncer rectal; cáncer de riñón; cáncer del aparato respiratorio; sarcoma; cáncer de piel; cáncer de estómago; cáncer de testículo; cáncer de tiroides; cáncer de útero; cáncer del aparato urinario, así como otros carcinomas y sarcomas. Patente de los EE. UU. n.º 7.601.355.

La presente descripción también proporciona métodos para tratar trastornos del SNC, incluyendo sin limitación trastornos neurológicos degenerativos primarios, tales como Alzheimer, Parkinson, trastornos psicológicos, psicosis y depresión. El tratamiento puede consistir en el uso de un derivado monoterpénico o sesquiterpénico solo o en combinación con medicaciones usadas actualmente en el tratamiento de trastornos de Parkinson, Alzheimer, o trastornos psicológicos.

La presente descripción también proporciona un método para mejorar las respuestas a la terapia inmunomoduladora, que comprende las etapas de exponer células a una cantidad eficaz de un derivado monoterpénico o sesquiterpénico, tal como un carbamato de alcohol perillílico, antes o durante el tratamiento

inmunomodulatorio. Por ejemplo, los agentes inmunomoduladores son citosinas, tales como interleucinas, linfocinas, monocinas, interferones y quimiocinas.

La presente composición se podría administrar mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, sin limitación, la administración intranasal, oral, transdérmica, ocular, intraperitoneal, inhalación, intravenosa, ICV, inyección intracisternal o infusión, administración subcutánea, implante, administración vaginal, sublingual, uretral (p. ej., supositorio uretral), subcutánea, intramuscular, intravenosa, rectal, sublingual, mucosa, oftálmica, espinal, intratecal, intraarticular, intraarterial, subaracnoidea, bronquial y linfática. La formulación tópica podría ser en forma de gel, ungüento, crema, aerosol, etc.; la formulación intranasal se podría introducir como una pulverización o en una gota; la formulación transdérmica se podría administrar a través de un parche transdérmico o iontoforesis; la formulación para inhalación se puede administrar con un nebulizador o un dispositivo similar. Las composiciones también pueden tomar la forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación prolongada, soluciones, suspensiones, elixires, aerosoles o cualquier otra composición adecuada.

Para preparar tales composiciones farmacéuticas, uno o varios de los derivados monoterpénicos (o sesquiterpénicos) se podrían mezclar con un vehículo, adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, de acuerdo con las técnicas farmacéuticas convencionales de formulación. Los vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en las presentes composiciones abarcan cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándares, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite, y diferentes tipos de agentes humectantes. Las composiciones pueden adicionalmente contener excipientes farmacéuticos sólidos, tales como almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, y similares. Los excipientes líquidos y semisólidos se podrían seleccionar de glicerol, propilenglicol, agua, etanol y diversos aceites, entre ellos los que proceden del petróleo, o de animales, de vegetales, o sintéticos; p. ej., aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, etc. Los vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables, incluyen agua, disolución salina, dextrosa acuosa y glicoles. Para ver ejemplos de vehículos, estabilizantes y adyuvantes, véase *Remington's Pharmaceutical Sciences*, editado por E. W. Martin (Mack Publishing Company, 18.<sup>a</sup> ed., 1990). Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para tratar un trastorno o enfermedad específicos, o, como alternativa, obtener una respuesta farmacológica al tratar un trastorno o enfermedad. Los métodos para determinar los medios más eficaces y la dosificación de la administración pueden variar con la composición utilizada para el tratamiento, el propósito del tratamiento, la célula que se desea tratar, y el sujeto a tratar. Las dosis del tratamiento por lo general se podrían titular para optimizar su seguridad y su eficacia. Se pueden realizar administraciones únicas o múltiples siguiendo el nivel de dosis o el patrón que seleccione el médico que lleva el tratamiento. Las formulaciones de dosis idóneas y los métodos para administrar los agentes los pueden determinar con facilidad los expertos en la técnica. Por ejemplo, la composición se administra de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Cuando los compuestos que se describen en la presente memoria se coadministran con otro agente o terapia, la cantidad eficaz podría ser menor que cuando el agente se utiliza en monoterapia.

Las formulaciones transdérmicas se podrían preparar mediante la incorporación del agente activo en un vehículo tixotrópico o gelatinoso, tal como un medio celulósico, p. ej., metilcelulosa o hidroxietilcelulosa, en donde la formulación resultante se envasa en un dispositivo transdérmico adaptado para ser seguro en contacto dérmico con la piel del usuario. Si la composición es en forma de gel, la composición se puede restregar por una membrana del paciente, por ejemplo, la piel, preferiblemente piel intacta, limpia y seca, del hombro o de la parte superior del brazo o del torso superior, y mantenerla allí durante un periodo de tiempo suficiente para que el derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) entre en el suero sanguíneo del paciente. La composición de la presente invención en forma de gel podría estar contenida en un tubo, una bolsa o una bomba calibrada. Tal tubo o bolsa podría contener una dosis unitaria o más de una dosis unitaria, de la composición. Una bomba calibrada podría ser capaz de dispensar una dosis medida de la composición.

Esta invención también da a conocer las composiciones tal y como se describen más arriba para la administración intranasal. Como tales, las composiciones pueden además comprender un potenciador de permeabilidad. Southall et al. *Developments in Nasal Drug Delivery*, 2000. El derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) se puede administrar por vía intranasal en una forma líquida, tal como una solución, una emulsión, una suspensión, gotas, o en forma sólida, tal como un polvo, gel o ungüento. Los dispositivos para administrar las medicaciones por vía intranasal se conocen bien en la técnica. La administración intranasal del fármaco se puede llevar a cabo con dispositivos que incluyen, pero sin limitarse a ellos, inhaladores intranasales, dispositivos de pulverización intranasal, atomizadores, botellas de pulverización nasal, contenedores de dosis unitarias, bombas, cuentagotas, botellas apretables atomizadoras, nebulizantes, inhaladores de dosis medidas (IDM), inhaladores de dosis presurizada, insufladores y dispositivos bidireccionales. El dispositivo para la administración nasal se puede graduar para que administre a la cavidad nasal una cantidad precisa de dosis eficaz. El dispositivo de administración nasal puede ser para la administración de una única dosis o la administración de varias dosis. En un ejemplo específico, se puede utilizar en esta invención el atomizador electrónico ViaNase de Kurve Technology (Bethell, Washington)

(<http://www.kurvetech.com>). Los compuestos de la presente invención también podrían administrarse por medio de un tubo, un catéter, una jeringuilla, una bolsita, una compresita, un tampón nasal, o por infusión submucosa. Publicaciones de patente de los EE. UU. n.ºs 20090326275, 20090291894, 20090281522 y 20090317377.

5 El derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) se puede formular como aerosoles mediante los procedimientos estándares. El derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) se podría formular con o sin solventes, y se podría formular con o sin vehículos. La formulación podría ser una solución o podría ser una emulsión acuosa con uno o varios tensioactivos. Por ejemplo, se puede generar un pulverizador de aerosoles a partir del contenedor presurizado con un propulsor adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, hidrocarburos, aire comprimido, nitrógeno, dióxido de carbono u otro gas adecuado. La unidad de dosis se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las bombas dispensadoras de aerosoles pueden dispensar una dosis medida o una dosis que tiene una partícula o un tamaño de gota específicos. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «aerosol» se refiere a una suspensión de partículas sólidas finas o gotas de solución líquida en un gas. Específicamente, un aerosol incluye una suspensión de gotas de un monoterpene (o sesquiterpene) dentro de un gas que se puede producir en cualquier dispositivo adecuado, tal como un IDM, un nebulizador o un difusor de vaho. El aerosol también incluye una composición de polvo seco de la composición de la presente invención suspendida en aire o en otro vehículo gaseoso. Gonda (1990) *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 6: 273-313. Raeburn et al. (1992) *Pharmacol. Toxicol. Methods*. 27: 143-159.

20 El derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) se podría introducir en la cavidad nasal como un polvo en una forma tal como microesferas administradas mediante un insuflador nasal. El derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) se podría absorber a una superficie sólida, por ejemplo, un vehículo. El polvo o las microesferas se podrían administrar en una forma seca dispensable por el aire. El polvo o las microesferas se podrían conservar en un contenedor o insuflador. Como alternativa, con el polvo o las microesferas se podría llenar una cápsula, tal como una cápsula de gelatina, u otra unidad de dosis única adaptada para la administración nasal.

25 La composición farmacéutica se puede administrar a la cavidad nasal mediante la colocación directa de la composición en la cavidad nasal, por ejemplo, en forma de un gel, un ungüento, una emulsión nasal, una loción, una crema, un tampón nasal, un cuentagotas o una tira bioadhesiva. En determinadas realizaciones, puede ser deseable prolongar el tiempo de permanencia de la composición farmacéutica en la cavidad nasal, por ejemplo, para mejorar la absorción. Así pues, la composición farmacéutica puede opcionalmente formularse con un polímero bioadhesivo, una goma (p. ej., goma de xantano), quitosán (p. ej., polisacárido catiónico muy purificado), pectina (o cualquier glúcido que se espesa como un gel, o que se emulsiona cuando se aplica a la mucosa nasal), una microesfera (p. ej., almidón, albúmina, dextrano, ciclodextrina), gelatina, un liposoma, carbámero, alcohol de polivinilo, alginato, goma arábica, quitosanos y/o celulosa (p. ej., metilo o propilo; hidroxilo o carboxi; carboximetilo o hidroxilpropilo).

La composición que contiene el monoterpene (o sesquiterpene) purificado se puede administrar mediante la inhalación oral en las vías respiratorias, a saber, los pulmones.

35 Los sistemas de administración típicos para los agentes inhalables incluyen inhaladores de nebulizados, inhaladores de polvo seco (IPS) e inhaladores de dosis medida (IDM).

40 Los dispositivos de nebulización producen una corriente de aire a gran velocidad que hace que un agente terapéutico en forma de líquido se pulverice como un vaho. El agente terapéutico está formulado en forma de líquido, tal como una solución o una suspensión de partículas del tamaño adecuado. En una realización, las partículas están micronizadas. El término «micronizado» se define por tener aproximadamente el 90% o más de las partículas con un diámetro de menos de aproximadamente 10 µm. Los dispositivos nebulizadores idóneos están disponibles en el mercado, por ejemplo, en PARI GmbH (Starnberg, Alemania). Otros dispositivos nebulizadores incluyen Respimat (Boehringer Ingelheim) y los descritos en, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. n.ºs 7.568.480 y 6.123.068, y la solicitud de patente internacional WO 97/12687. Los monoterpenos (o sesquiterpenos) se pueden formular para ser usados en un dispositivo nebulizador como una solución acuosa o como una suspensión líquida.

50 Los dispositivos de IPS administran típicamente un agente terapéutico en forma de un polvo suelto que se puede dispersar en una corriente de aire del paciente durante la inspiración. Los dispositivos de IPS que utilizan una fuente externa de energía también se pueden utilizar en la presente invención. Para conseguir un polvo suelto, el agente terapéutico se formulará con un excipiente idóneo (p. ej., lactosa). Una formulación de polvo seco se puede fabricar, por ejemplo, mediante la combinación de lactosa seca que tiene un tamaño de partículas entre aproximadamente 1 µm y 100 µm, con partículas micronizadas de los monoterpenos (o sesquiterpenos) y una mezcla seca. Como alternativa, el monoterpene se puede formular sin excipientes. La formulación se carga en un dispensador de polvo seco o en cartuchos o cápsulas de inhalación para ser usados con un dispositivo de administración polvo seco. Los ejemplos de dispositivos de IPS disponibles en el mercado incluyen Diskhaler (GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, N.C.) (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 5.035.237); Diskus (GlaxoSmithKline) (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 6.378.519); Turbuhaler (AstraZeneca, Wilmington, Del.) (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 4.524.769); y Rotahaler (GlaxoSmithKline) (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 4.353.365). Otros ejemplos de dispositivos de IPS idóneos se describen en las patentes de los EE. UU. n.ºs 5.415.162, 5.239.993 y 5.715.810, y las referencias en estas.

Los dispositivos de IDM descargan típicamente una cantidad medida del agente terapéutico mediante el uso de un gas propulsor comprimido. Las formulaciones para la administración con IDM incluyen una solución o suspensión del ingrediente activo en un propulsor licuado. Los ejemplos de propulsores incluyen hidrofluoroalcanos (HFA), tales como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134a) y 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoro-n-propano, (HFA 227), y clorofluorocarbonados, tales como CCl<sub>3</sub>F. Otros componentes de las formulaciones de HFA para la administración con IDM incluyen codisolventes, tales como etanol, pentano, agua; y tensioactivos, tales como trioleato de sorbitano, ácido oleico, lecitina y glicerina (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 5.225.183, la patente europea EP 0717987 y la solicitud de patente internacional WO 92/22286). La formulación se carga en un cartucho para aerosol, que forma parte de un dispositivo de IDM. Los ejemplos de dispositivos de IDM desarrollados específicamente para ser usados con propulsores de HFA se dan a conocer en las patentes de los EE. UU. n.ºs 6.006.745 y 6.143.227. Para los ejemplos de procesos de preparación de formulaciones idóneas y dispositivos idóneos para la dosificación de la inhalación, véanse las patentes de los EE. UU. n.ºs 6.268.533, 5.983.956, 5.874.063 y 6.221.398 y las solicitudes de patente internacional WO 99/53901, WO 00/61108, WO 99/55319 y WO 00/30614.

El derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) se podría encapsular en liposomas o microcápsulas para administrarlo por inhalación. Un liposoma es una vesícula compuesta por una membrana de bicapa lipídica y un interior acuoso. La membrana lipídica puede estar hecha de fosfolípidos, de los cuales constituyen ejemplos fosfatidilcolina, tal como lecitina y lisolecitina; fosfolípidos ácidos, tales como fosfatidilserina y fosfatidilglicerol; y esfingofosfolípidos, tales como fosfatidiletanolamina y esfingomielina. Como alternativa, se le podría añadir colesterol. Una microcápsula es una partícula revestida con un material de revestimiento. Por ejemplo, el material de revestimiento puede consistir en una mezcla de un polímero formador de películas, un plastificante hidrófobo, un agente activador de la superficie y/o un polímero lubricante que contiene nitrógeno. Patentes de los EE. UU. n.ºs 6.313.176 y 7.563.768.

El derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) puede también utilizarse en monoterapia o en politerapia con otros agentes quimioterapéuticos a través de la aplicación tópica para el tratamiento de cánceres localizados, tales como el cáncer de mama o los melanomas. El derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) también se podría utilizar en combinación con opioides o analgésicos para la administración por vía transdérmica de la medicación para el dolor.

Esta descripción también da a conocer las composiciones como las descritas más arriba para la administración ocular. Como tal, las composiciones pueden además comprender un potenciador de la penetración. Para la administración ocular, las composiciones descritas en la presente memoria se pueden formular como una solución, emulsión, suspensión, etc. Se conocen en la técnica una serie de vehículos idóneos para la administración de compuestos al ojo. Los ejemplos no limitantes específicos se describen en las patentes de los EE. UU. n.ºs 6.261.547; 6.197.934; 6.056.950; 5.800.807; 5.776.445; 5.698.219; 5.521.222; 5.403.841; 5.077.033; 4.882.150 y 4.738.851.

El derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) se puede dar como monoterapia o en politerapia con otros fármacos para el tratamiento de las enfermedades anteriores durante un periodo de tiempo corto o prolongado. Las presentes composiciones se pueden administrar a un mamífero, preferiblemente a un humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitarse a ellos, ratones, ratas, conejos, simios, bóvidos, ovejas, cerdos, perros, félidos, animales de granja, animales de competición, mascotas, équidos y primates.

La descripción también proporciona un método para inhibir el crecimiento de una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, en donde una célula, tal como una célula cancerosa, se pone en contacto con una cantidad eficaz del derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) tal y como se describe en la presente memoria.

Las células o el tejido patológicos, tales como células o tejido hiperproliferativos, se podrían tratar al poner en contacto las células o el tejido con una cantidad eficaz de una composición de esta invención. Las células, tales como las células cancerosas, pueden ser células de cáncer primario o pueden ser células cultivadas disponibles de bancos de tejidos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC). Las células patológicas pueden ser células de un cáncer sistémico, gliomas, meningiomas, adenomas hipofisarios o una metástasis del SNC de un cáncer sistémico, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer hematopoyético o cáncer de ovario. Las células puede ser de un vertebrado, preferiblemente de un mamífero, más preferiblemente de un humano. Publicación de patente de los EE. UU. n.º 2004/0087651. Balassiano et al. (2002) *Intern. J. Mol. Med.* 10: 785-788. Thorne et al. (2004) *Neuroscience* 127: 481-496. Fernandes et al., (2005) *Oncology Reports* 13: 943-947. Da Fonseca et al. (2008) *Surgical Neurology* 70: 259267. Da Fonseca et al. (2008) *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 56: 267-276. Hashizume et al. (2008) *Neuroncology* 10: 112-120.

La eficacia *in vitro* de la presente composición se puede determinar con los métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la citotoxicidad del presente monoterpéno (o sesquiterpéno) y/o agentes terapéuticos se podría estudiar mediante el ensayo de citotoxicidad con MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. El ensayo con MTT se basa en el principio de la captación del MTT, una sal de tetrazolio, por las células con un metabolismo activo, en las que se metaboliza en un producto de formazano de color azul que se puede leer en un espectrómetro. *J. Of Immunological Methods* 65: 55-63, 1983. La citotoxicidad de presente derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) y/o los agentes terapéuticos se podría estudiar mediante el ensayo de formación de colonias. Los ensayos funcionales para la inhibición de la secreción del FCEV y la secreción de la IL-8 se podrían realizar por

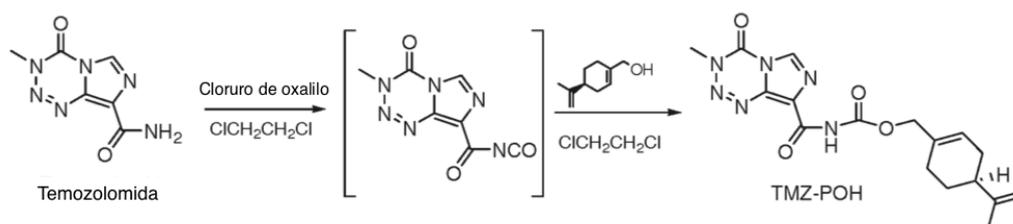
5 ELISA. El bloqueo del ciclo celular mediante el presente derivado monoterpénico (o sesquiterpénico) y/o los agentes terapéuticos se podría estudiar mediante tinción con yoduro de propidio (PI, por su nombre en inglés) estándar y citometría de flujo. La inhibición de la invasión se podría estudiar mediante cámaras de Boyden. En este ensayo, una capa de la membrana basal reconstituida, Matrigel, se usa para revestir filtros de quimiotaxia y actúa como una barrera contra la migración de células en las cámaras de Boyden. Sólo las células con capacidad invasiva consiguen atravesar la barrera Matrigel. Otros ensayos incluyen, pero sin limitarse a ellos, ensayos de viabilidad celular, ensayos de la apoptosis y ensayos morfológicos.

Los siguientes son ejemplos de la presente invención y no se deben considerar como limitantes.

### Ejemplos

10 Ejemplo 1: Síntesis de la temozolomida-carbamato de POH (éster de ácido 3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carbonil-carbámico y 4-isopropenilciclohex-1-enilmetilo)

El esquema de reacción es el siguiente:



15 Se añadió lentamente cloruro de oxalilo (0,13 g, 1,0 mmol) a una mezcla de temozolomida (Ochem Incorporation, 0,1 g, 0,5 mmol) en 1,2-dicloroetano (10 ml) durante un margen de 2 minutos, al mismo tiempo que se mantenía la temperatura a 10 °C en N<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se dejó templar a temperatura ambiente y a continuación se calentó a reflujo durante 3 horas. El exceso de cloruro de oxalilo y 1,2-dicloroetano se retiró por concentración al vacío. El residuo resultante se volvió a disolver en 1,2-dicloroetano (15 ml) y la mezcla de reacción se enfrió a 10 °C en N<sub>2</sub>. Se le añadió una solución de alcohol perillílico (0,086 g, 0,56 mmol) en 1,2-dicloroetano (3 ml) durante un margen de 5 minutos. La mezcla de reacción se dejó templar a temperatura ambiente y se agitó durante 14 horas. El 1,2-dicloroetano se concentró al vacío para dar un residuo, que se trituró con hexanos. Se filtró el sólido amarillo resultante y se lavó con hexanos. Peso: 170 mg; rendimiento: 89%. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,4-2,2 (m, 10H), 4,06 (s, 3H), 4,6-4,8 (m, 4H), 5,88 (br s, 1H), 8,42 (s, 1H), 9,31 (br s, 1H); MS, no se observó ningún pico de ion molecular. m/e: 314 (100%), 286,5 (17%), 136 (12%).

25 Como alternativa, se sintetizó temozolomida-carbamato de POH de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se añadió lentamente cloruro de oxalilo (0,13 g, 1,0 mmol) a una mezcla de temozolomida (OChem Incorporation, 0,1 g, 0,5 mmol) en 1,2-dicloroetano (10 ml) durante 2 minutos al mismo tiempo que se mantiene la temperatura a 10 °C en N<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se dejó templar a temperatura ambiente y a continuación se calentó con reflujo durante 3 horas. El exceso de cloruro de oxalilo y de 1,2-dicloroetano se retiró por concentración al vacío. El residuo resultante se volvió a disolver en 1,2-dicloroetano (15 ml) y la mezcla de reacción se enfrió a 10 °C en N<sub>2</sub>. Durante un margen de 5 minutos se le añadió una solución de alcohol perillílico (0,086 g, 0,56 mmol) en 1,2-dicloroetano (3 ml). La mezcla de reacción se dejó templar a temperatura ambiente y se agitó durante 14 horas. El 1,2-dicloroetano se concentró al vacío para dar un residuo, que se purificó mediante una columna pequeña de sílice conectada (dimensiones de la columna: diámetro: 2 cm, altura: 3 cm, sílice: malla 230-400) y se eluyó con una mezcla de hexanos/acetato de etilo (1:1, 100 ml). Se combinaron las fracciones de hexano/acetato de etilo y se concentraron al vacío para dar un residuo sólido blanco que se trituró con heptanos y se filtró para obtener un sólido blanco. Peso: 170 mg; rendimiento: 89%. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,4-2,2 (m, 10H), 4,06 (s, 3H), 4,6-4,8 (m, 4H), 5,88 (br s, 1H), 8,42 (s, 1H), 9,31 (br s, 1H); MS, no se observó ningún pico de ion molecular, m/e: 314 (100%), 286,5 (17%), 136 (12%).

40 Ejemplo 2: Estudios de citotoxicidad *in vitro* de temozolomida-carbamato de POH (POH-TMZ)

Los primeros ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo después de que las células se trataran solo con temozolomida (TMZ), el alquilante estándar utilizado para el tratamiento de los gliomas malignos. En la figura 1 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT realizados con las células de glioma maligno de humano U87, A172 y U251 con TMZ únicamente. Las concentraciones crecientes de TMZ tenían una citotoxicidad mínima sobre las líneas celulares probadas.

A continuación, las células U87, A172 y U251 de las líneas celulares de glioma resistentes a la TMZ se trataron con temozolomida-carbamato de POH (POH-TMZ) (p. ej., sintetizado por el método en el ejemplo 1). Los resultados del ensayo con MTT (figura 2) mostraban que el carbamato de POH y POH-TMZ presentaban tasas de mortandad sustancialmente mayores que la TMZ sola sobre las diferentes células de glioma humano.

Ejemplo 3: Estudios de citotoxicidad *in vitro* de la temozolomida (TMZ) y de temozolomida-carbamato de POH (POH-TMZ) sobre células de glioma sensibles y resistentes a la TMZ.

Los ensayos de formación de colonias se realizaron después de que las células se tratasen con TMZ en monoterapia, POH en monoterapia, y el conjugado TMZ-POH. Los ensayos de formación de colonias se realizaron tal y como se describe en Chen TC et al. «Green tea epigallocatechin gallate enhances therapeutic efficacy of temozolomide in orthotopic mouse glioblastoma models» *Cancer Lett.* 28 de marzo de 2011; 302 (2): 100-8. En la figura 3 se muestran los resultados de los ensayos de formación de colonias realizados con las células U251 sensibles a la TMZ (U251) y resistentes a la TMZ (U251TR) con TMZ o TMZ-POH. La TMZ mostró citotoxicidad sobre las células U251 sensibles a la TMZ, pero tenía una citotoxicidad mínima sobre las células U251 resistentes a la TMZ. TMZ-POH mostró citotoxicidad tanto sobre las células U251 sensibles a la TMZ como sobre las resistentes a la TMZ.

En la figura 4 se muestran los resultados de los ensayos de formación de colonias realizados con POH sobre las células U251 sensibles a la TMZ (U251) y resistentes a la TMZ (U251TR). El POH mostró citotoxicidad tanto sobre las células U251 sensibles a la TMZ como sobre las resistentes a la TMZ. POH-TMZ (figura 3) mostró una potencia sustancialmente mayor que el POH en monoterapia (figura 4) en los ensayos de formación de colonias.

Ejemplo 4: Estudios de la citotoxicidad *in vitro* de temozolomida-carbamato de POH (POH-TMZ) sobre las células U251, sobre las células U251TR y sobre los astrocitos normales.

Los ensayos de citotoxicidad con MTT se realizaron después de que las células se trataran con el conjugado TMZ-POH. Los ensayos de citotoxicidad con MTT se realizaron tal y como se describe en Chen TC et al. «Green tea epigallocatechin gallate enhances therapeutic efficacy of temozolomide in orthotopic mouse glioblastoma models». *Cancer Lett.* 28 de marzo de 2011; 302 (2): 100-8. En la figura 5 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT realizados sobre las células sensibles a la TMZ (U251), sobre las células resistentes a la TMZ (U251TR) y sobre los astrocitos normales. TMZ-POH mostró citotoxicidad tanto sobre las células U251 sensibles a la TMZ como sobre las resistentes a la TMZ, pero no en los astrocitos normales.

Ejemplo 5: Estudios de citotoxicidad *in vitro* de temozolomida-carbamato de POH (POH-TMZ) sobre BEC, TuBEC y astrocitos normales

Los ensayos de citotoxicidad con MTT se realizaron después de que las células se trataran con el conjugado TMZ-POH. Los ensayos de citotoxicidad con MTT se realizaron tal y como se describe en Chen TC et al. «Green tea epigallocatechin gallate enhances therapeutic efficacy of temozolomide in orthotopic mouse glioblastoma models». *Cancer Lett.* 28 de marzo de 2011; 302 (2): 100-8. En la figura 6 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT realizados sobre astrocitos normales, células endoteliales del cerebro (BEC, por su nombre en inglés; confluentes y subconfluentes) y células endoteliales tumorales de cerebro (TuBEC, por su nombre en inglés). TMZ-POH no indujo ninguna citotoxicidad significativa sobre los astrocitos normales, las BEC confluentes o las TuBEC. Se mostró una citotoxicidad de leve a moderada en las BEC subconfluentes a concentraciones altas de TMZ-POH.

Ejemplo 6: Estudios de citotoxicidad *in vitro* de la temozolomida (TMZ) y de temozolomida-carbamato de POH (POH-TMZ) en las células madre cancerosas de glioma USC-04.

Los ensayos de citotoxicidad con MTT se llevaron a cabo después de que las células se trataran con la TMZ en monoterapia, el POH en monoterapia o el conjugado TMZ-POH. Los ensayos de citotoxicidad con MTT se realizaron tal y como se describe en Chen TC et al. «Green tea epigallocatechin gallate enhances therapeutic efficacy of temozolomide in orthotopic mouse glioblastoma models». *Cancer Lett.* 28 de marzo de 2011; 302 (2): 100-8. En la figura 7 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT realizados en las células madre cancerosas de glioma USC-04. La TMZ no indujo ninguna citotoxicidad significativa a concentraciones crecientes (0-400  $\mu$ M). El TMZ-POH mostró indicios de citotoxicidad con la  $Cl_{50}$  a 150  $\mu$ M. En la figura 8 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT realizados con las células madre cancerosas de glioma USC-04 tratadas con POH. El POH mostró citotoxicidad en las USC-04 al incrementarse la concentración (0-2 mM).

Ejemplo 7: Estudios de citotoxicidad *in vitro* de la temozolomida (TMZ) y de temozolomida-carbamato de POH (POH-TMZ) en las células madre cancerosas de glioma USC-02.

Se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad con MTT después de que las células se trataran con TMZ en monoterapia, POH en monoterapia o el conjugado TMZ-POH. Los ensayos de citotoxicidad con MTT se realizaron tal y como se describe en Chen TC et al. «Green tea epigallocatechin gallate enhances therapeutic efficacy of temozolomide in orthotopic mouse glioblastoma models». *Cancer Lett.* 28 de marzo de 2011; 302 (2): 100-8. En la figura 9 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT realizados con las células madre cancerosas de glioma USC-02. La TMZ no indujo una citotoxicidad significativa al incrementar la concentración (0-400  $\mu$ M). El TMZ-POH mostró indicios de citotoxicidad con la  $Cl_{50}$  a 60  $\mu$ M. En la figura 10 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con MTT realizados en las células madre cancerosas de glioma USC-02 tratadas con POH. El POH mostró citotoxicidad con las USC-02 a concentraciones crecientes (0-2 mM).

Ejemplo 8: Estudios *in vitro* de la sobrecarga del RE debida a temozolomida-carbamato de POH (POH-TMZ) en las células de glioma resistentes y sensibles a la TMZ

Se realizaron transferencias de tipo Western después de que las células de glioma sensibles y resistentes a la TMZ se trataran con el conjugado TMZ-POH durante 18 horas. En la figura 11 se muestra una transferencia de tipo Western que demuestra que el TMZ-POH induce sobrecarga del RE (SRE) en las células de glioma U251 sensibles y resistentes a la TMZ. La activación de la proteína proapoptósica CHOP se observó a concentraciones de tan solo 60  $\mu$ M de TMZ-POH.

Se describen los siguientes aspectos:

1. Una composición farmacéutica que comprende un carbamato de alcohol perilífico.
2. La composición farmacéutica del aspecto 1, donde el carbamato de alcohol perilífico es alcohol perilífico conjugado con un agente terapéutico.
3. La composición farmacéutica del aspecto 2, donde el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.
4. La composición farmacéutica del aspecto 3, donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente alquilante de ADN, un inhibidor de topoisomerasas, un agente inductor de sobrecarga del retículo endoplasmático, un compuesto de platino, un antimetabolito, un inhibidor de enzimas y un antagonista de receptores.
5. La composición farmacéutica del aspecto 2, donde el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en dimetilcelecoxib (DMC), temozolomida (TMZ) y rolipram.
6. La composición farmacéutica del aspecto 1, donde la composición farmacéutica se administra antes, durante o después de radiación.
7. La composición farmacéutica del aspecto 1, donde la composición farmacéutica se administra antes, durante o después de la administración de un agente quimioterapéutico.
8. La composición farmacéutica del aspecto 1, donde la composición farmacéutica se administra por inhalación, intranasalmente, oralmente, intravenosamente, subcutáneamente o intramuscularmente.
9. La composición farmacéutica del aspecto 1, donde el carbamato de alcohol perilífico es 4-(bis-*N,N'*-4-isopropenilciclohex-1-enilmetiloxicarbonil-[5-(2,5-dimetilfenil)-3-trifluorometilpirazol-1-il]bencenosulfonamida.
10. La composición farmacéutica del aspecto 1, donde el carbamato de alcohol perilífico es éster de ácido 4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-2-oxopirrolidina-1-carboxílico y 4-isopropenilciclohex-1-enilmetilo.
11. La composición farmacéutica del aspecto 1, donde el carbamato de alcohol perilífico es éster de ácido 3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carbonil)-carbámico y 4-isopropenilciclohex-1-enilmetilo.
12. Un método para tratar una enfermedad en un mamífero, que comprende la etapa de suministrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un carbamato de alcohol perilífico.
13. El método del aspecto 12, donde la enfermedad es cáncer.
14. El método del aspecto 13, donde el cáncer es un tumor del sistema nervioso.
15. El método del aspecto 14, donde el tumor es un glioblastoma.
16. El método del aspecto 12, que comprende además la etapa de tratar el mamífero con radiación.
17. El método del aspecto 12, que comprende además la etapa de suministrar al mamífero un agente quimioterapéutico.
18. El método del aspecto 12, donde el carbamato de alcohol perilífico se administra por inhalación, intranasalmente, oralmente, intravenosamente, subcutáneamente o intramuscularmente.
19. El método del aspecto 12, donde el carbamato de alcohol perilífico es alcohol perilífico conjugado con un agente terapéutico.
20. El método del aspecto 19, donde el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.
21. El método del aspecto 20, donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente alquilante de ADN, un inhibidor de topoisomerasas, un agente inductor de sobrecarga del retículo endoplasmático, un compuesto de platino, un antimetabolito, un inhibidor de enzimas y un antagonista de receptores.

22. El método del aspecto 19, donde el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en dimetilcelecoxib (DMC), temozolomida (TMZ) y rolipram.
23. El método del aspecto 12, donde el carbamato de alcohol perilílico se selecciona del grupo que consiste en (a) 4-(bis-*N,N*-4-isopropenilciclohex-1-enilmetiloxycarbonil-[5-(2,5-dimetilfenil)-3-trifluorometilpirazol-1-il]bencenosulfonamida; (b) éster de ácido 4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-2-oxopirrolidina-1-carboxílico y 4-isopropenilciclohex-1-enilmetilo; y (c) éster de ácido 3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carbonil)-carbámico y 4-isopropenilciclohex-1-enilmetilo.
24. Un procedimiento para fabricar un carbamato de POH, que comprende la etapa de hacer reaccionar un primer reactante de cloroformiato de perililo con un segundo reactante seleccionado del grupo que consiste en dimetilcelecoxib (DMC), temozolomida (TMZ) y rolipram.
25. El procedimiento del aspecto 24, donde el segundo reactante es dimetilcelecoxib.
26. El procedimiento del aspecto 25, donde la reacción se lleva a cabo en presencia de acetona y un catalizador de carbonato de potasio.
27. El procedimiento del aspecto 24, donde el segundo reactante es rolipram.
28. El procedimiento del aspecto 27, donde la reacción se lleva a cabo en presencia de tetrahidrofurano y un catalizador de *n*-butil-litio.
29. El procedimiento del aspecto 24, donde el cloroformiato perilílico se prepara haciendo reaccionar alcohol perilílico con fosgeno.

**REIVINDICACIONES**

1. Un carbamato de alcohol perilífico que es alcohol perilífico conjugado con temozolomida (TMZ).
- 5 2. Una composición que comprende un carbamato de alcohol perilífico mezclado con un vehículo, adyuvante y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, donde el carbamato de alcohol perilífico es alcohol perilífico conjugado con temozolomida (TMZ).
3. El carbamato de alcohol perilífico de la reivindicación 1, o la composición de la reivindicación 2, donde del carbamato de alcohol perilífico es éster de ácido 3-metil-4-oxo-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carbonil)-carbámico y 4-isopropenilciclohex-1-enilmetilo.
- 10 4. Un procedimiento para fabricar un carbamato de alcohol perilífico de la reivindicación 1, que comprende la etapa de hacer reaccionar un primer reactante de cloroformiato de perililo con un segundo reactante de temozolomida (TMZ) en presencia de tetrahidrofurano y una base
5. El procedimiento de la reivindicación 4, donde el cloroformiato de perililo se prepara haciendo reaccionar alcohol perilífico con fosgeno.
- 15 6. El carbamato de alcohol perilífico de la reivindicación 1 o la composición de la reivindicación 2 o 3, para usar en el tratamiento de un glioblastoma en un mamífero.
7. El carbamato de alcohol perilífico o la composición para usar según la reivindicación 6, donde se trata adicionalmente al mamífero con radiación.
- 20 8. El carbamato de alcohol perilífico o la composición para usar según la reivindicación 6, donde se trata adicionalmente al mamífero con un agente quimioterapéutico.

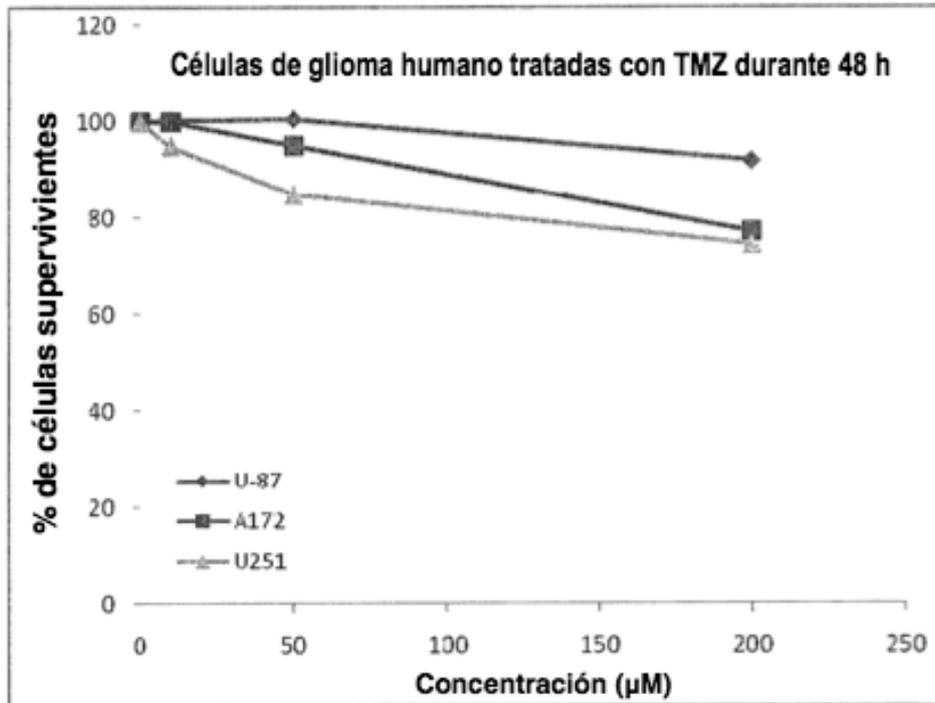


Figura 1

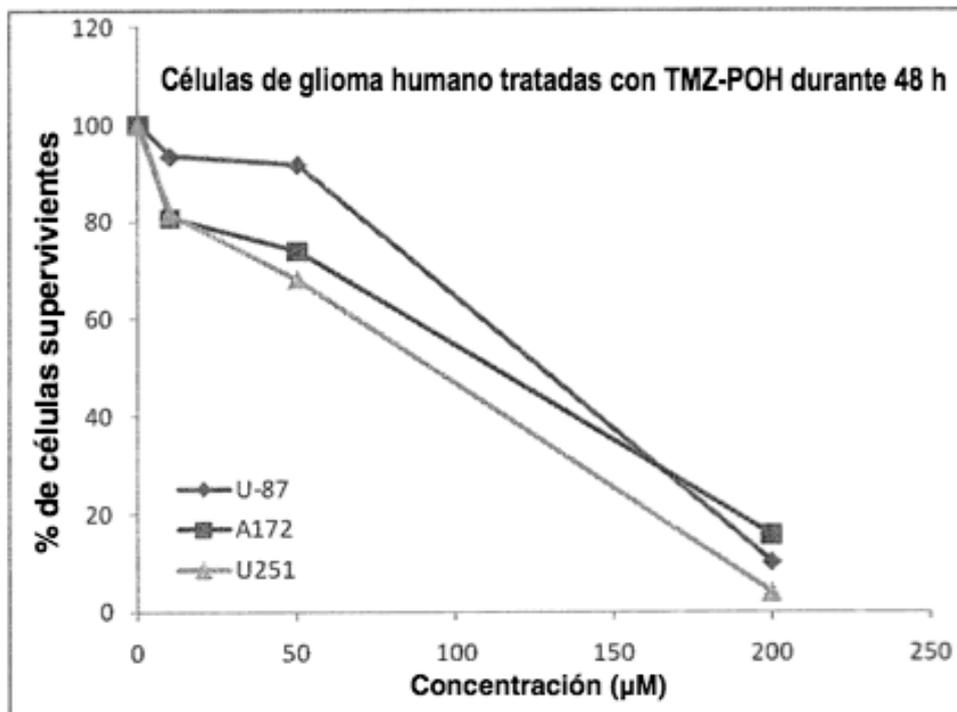


Figura 2

Ensayo de formación de colonias para TMZ y TMZ-POH en las células de glioma sensibles y resistentes a la TMZ - Tratamiento de 72 h

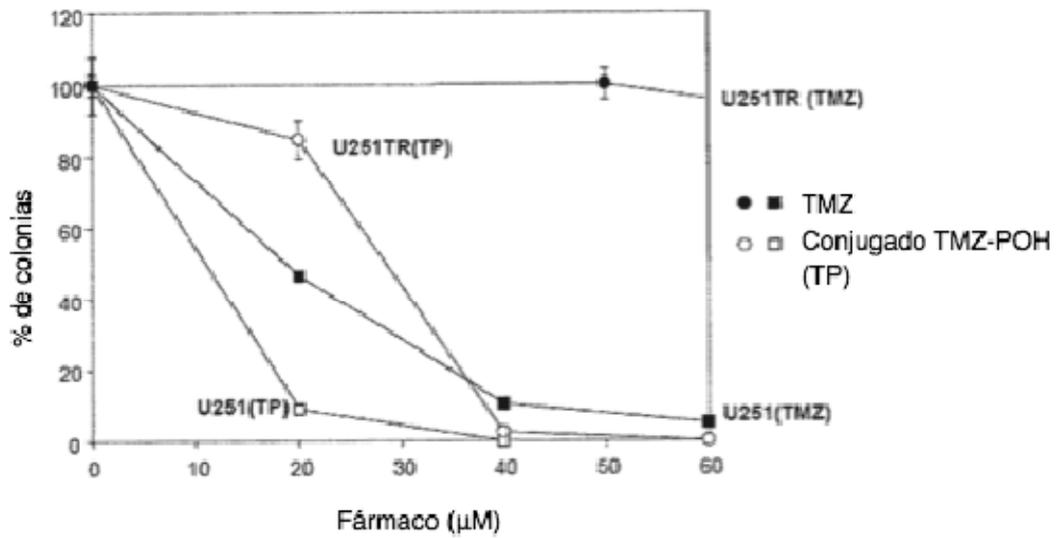


Figura 3

EFC de U251 y U251TR con POH - Tratamiento de 72 h

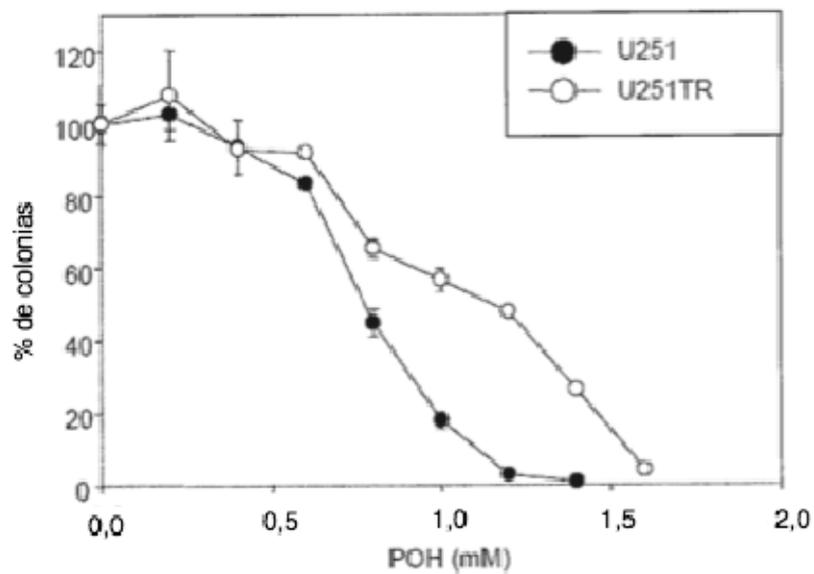


Figura 4

Ensayo con MTT para TMZ-POH sobre U251, U251TR y astrocitos normales - Tratamiento de 72 h

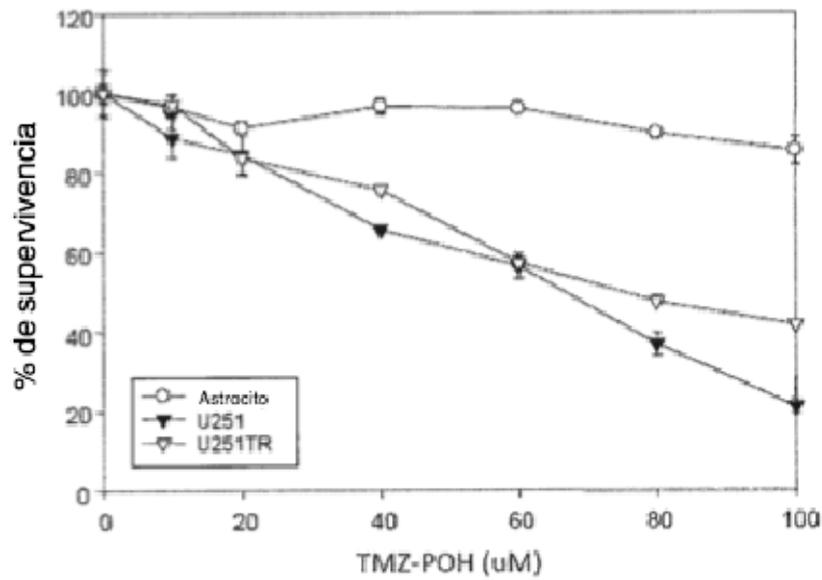


Figura 5

Ensayo con MTT para TMZ-POH sobre BEC, TUBEC y astrocitos - Tratamiento de 72 h

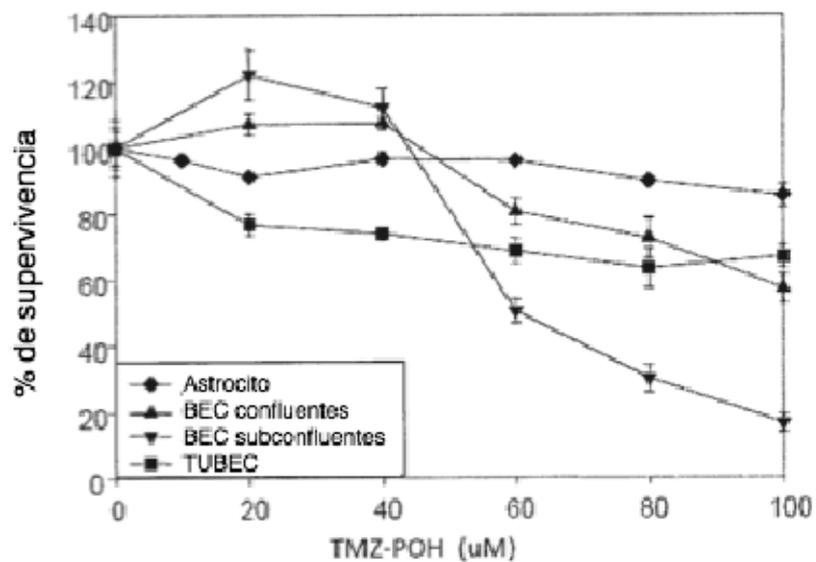


Figura 6

Ensayo con MTT para TMZ-POH en las células madre cancerosas de glioma USC-04 - Tratamiento de 72 h

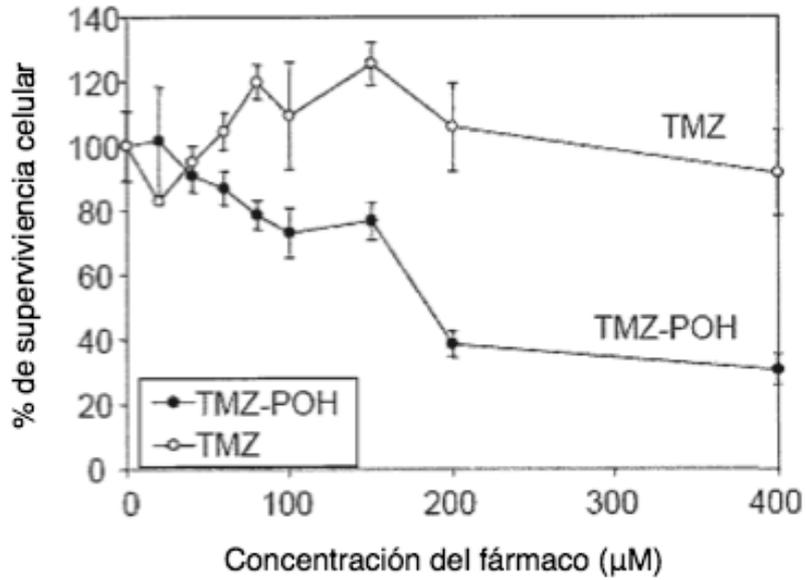


Figura 7

Ensayo con MTT para POH en las células madre cancerosas de glioma USC-04 - Tratamiento de 72 h

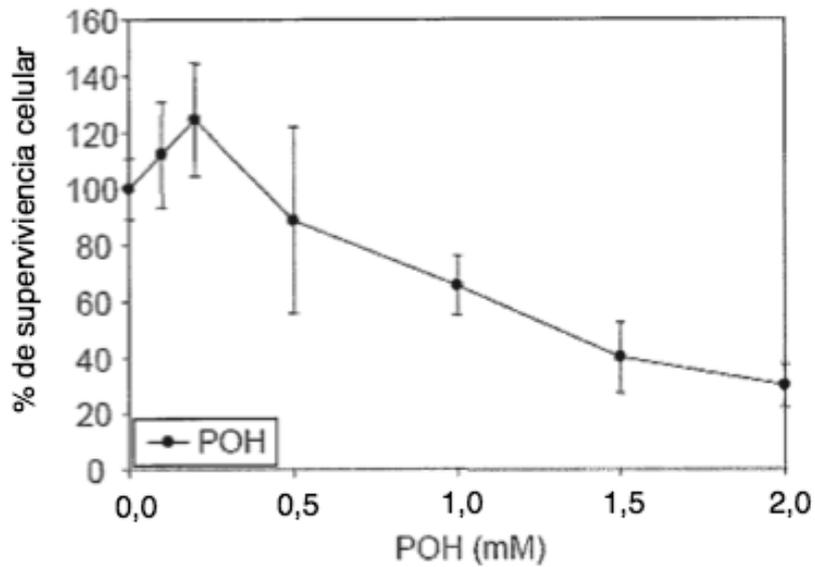


Figura 8

Ensayo con MTT para TMZ-POH en las células madre cancerosas de glioma USC-02 - Tratamiento de 72 h

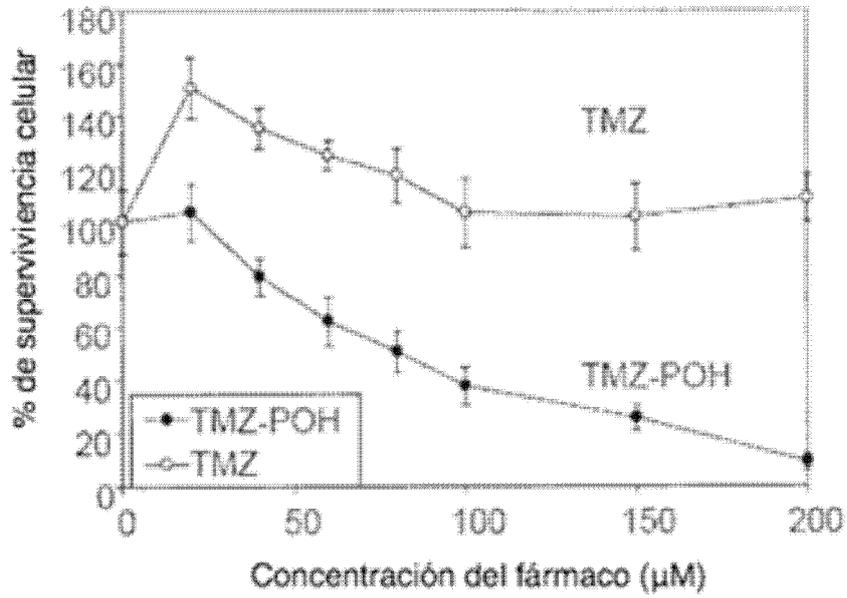


Figura 9

Ensayo con MTT para POH en las células madre cancerosas de glioma USC-02 - Tratamiento de 72 h

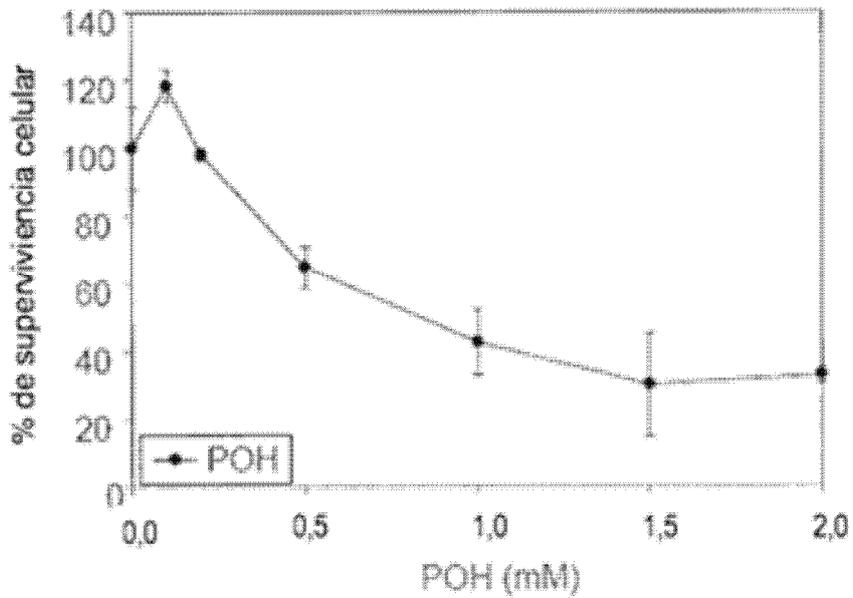


Figura 10

Transfrecia de tipo Western después de tratar con TMZ-POH las células U251-TMZs y U251-TMZr - Tratamiento de 18 h

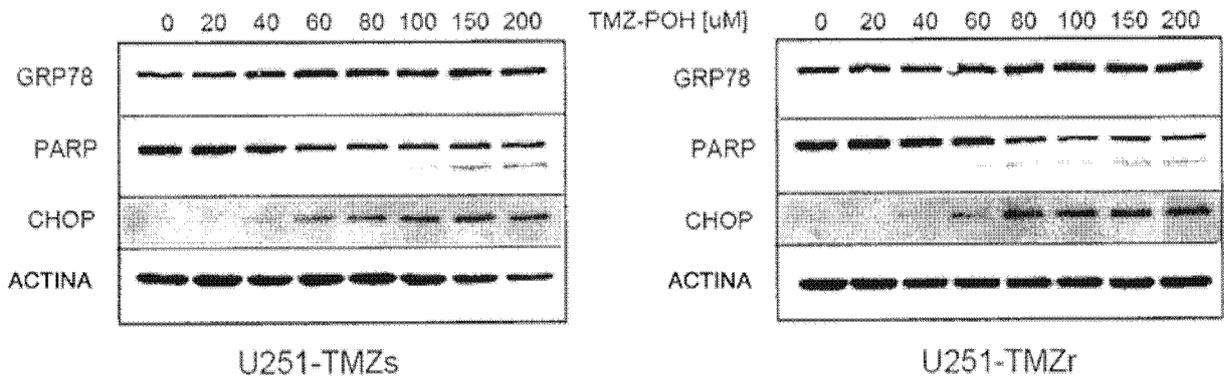


Figura 11