

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 008**

51 Int. Cl.:

A61K 31/495 (2006.01)
A61K 31/4188 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2013 PCT/US2013/029391**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13134398**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2013 E 13758061 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2822546**

54 Título: **Terapia combinada de procaspasa para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

06.03.2012 US 201261607103 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2017

73 Titular/es:

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS (33.3%)
352 Henry Administration Building, 506 South Wright Street
Urbana, IL 61801, US;
VANQUISH ONCOLOGY, INC. (33.3%) y
THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (33.3%)

72 Inventor/es:

HERGENROTHER, PAUL J.;
BOTHAM, RACHEL C.;
FAN, TIMOTHY M.;
GILBERT, MARK J.;
HANDLEY, MICHAEL K.;
JOSHI, AVADHUT;
RIGGINS, GREGORY J. y
TARASOW, THEODORE M.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 646 008 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

Terapia combinada de procaspasa para el tratamiento del cáncer

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La apoptosis, o muerte celular programada, juega un papel central en el desarrollo y la homeostasis de todos los organismos multicelulares. Un sello distintivo frecuente del cáncer es la resistencia a las señales apoptóticas naturales. Dependiendo del tipo de cáncer, esta resistencia se debe habitualmente a una sobreexpresión o hiperregulación de proteínas clave en la cascada apoptótica o a mutaciones en los genes que codifican estas proteínas. Tales cambios se producen tanto en la vía apoptótica intrínseca, cuyos canales a través de la mitocondria y la caspasa-9, como en la vía apoptótica extrínseca, que implica la acción de los receptores de muerte y la caspasa-8. Por ejemplo, en los cánceres se han observado alteraciones de los niveles adecuados de proteínas tales como la p53, Bim, Bax, Apaf-1, FLIP y muchas otras. Las alteraciones pueden derivar en una cascada apoptótica defectuosa, una en la que la señal proapoptótica aguas arriba no se transmite adecuadamente para activar las caspasas verdugo, la caspasa-3 y la caspasa-7.

Como la mayoría de las vías apoptóticas implican en última instancia la activación de la procaspasa-3, las anomalías genéticas aguas arriba son «interrupciones» efectivas de los circuitos apoptóticos y, como resultado, tales células proliferan de forma atípica. Dado el papel central de la apoptosis en el cáncer, se han hecho esfuerzos para desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a proteínas específicas de la cascada apoptótica. Por ejemplo, una molécula pequeña o peptídica se une a miembros de la cascada tales como la p53 y las proteínas de la familia Bcl, o a la familia de proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAP) que tienen actividad apoptótica, tal y como lo hacen los compuestos que promueven la oligomerización de la Apaf-1. Sin embargo, puesto que tales compuestos se dirigen a posiciones tempranas (o de intermedias a altas) en la cascada apoptótica, los cánceres con mutaciones que afectan a proteínas aguas abajo de esos miembros pueden seguir siendo resistentes a los posibles efectos beneficiosos de esos compuestos.

Con fines terapéuticos, sería ventajoso identificar moléculas pequeñas que activen directamente una proteína proapoptótica muy aguas abajo en la cascada apoptótica. Este enfoque podría implicar una posición relativamente baja en la cascada que, de ese modo, permita la muerte de incluso aquellas células que tienen mutaciones que afectan a la maquinaria apoptótica aguas arriba. Asimismo, tales estrategias terapéuticas tendrían una mayor probabilidad de éxito si esa proteína apoptótica estuviera sobreexpresada, o presente en niveles superiores, en las células cancerígenas. Por tanto, la identificación de moléculas pequeñas que se dirijan a la proteína efectora de la apoptosis aguas abajo, la procaspasa-3, ayudaría significativamente en la terapia actual para el cáncer.

La conversión o activación de la procaspasa-3 a caspasa-3 tiene como resultado la generación de la forma de caspasa «verdugo» activa que, posteriormente, cataliza la hidrólisis de una multitud de sustratos proteicos. La caspasa-3 activa es un homodímero de heterodímeros y se produce mediante proteólisis de la procaspasa-3. *In vivo*, esta activación proteolítica se produce habitualmente gracias a la acción de la caspasa-8 o la caspasa-9. Para garantizar que el zimógeno (proenzima) no se active prematuramente, la procaspasa-3 tiene un «cierre de seguridad» de 12 aminoácidos que bloquea el acceso al sitio ETD (secuencia de aminoácidos ile-glu-thr-asp) de la proteólisis. Este cierre de seguridad permite que la procaspasa-3 resista la activación autocatalítica y la proteólisis provocadas por la caspasa-9. Los estudios mutagénicos indican que tres residuos consecutivos ácido aspártico parecen ser los componentes críticos del cierre de seguridad. La posición del cierre de seguridad es sensible al pH, por tanto, se cree que, tras la acidificación celular (tal y como ocurre durante la apoptosis), el cierre de seguridad permite el acceso al sitio de proteólisis y se puede producir caspasa-3 activa, bien mediante la acción de la caspasa-9, o bien a través un mecanismo de autoactivación.

En ciertos cánceres, los niveles de procaspasa-3 son elevados en comparación con los del tejido normal. Un estudio de aislados primarios procedentes de 20 pacientes con cáncer de colon reveló que, de media, la procaspasa-3 estaba sobreexpresada seis veces en tales aislados en comparación con los tejidos no cancerosos adyacentes. Además, la procaspasa-3 está sobreexpresada en ciertos neuroblastomas, linfomas y cánceres hepáticos. Asimismo, se realizó una evaluación sistemática de los niveles de procaspasa-3 en el panel de 60 líneas celulares usado para la detección del cáncer por el Programa de Desarrollo de Terapéutica del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), que reveló que ciertos cánceres de pulmón, melanomas, cánceres renales y de mama, muestran mayores niveles de expresión de la procaspasa-3.

Debido al papel de la caspasa-3 activa en la consumación de la apoptosis, los niveles relativamente altos de procaspasa-3 en ciertos tipos de células cancerosas, y la fascinante supresión de su activación mediada por el cierre

de seguridad, las moléculas pequeñas que modifican directamente la procaspasa-3 podrían tener gran aplicabilidad en la terapia dirigida del cáncer. El documento WO2007033374 desvela la temozolamida (TMZ) y los inhibidores de la PKC para el tratamiento del cáncer. También se conoce la TMZ usada por sí sola en el tratamiento del cáncer (glioblastoma).

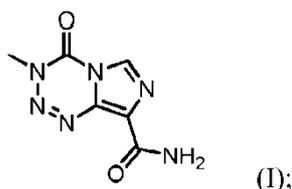
5
 PUTT K S Y COL.: "Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, NATURE PUB. GROUP, vol. 2, no. 10, 1 October 2006, desvelan PAC-1 que retarda el crecimiento de tumores en ratones. La terapia combinada se ha convertido en el tratamiento estándar de los pacientes con cáncer. El objetivo de los regímenes de cócteles de fármacos de terapia combinada es
 10 conseguir un efecto sinérgico o aditivo entre quimioterapéuticos, facilitando de ese modo el acortamiento de los tiempos de tratamiento, la disminución de la toxicidad y el aumento de la supervivencia del paciente. Los fármacos que actúan sobre una única ruta bioquímica son candidatos especialmente fuertes para la sinergia o potenciación, ya que pueden simular combinaciones genéticas «sintéticas letales». Por ejemplo, los inhibidores de la poli(ADP-
 15 con agentes perjudiciales para el ADN, tal y como se ha demostrado en cultivos celulares, modelos animales y ensayos clínicos en humanos. Sin embargo, todavía hay necesidad de terapias más efectivas para el tratamiento de muchas formas de cáncer y las combinaciones sinérgicas de fármacos anticancerígenos ayudarían a esta búsqueda. Por consiguiente, hay necesidad de identificar nuevos agentes citotóxicos que sean efectivos a la hora de matar células cancerosas y que a la vez protejan los tejidos huésped normales de la toxicidad no deseada del agente
 20 citotóxico.

RESUMEN

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los temas no abarcados por el alcance de las
 25 reivindicaciones no forman parte de la presente invención. En general, la invención proporciona composiciones, su uso y métodos de tratamiento terapéutico in vitro. En diversas formas de realización, las invenciones son aplicables a una variedad de enfermedades oncológicas y tipos de células cancerosas tales como el cáncer de mama, el linfoma, el cáncer adrenal, el renal, el melanoma, la leucemia, el neuroblastoma, el cáncer de pulmón y el cerebral. Entre otras cosas, en el presente documento se desvelan composiciones y métodos in vitro que incluyen moléculas
 30 pequeñas capaces de inducir la muerte celular. En algunas formas de realización, las composiciones y los métodos in vitro implican compuestos que pueden interactuar directamente o indirectamente con miembros de la vía de la muerte celular programada tales como la procaspasa-3. En ciertas formas de realización, las composiciones y los métodos in vitro tienen una neurotoxicidad reducida en comparación con otros compuestos que interactúan
 35 directamente o indirectamente con miembros de la vía de la muerte celular programada tales como la procaspasa-3.

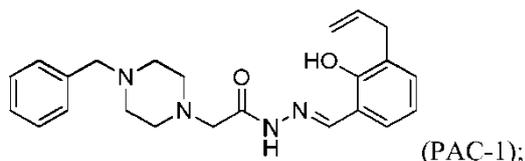
La terapia anticancerígena combinada puede consistir en fármacos que se dirigen a rutas bioquímicas diferentes, o a los que alcanzan dianas diferentes en la misma ruta, imitando combinaciones genéticas «sintéticas letales». La combinación del activador de la procaspasa-3 PAC-1 y el agente alquilante temozolomida (TMZ) muestra una
 40 sinergia considerable hacia la inducción de la muerte apoptótica de las células cancerosas hasta un grado que supera con creces el efecto aditivo. La combinación de PAC-1 y TMZ reduce efectivamente la carga tumoral en modelos de tumores en los que los compuestos por sí solos tienen un efecto mínimo o nulo. Estos datos indican la eficacia de la combinación PAC-1/TMZ para el tratamiento del cáncer y, más ampliamente, muestran que esta combinación sinérgica puede proporcionar beneficios terapéuticos significativamente superiores.

45 Por consiguiente, la invención proporciona una composición que comprende (a) un compuesto de Fórmula (I):



(b) el compuesto PAC-1:

50

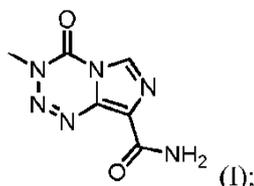


y (c) un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. El compuesto de Fórmula (I) puede ser temozolomida (TMZ). El vehículo puede incluir agua y componentes opcionales para una liberación ventajosa de 5 activos tales como un tampón, un azúcar, una ciclodextrina o diversas combinaciones de los mismos. En una forma de realización, la ciclodextrina es 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina.

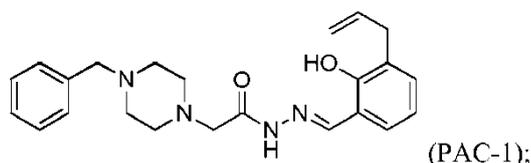
La concentración del compuesto de Fórmula I puede ser de aproximadamente 100 μ M a aproximadamente 1 mM, habitualmente aproximadamente 250 μ M, aproximadamente 500 μ M, o aproximadamente 750 μ M. La concentración 10 de PAC-1 puede ser de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 50 μ M, habitualmente aproximadamente 2,5 μ M, aproximadamente 5 μ M, aproximadamente 7,5 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 12,5 μ M, aproximadamente 15 μ M, aproximadamente 20 μ M, aproximadamente 25 μ M, aproximadamente 30 μ M, aproximadamente 40 μ M, o aproximadamente 50 μ M. Por ejemplo, en una forma de realización, la concentración del compuesto de Fórmula I puede ser de aproximadamente 250 μ M a aproximadamente 750 μ M y la concentración de 15 PAC-1 puede ser de aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 30 μ M.

La invención también proporciona un método *in vitro* de inhibición del crecimiento o la proliferación de células cancerosas y composiciones para uso en el tratamiento de un cáncer. El método *in vitro* las composiciones para uso 20 incluyen la puesta en contacto de células cancerosas con una cantidad efectiva de una composición descrita en el presente documento, donde la composición puede incluir PAC-1, TMZ o ambos. Cuando la composición solo incluye PAC-1 o TMZ, el método incluye la posterior puesta en contacto de las células cancerosas con la otra. La puesta en contacto de las células cancerosas con estos activos (PAC-1 y TMZ) inhibe el crecimiento o la proliferación de las células cancerosas.

25 La invención proporciona además un método *in vitro* las composiciones para uso en un método de inducción de apoptosis en una célula cancerosa que comprende la puesta en contacto de la célula cancerosa con una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I):



30 y una cantidad efectiva del compuesto PAC-1:



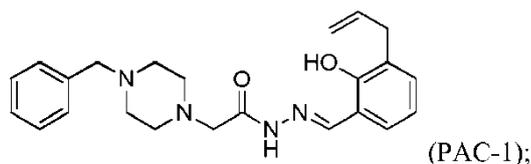
35 donde, de ese modo, se induce la apoptosis en la célula cancerosa. La puesta en contacto puede ser *in vitro*. Alternativamente, la puesta en contacto puede ser *in vivo*. En una forma de realización, la célula cancerosa se puede poner en contacto con el compuesto de Fórmula (I) y PAC-1 simultáneamente. En otra forma de realización, la célula cancerosa se puede poner en contacto con el compuesto de Fórmula (I) antes de poner en contacto la célula cancerosa con PAC-1. En otra forma de realización más, la célula cancerosa se puede poner en contacto con 40 PAC-1 antes de poner en contacto la célula cancerosa con el compuesto de Fórmula (I).

La invención también proporciona una composición para uso en un método de tratamiento de un cáncer en un paciente con necesidad del mismo. La composición para uso incluye la administración a un paciente, simultáneamente o secuencialmente, de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de Fórmula (I):



y una cantidad efectiva del compuesto PAC-1:

5



donde, de ese modo, se trata el cáncer. En una forma de realización, el compuesto de Fórmula (I) y el compuesto PAC-1 se pueden administrar simultáneamente. En otra forma de realización, el compuesto de Fórmula (I) y el compuesto PAC-1 se pueden administrar secuencialmente. Cuando se administran secuencialmente, el compuesto de Fórmula (I) se puede administrar antes que el compuesto PAC-1, o el compuesto de Fórmula (I) se puede administrar después del compuesto PAC-1.

Las células cancerosas de diversas formas de realización pueden ser células cancerosas del tejido cerebral, o células cancerosas del tejido óseo. Por ejemplo, las células cancerosas pueden ser células de glioblastoma o células de oligodendroglioma. En otra forma de realización, las células cancerosas pueden ser células de osteosarcoma. A continuación, se describen además otros tipos de células cancerosas que se pueden inhibir y otras afecciones cancerosas que se pueden tratar.

Por tanto, la invención contempla las composiciones descritas en el presente documento para uso en terapia médica. La terapia médica puede ser el tratamiento del cáncer, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de colon y otros cánceres mencionados en el presente documento. La invención también desvela el uso de composiciones tales como las descritas en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad en un mamífero, por ejemplo, el cáncer en un humano. Por tanto, la invención desvela el uso de los compuestos descritos en el presente documento para la fabricación de medicamentos útiles para el tratamiento del cáncer en un mamífero, tal como un humano. El medicamento puede incluir un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30

Los siguientes dibujos forman parte de la memoria descriptiva y se incluyen para demostrar aún más ciertas formas de realización o diversos aspectos de la invención. En algunos casos, las formas de realización de la invención se pueden entender mejor consultando los dibujos adjuntos en combinación con la descripción detallada presentada en el presente documento. La descripción y los dibujos adjuntos pueden destacar un ejemplo concreto determinado o un aspecto determinado de la invención.

35

Figura 1. El PAC-1 sinergiza con la TMZ para prolongar la supervivencia en un modelo de rata de glioblastoma: Gráfica de supervivencia de los cuatro grupos de modelos de rata intercraneales sinérgicos 9L. Se implantaron células 9L (glioma de rata) intracranealmente en ratas. Se administró PAC-1 (50 mg/kg en agua) por vía oral mediante sonda en los días 0-4, y TMZ (50 mg/kg en agua) por vía oral mediante sonda en los días 5-9; 8 ratas por grupo. El valor p se refiere a la TMZ sola. Tiempos de supervivencia medios: Control, 14,5 días; PAC-1, 13,5 días; TMZ, 20 días; Combinado, 28 días. El valor p global de la curva del combinado es $p=0,0001$. TMZ sola para Combinado, $p=0,0007$ (prueba de rango logarítmico) and $p=0.001$ (Prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon).

40

Figura 2. PAC-1 sinergiza con TMZ para inducir la muerte de las células de glioblastoma en cultivo. **A)** Se expusieron células de glioblastoma 9L a las concentraciones indicadas de PAC-1 + TMZ, y se evaluó la muerte celular a las 48 horas (muerte celular no detectable para TMZ 0 μM con PAC-1 0 μM). **B)** Se expusieron células de glioblastoma humano D-54 a las concentraciones indicadas de PAC-1 + TMZ, y se evaluó la muerte celular a las 24 horas (muerte celular no detectable para TMZ 0 μM con PAC-1 0 μM). Las líneas horizontales de puntos indican los niveles de muerte celular esperados para un simple efecto aditivo

45

de los compuestos. Las leyendas corresponden a las barras de la gráfica de barras, donde la inscripción de la leyenda superior corresponde a la barra situada más a la izquierda y las inscripciones de leyenda restantes corresponden a las barras restantes; de arriba a abajo corresponden a, respectivamente, de izquierda a derecha.

5 **Figura 3.**PAC-1 sinergiza con TMZ para inducir la muerte de células de osteosarcoma en cultivo.**A)**Se expusieron células HOS a las concentraciones indicadas de PAC-1 + TMZ y se evaluó la muerte celular a las 24 horas (muerte celular no detectable para TMZ 0 μ M con PAC-1 0 μ M).**B)**Se expusieron células 143B a las concentraciones indicadas de PAC-1 + TMZ y se evaluó la muerte celular a las 24 horas (muerte celular no detectable para TMZ 0 μ M o TMZ 250 μ M con PAC-1 0 μ M). Las leyendas corresponden a las barras de la gráfica de barras, donde la inscripción de la leyenda superior corresponde a la barra situada más a la izquierda y las inscripciones de leyenda restantes corresponden a las barras restantes; de arriba a abajo corresponden a, respectivamente, de izquierda a derecha.

10 **Figura 4.**PAC-1 sinergiza con TMZ para prolongar la supervivencia en un modelo de ratón de osteosarcoma metastásico. Siete días después de la inyección de células K7M2, se trataron los ratones oralmente con PAC-1 (100 mg/kg en HP β CD), TMZ (50 mg/kg en dulce oral), o se realizó un tratamiento secuencial con cada uno, diariamente durante cinco días consecutivos; n = 8 ratones por grupo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 A modo de introducción adicional, se han descubierto compuestos capaces de activar una enzima que, con frecuencia, se sobreexpresa o, dicho de otra forma, se presenta a niveles superiores, en su forma inactiva en las células cancerosas. Los compuestos pueden inducir la muerte celular programada (apoptosis) en las células cancerosas, incluyendo aquellas que tienen sobreexpresión o niveles superiores de procaspasa-3. Muchos cánceres resisten la quimioterapia estándar. La terapia combinada descrita en el presente documento aprovecha la

25 activación de la procaspasa-1 por parte del PAC-1, que sinergiza con las propiedades de alquilación del ADN de la TMZ, para proporcionar eficacia en condiciones en las que uno de los activos por sí solo sería menos efectivo o completamente inefectivo. Estos compuestos también pueden tener éxito en la terapia dirigida del cáncer, donde puede haber ventajas de selectividad a la hora de matar células cancerosas con reacciones adversas análogamente reducidas para células no cancerosas que tengan niveles inferiores de procaspasa-3. Estas reacciones adversas

30 pueden incluir toxicidad, especialmente neurotoxicidad.

Las composiciones, las composiciones para uso y los métodos *in vitro* descritos en el presente documento pueden actuar mediante modulación de la apoptosis o muerte celular programada y alquilación del ADN para ser efectivas en el tratamiento de células cancerosas. En una forma de realización, la modulación de la apoptosis se hace

35 mediante inducción o activación de la apoptosis. En diversas formas de realización, la administración de compuestos puede ser simultánea o, alternativamente, secuencial.

Por tanto, la invención proporciona composiciones que comprenden temozolomida (TMZ) y PAC-1, por ejemplo, para uso en el tratamiento de un glioblastoma o un osteosarcoma. Durante la apoptosis, el zimógeno procaspasa-3 se

40 activa mediante proteólisis a caspasa-3 y, a continuación, esta caspasa-3 activa escinde los puntajes de los sustratos celulares, ejecutando así el programa apoptótico. Puesto que los niveles de la proteína procaspasa-3 son elevados en diferentes histologías tumorales, la activación directa de la procaspasa-3 mediada por fármacos puede ser muy efectiva como estrategia anticancerígena selectiva.

45 Ciertos compuestos pueden mejorar la actividad y automaduración de la procaspasa-3 e inducir la apoptosis en células cancerosas. El compuesto activador de la procaspasa-1 (PAC-1) mejora la actividad de la procaspasa-3 mediante la quelación de iones zinc inhibidores, induce la apoptosis en células cancerosas en cultivo y es eficaz en múltiples modelos murinos de tumor. Se ha encontrado que una novedosa combinación de agentes terapéuticos, PAC-1 y TMZ, es sinérgicamente efectiva en el tratamiento de células cancerosas, especialmente células de

50 glioblastoma y células de osteosarcoma.

Los experimentos modelo en la línea celular del glioblastoma de rata 9L aportan datos claros que apoyan los descubrimientos de la sinergia y efectividad de actividad de la combinación de fármacos. Los experimentos en ratas *in vivo* emplearon células 9L, un modelo de tumor muy agresivo, implantadas intercranealmente en ratas de 3

55 grupos de tratamiento (PAC-1 solo, TMZ sola, y la combinación de PAC-1 y TMZ) y un grupo de control.

Se suspendió PAC-1 en agua y se administró a las ratas por vía oral mediante sonda a 50 mg/kg (una dosis relativamente baja) durante 5 días seguidos de cinco días de dosificación de TMZ. Cuando el compuesto se administró oralmente en dosis de hasta 200 mg/kg, no se observó neurotoxicidad con PAC-1 en los ratones y

60 tampoco se observó neurotoxicidad en los experimentos presentes. La ganancia de supervivencia en las ratas

tratadas con la combinación fue significativa y anormalmente drástica (Figura 1).

La **Figura 1** ilustra esquemáticamente los datos obtenidos cuando se implantaron intracranalmente células 9L en ratas. Se administró PAC-1 (50 mg/kg en agua) por vía oral mediante sonda en los días 0-4, y TMZ (50 mg/kg en 5 H₂O) oralmente mediante sonda en los días 5-9. Ocho ratas por grupo; se obtuvo un valor p de 0,001 en comparación con la TMZ sola (Prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon).

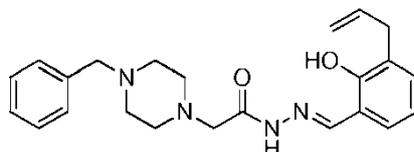
La evaluación inicial de la IC₅₀ para PAC-1 con la línea celular 9L es de aproximadamente 7 μM (experimento de 72 horas). Habitualmente, los tumores cerebrales de la línea celular 9L son hemorrágicos, pero en las ratas tratadas 10 con PAC-1/TMZ, los tumores no fueron hemorrágicos, lo que indicaba un efecto angiogénico.

La **Figura 2** muestra tres ejemplos de PAC-1 que sinergiza con TMZ para inducir la muerte de células de glioblastoma en cultivo. La **Figura 3** muestra dos ejemplos de PAC-1 que sinergiza con TMZ para inducir la muerte de células de osteosarcoma en cultivo. La **Figura 4** muestra un ejemplo de PAC-1 que sinergiza con TMZ para prolongar 15 la supervivencia en un modelo de ratón de osteosarcoma metastásico.

Se está consolidando una MTD para la combinación PAC-1/TMZ y se están evaluando periodos de tratamiento más largos (10 días cada fármaco simultáneamente) y regímenes de administración secuencial y simultánea. Se está evaluando la ganancia de supervivencia como medida de los niveles de procaspasa 3 y caspasa 3 pre- y 20 postratamiento. La terapia combinada también puede ser efectiva para el tratamiento de líneas celulares de neuroesferas derivadas de pacientes con glioblastoma de Hopkins, por ejemplo, en modelos de xenoinjertos y sujetos mamíferos.

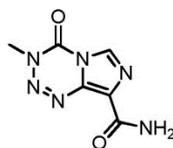
Agentes terapéuticos y actividad

25 PAC-1 (2-(4-bencilpiperazin-1-il)-N-[(2-hidroxi-3-prop-2-enil-fenil)metilidenoamino]acetamida) induce selectivamente la apoptosis en células cancerosas. En la patente de Estados Unidos con n.º de publicación 2012/0040995 (Hergenrother y col.) se describen métodos de preparación de PAC-1.



30 **PAC-1**

La temozolomida (TMZ) es un fármaco citotóxico de quimioterapia clasificado como agente alquilante. La TMZ es un derivado de la imidazotetrazina y es el profármaco de la MTIC (3-metil-(triazen-1-il)imidazol-4-carboxamida). La 35 preparación de la TMZ y sus derivados se describe en la patente US5260291 (Lunt y col.).



40 **Temozolomida (TMZ)**

El beneficio terapéutico de la temozolomida procede de su capacidad de alquilación/metilación del ADN, que se puede producir en las posiciones N-7 o O-6 de los residuos de guanina. Esta metilación daña el ADN y desencadena 40 la muerte de las células tumorales. Algunas células tumorales son capaces de reparar este tipo de daño al ADN y, por lo tanto, de reducir la eficacia terapéutica de la temozolomida. El mecanismo de esta resistencia puede ser mediante expresión de la proteína O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) o O-6-alquilguanina-ADN alquiltransferasa (AGT o AGAT). La presencia de la proteína O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) en los tumores cerebrales predice una pobre respuesta a la temozolomida y estos pacientes se benefician poco de la 45 quimioterapia con temozolomida. Por consiguiente, se necesitan terapias nuevas para el tratamiento de tumores cerebrales y afecciones relacionadas.

La TMZ se ha usado para el tratamiento del astrocitoma de grado IV, también conocido como glioblastoma multiforme, un tumor cerebral agresivo, y de tumores cerebrales del tipo oligodendroglioma. La TMZ se ha usado para el tratamiento del melanoma y está además indicada para el astrocitoma anaplásico de grado III recidivante.

- 5 A pesar de que hay un claro beneficio en las estrategias anticancerígenas que usan combinaciones de fármacos que actúan sobre diferentes dianas, el trabajo descrito en el presente documento demuestra que se puede observar una sinergia drástica con compuestos que actúan mediante mecanismos dispares. Este enfoque multiobjetivo puede tener ventajas especiales cuando se busca la activación de una enzima.
- 10 El PAC-1 es seguro en mamíferos, y un derivado del PAC-1 resultó eficaz en un ensayo clínico de fase I de cachorros de perro con linfoma (Peterson y col., Cancer Res 70, 7232-7241 (2010)), por tanto, la sinergia observada con la TMZ debería tener un impacto clínico significativo. El interés en la activación de enzimas con moléculas pequeñas crece rápidamente. Los datos descritos en el presente documento indican que las estrategias dirigidas que usan PAC-1 y TMZ son un enfoque general de la mejora drástica del efecto biológico previsto y deberían tener
- 15 un impacto clínico considerable debido a su eficacia.

Métodos *in vitro* composiciones para uso de la invención

La invención proporciona métodos *in vitro* composiciones para uso en la inducción selectiva de la apoptosis en una célula cancerosa, que comprenden la administración a una célula cancerosa de una combinación de compuestos capaz de modificar una molécula de procaspasa-3 de dicha célula cancerosa; donde la combinación de compuestos es PAC-1 y TMZ. También se proporcionan métodos *in vitro* composiciones para uso en la inducción selectiva de la apoptosis en una célula cancerosa, que comprenden la administración a una célula cancerosa de una combinación de compuestos capaz de modificar una molécula de procaspasa-3 de la célula cancerosa; donde la combinación de compuestos es PAC-1 y TMZ, por ejemplo, donde la célula cancerosa está en un paciente que necesita tratamiento.

20

25 La invención proporciona métodos *in vitro* composiciones para uso adicionales donde la combinación de compuestos mencionada es PAC-1 y TMZ, por ejemplo, como método de tratamiento de una célula cancerosa, que comprende (a) la identificación de una susceptibilidad potencial al tratamiento de una célula cancerosa con un compuesto activador de procaspasa; y (b) la exposición de la célula cancerosa a una cantidad efectiva de una combinación de

30 un compuesto activador de procaspasa y TMZ. También se proporciona un método *in vitro* una composición para uso en el tratamiento de una célula cancerosa, que comprende (a) la identificación de una susceptibilidad potencial al tratamiento de una célula cancerosa con un compuesto activador de procaspasa; y (b) la exposición de dicha célula cancerosa a una cantidad efectiva de PAC-1 y TMZ, donde el PAC-1 es capaz de activar al menos una de entre la procaspasa-3 y la procaspasa-7. También se proporciona un método *in vitro*

35 y composiciones para uso en la inducción de la muerte en una célula cancerosa (por ejemplo, matando una célula cancerosa), que comprende la administración a una célula cancerosa de TMZ y un compuesto capaz de activar una molécula de procaspasa-3 de la célula cancerosa.

La invención proporciona además una composición que comprende una cantidad efectiva de la combinación de PAC-1 y TMZ. La composición se puede usar en la inducción de la apoptosis en una célula. En algunas formas de realización, la combinación de compuestos no cruza la barrera sangre-cerebro en un grado tal que cause efectos neurotóxicos apreciables en un paciente. Los métodos de la invención incluyen la puesta en contacto *in vitro* de una o más células con una cantidad efectiva de una combinación de compuestos descritos en el presente documento. Por tanto, la invención también proporciona métodos *in vitro* de tratamiento de una célula que incluyen la

45 puesta en contacto de una célula con una cantidad efectiva de una combinación de compuestos descritos en el presente documento.

Definiciones

50 Tal y como se usan en el presente documento, los términos mencionados tienen los significados siguientes. Todos los demás términos y expresiones usados en esta memoria descriptiva tienen sus significados habituales, tal y como los entendería un experto en la materia. Tales significados habituales se pueden conseguir consultando diccionarios técnicos, tales como el Hawley's Condensed Chemical Dictionary 14th Edition, de R.J. Lewis, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 2001.

55 Las referencias en la memoria descriptiva a «una forma de realización», «forma de realización», etc., indican que la forma de realización descrita puede incluir un aspecto, una función, una estructura, un resto o una característica concretos, pero no todas las formas de realización incluyen necesariamente ese aspecto, función, estructura, resto o característica. Asimismo, tales expresiones pueden, pero no necesariamente, referirse a la misma forma de

60 realización a la que se hace referencia en otras partes de la memoria descriptiva. Además, cuando se describen un

aspecto, una función, una estructura, un resto o una característica concretos en relación con una forma de realización, el experto en la materia sabe reflejar o conectar tal aspecto, función, estructura, resto o característica con otras formas de realización, estén o no descritas explícitamente.

- 5 Las formas singulares de «unos», «unas», «los» y «las» incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, una referencia a «un compuesto» incluye una pluralidad de tales compuestos, de tal forma que un compuesto X incluye una pluralidad de compuestos X. Además, cabe señalar que las reivindicaciones pueden estar redactadas de forma que excluyan cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base precedente para el uso de terminología exclusiva, tal como
- 10 «únicamente», «solo» y similares, en relación con la mención de elementos de reivindicación o el uso de una limitación «negativa».

- El término «y/o» significa cualquiera de los elementos, cualquier combinación de los elementos o todos los elementos con los que esté asociado este término. La expresión «uno o más» es fácil de entender por un experto en
- 15 la materia, especialmente cuando la lee dentro del contexto de su uso. Por ejemplo, uno o más sustituyentes en un anillo fenilo se refiere a de uno a cinco, o de uno a cuatro, por ejemplo, si el anillo fenilo está disustituido.

- El término «aproximadamente» se puede referir a una variación de $\pm 5\%$, $\pm 10\%$, $\pm 20\%$, o $\pm 25\%$ del valor especificado. Por ejemplo, «aproximadamente 50» por ciento puede, en algunas formas de realización, conllevar
- 20 una variación del 45 al 55 por ciento. Para intervalos enteros, el término «aproximadamente» puede incluir uno o dos números enteros mayores que y/o menores que un número entero mencionado en cada extremo del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, el término «aproximadamente» pretende incluir valores, por ejemplo, porcentajes en peso, próximos al intervalo mencionado que son equivalentes en términos de funcionalidad del ingrediente individual, la composición o la forma de realización.

- 25 Como un experto en la materia entenderá, todos los números, incluidos los que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como el peso molecular, condiciones de reacción, etc., son aproximaciones y se entiende que están opcionalmente modificados en todos los casos por el término «aproximadamente». Estos valores pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que busquen obtener los expertos en la materia que
- 30 utilizan las enseñanzas de las descripciones del presente documento. También se entiende que tales valores contienen inherentemente variabilidad, que resulta necesariamente de las desviaciones estándar encontradas en sus correspondientes medidas de ensayo.

- Como un experto en la materia entenderá, a todos los propósitos, especialmente en términos de proporcionar una
- 35 descripción escrita, todos los intervalos mencionados en el presente documento también abarcan todos los posibles subintervalos y combinaciones de subintervalos de los mismos, así como los valores individuales que componen el intervalo, especialmente los valores enteros. Un intervalo mencionado (por ejemplo, porcentajes en peso o grupos carbono) incluye cada valor, número entero, decimal o identidad específicos dentro del intervalo. Cualquier intervalo enumerado se puede reconocer fácilmente como suficientemente descriptivo y permite descomponer el mismo
- 40 intervalo en, al menos, mitades, tercios, cuartos, quintos o décimas iguales. Como ejemplo no limitante, cada rango comentado en el presente documento se puede descomponer fácilmente en un tercio inferior, un tercio medio y un tercio superior, etc. Como también entenderá un experto en la materia, todas las expresiones tales como «hasta», «al menos», «mayor que», «menos de», «más de», «o más» y similares, incluyen el número mencionado y tales términos se refieren a intervalos que pueden ser descompuestos posteriormente en subintervalos, tal y como se ha
- 45 comentado anteriormente. Del mismo modo, todas las proporciones mencionadas en el presente documento también incluyen todas las subproporciones que caen dentro de la proporción más amplia. Por consiguiente, los valores mencionados para radicales, sustituyentes e intervalos, son meramente ilustrativos; no excluyen otros valores definidos u otros valores dentro de intervalos definidos para radicales y sustituyentes.

- 50 El término «puesta en contacto» se refiere al acto de tocar, hacer contacto o acercar, incluyendo a nivel celular o molecular, por ejemplo, para provocar una reacción fisiológica, una reacción química o un cambio físico, por ejemplo, en una solución, en una mezcla de reacción, *in vitro*, *in vivo*.

- «Simultáneamente» significa (1) simultáneamente en el tiempo, o (2) en momentos diferentes durante el curso de un
- 55 programa de tratamiento común.

- «Secuencialmente» se refiere a la administración de un agente activo usado en el método seguida de la administración de otro agente activo. Después de la administración de un agente activo, el siguiente agente activo se puede administrar sustancialmente inmediatamente después del primero, o el siguiente agente activo se puede
- 60 administrar, tras un periodo de tiempo efectivo, después del primer agente; el periodo de tiempo efectivo es la

cantidad de tiempo dada para la consecución del máximo beneficio de la administración del primer agente activo.

Una «cantidad efectiva» se refiere a una cantidad efectiva para tratar una enfermedad, un trastorno y/o una afección, o para provocar un efecto mencionado, tal como la activación o inhibición. Por ejemplo, una cantidad efectiva puede ser una cantidad efectiva para reducir la progresión o severidad de la afección o de los síntomas que se están tratando. Los expertos en la materia son perfectamente capaces de determinar una cantidad terapéuticamente efectiva. El término «cantidad efectiva» pretende incluir una cantidad de un compuesto descrito en el presente documento, o una cantidad de una combinación de compuestos descritos en el presente documento que, por ejemplo, es efectiva para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno, o para tratar los síntomas de la enfermedad o el trastorno, en un huésped. Por tanto, «cantidad efectiva» generalmente significa una cantidad que proporciona el efecto deseado. En una forma de realización, una cantidad efectiva se refiere a una cantidad del agente activo descrito en el presente documento que es efectiva, bien por sí sola, bien en combinación con un vehículo farmacéutico, tras la administración de una dosis sencilla o múltiple a una célula o a un sujeto, por ejemplo, un paciente, en la inhibición del crecimiento o la proliferación, la inducción de la muerte o el impedimento del crecimiento de células hiperproliferativas. Tal inhibición del crecimiento o la muerte se pueden reflejar como una prolongación de la supervivencia del sujeto, por ejemplo, un paciente, más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento, o cualquier mejora en la prognosis del sujeto en comparación con en ausencia de tal tratamiento.

Los términos «tratando», «tratar» y «tratamiento» incluyen (i) la prevención de se produzca una enfermedad o afección médica o patológica (por ejemplo, profilaxis); (ii) la inhibición de la enfermedad, o afección médica o patológica, o el freno de su desarrollo; (iii) el alivio de la enfermedad o condición médica o patológica; y/o (iv) la reducción de los síntomas asociados con la enfermedad o condición médica o patológica. Por tanto, los términos «tratar», «tratamiento» y «tratando» se pueden ampliar a la profilaxis y pueden incluir impedir, la prevención, el impedimento, la reducción, la detención o la reversión de la progresión o severidad de la afección o los síntomas que se están tratando. Como tal, el término «tratamiento» puede incluir la administración médica, terapéutica y/o profiláctica, según convenga. En algunas formas de realización, los términos «tratamiento», «tratar» o «tratado» se pueden referir a (i) el impedimento del crecimiento tumoral o rebrote del tumor (profilaxis), (ii) una reducción o eliminación de los síntomas o la enfermedad de interés (terapia) o (iii) la eliminación o destrucción del tumor (cura).

Los términos «inhibir», «inhibiendo» e «inhibición» se refieren al ralentizamiento, la detención, o la reversión del crecimiento o la progresión de una enfermedad, una infección, una afección o un grupo de células. La inhibición puede ser mayor de aproximadamente el 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 95%, o 99%, por ejemplo, en comparación con el crecimiento o la progresión que se producen en ausencia del tratamiento o la puesta en contacto. Adicionalmente, los términos «inducir», «inhibir», «potenciar», «elevar», «aumentar», «reducir» o similares, denotan diferencias cuantitativas entre dos estados y pueden referirse a, al menos, diferencias estadísticamente significativas entre los dos estados. Por ejemplo, «una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de células hiperproliferativas» significa que la velocidad de crecimiento de las células puede ser, en algunas formas de realización, al menos estadísticamente diferente de la de las células sin tratar. Tales términos se pueden aplicar en el presente documento para, por ejemplo, velocidades de proliferación.

La expresión «inhibición del crecimiento o la proliferación» de la célula hiperproliferativa, por ejemplo, una célula neoplásica, se refiere al ralentizamiento, la interrupción, el freno o la detención de su crecimiento y metástasis, y no indica necesariamente una eliminación total del crecimiento neoplásico.

El término «cáncer» generalmente se refiere a cualquiera de un grupo de más de 100 enfermedades provocadas por el crecimiento incontrolado de células anómalas. El cáncer puede tomar la forma de tumores sólidos y linfomas, así como de cánceres no sólidos tales como la leucemia. A diferencia de las células normales, que se reproducen hasta su maduración y, a continuación, solo lo necesario para reemplazar a células heridas, las células del cáncer pueden crecer y dividirse sin fin, desplazando a las células cercanas y, finalmente, extendiéndose a otras partes del cuerpo.

La invención proporciona métodos *in vitro* composiciones para uso en el tratamiento del cáncer y las afecciones cancerosas. El término «afección cancerosa» se refiere a cualquier afección en la que las células están en un estado o condición anómalos que se caracterizan por una rápida proliferación o neoplasia. Una afección cancerosa puede ser maligna o no maligna (por ejemplo, una afección pancreática) por naturaleza. Para describir aún más una «afección cancerosa», se pueden usar los términos «hiperproliferativa», «hiperplásica», «hiperplasia», «maligna», «neoplásica» y «neoplasia». Estos términos se pueden usar indistintamente y pretenden incluir todos los tipos de crecimiento hiperproliferativo, crecimiento hiperplásico, crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados malignamente, independientemente del tipo histopatológico, el estado de invasividad o la determinación cancerosa (por ejemplo, maligna y no maligna).

60

El término «neoplasia» se refiere al crecimiento de nuevas células que deriva en una pérdida de la capacidad de respuesta a controles de crecimiento normal, por ejemplo, crecimiento de células neoplásicas. Una «hiperplasia» se refiere a células que experimentan una velocidad de crecimiento anormalmente alta. Sin embargo, estos términos se pueden usar indistintamente, como su contexto revelará, para hacer referencia generalmente a células que experimentan velocidades de crecimiento celular anormalmente altas. Entre las «neoplasias» y las «hiperplasias» se incluyen los tumores, que pueden ser benignos, premalignos, carcinomas in situ, malignos, sólidos o no sólidos.

Se ha encontrado que la combinación de PAC-1 y TMZ es especialmente efectiva para el tratamiento de cánceres del cerebro. Entre los cánceres del cerebro se incluyen los oligodendrogliomas y los glioblastomas, glioblastoma multiforme (GBM) incluido. Los tejidos afectados por las células cancerosas pueden estar en el cerebro mismo (por ejemplo, en el cráneo o el canal espinal central) o en el tejido linfático, en los vasos sanguíneos, en los nervios craneales, en las membranas envolventes del cerebro (meninges), en el cráneo, en la glándula pituitaria o en la glándula pineal. Las formas concretas de cáncer cerebral que se pueden tratar incluyen astrocitomas, condromas, condrosarcomas, cordomas, linfomas del SNC (sistema nervioso central), craneofaringiomas, ependimomas, gangliogliomas, ganglioneuromas (también denominados gangliocitomas), gliomas, astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas incluidos, hemangioblastomas (también denominados tumores vasculares), tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET) tales como meduloblastomas, meningiomas y schwannomas vestibulares (antiguamente conocidos como neuromas/schwannomas acústicos).

La combinación también se puede usar para tratar tumores metastásicos que invaden la esfera intracraneal a partir de cánceres procedentes de otros órganos del cuerpo. Habitualmente, se hace referencia a estas afecciones como tumores cerebrales secundarios. Los tumores cerebrales secundarios que se pueden tratar con la combinación de PAC-1 y TMZ incluyen tumores metastásicos del cerebro procedentes del cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma maligno, cáncer de riñón, cáncer de colon y otros carcinomas.

Entre otros ejemplos de afecciones cancerosas dentro del alcance de la invención se incluyen los neuroblastomas y los carcinomas osteogénicos (por ejemplo, el cáncer de huesos o crecimiento neoplásico de tejido en el hueso). Entre los ejemplos de tumores óseos primarios que se pueden tratar con la combinación de PAC-1 y TMZ se incluyen los osteosarcomas, condrosarcomas, el sarcoma de Ewing, los fibrosarcomas y similares, así como tumores óseos secundarios tales como lesiones metastásicas que se han extendido desde otros órganos, carcinomas de mama, pulmón y próstata incluidos.

Formulaciones farmacéuticas

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para preparar composiciones farmacéuticas terapéuticas, por ejemplo, mediante combinación de los compuestos con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los compuestos se pueden añadir a un vehículo en forma de una sal o un solvato. Por ejemplo, en los casos en los que los compuestos son los suficientemente ácidos o básicos como para formar sales ácidas o básicas estables no tóxicas, puede ser conveniente la administración de los compuestos como sales. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales de adición de ácidos orgánicos formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metanosulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, α -cetoglutarato, and β -glicerofosfato. También se pueden formar sales inorgánicas adecuadas, sales como clorhidratos, hálidos, sulfatos, nitratos, bicarbonato y carbonato incluidas.

Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden obtener usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante reacción de un compuesto lo suficientemente básico, tal como una amina, con un ácido adecuado para proporcionar un compuesto iónico fisiológicamente aceptable. También se pueden preparar mediante métodos análogos sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio) de ácidos carboxílicos.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden formular como composiciones farmacéuticas y se pueden administrar a un huésped mamífero, tal como un paciente humano, en una variedad de formas. Las formas se pueden adaptar específicamente a una vía de administración seleccionada, por ejemplo, administración oral o parenteral, por vía intravenosa, intramuscular, tópica o subcutánea.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar sistémicamente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. La solubilidad de los activos se puede aumentar mediante el uso de ciclodextrinas, tales como la 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Para administración oral, los vehículos se pueden encerrar en cápsulas de gelatina duras o blandas, se pueden comprimir en comprimidos o se pueden incorporar directamente al alimento de la dieta de un paciente.

Los compuestos también se pueden combinar con uno o más excipientes y usar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, tabletas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Habitualmente, tales composiciones y preparaciones contienen al menos un 0,1 % de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variar y puede ser, convenientemente, desde aproximadamente el 1 % hasta 5 aproximadamente el 60 %, o desde aproximadamente el 2 % hasta aproximadamente el 25 %, del peso de una forma de dosificación unitaria dada. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se puede obtener un nivel de dosificación efectivo.

Los comprimidos, las tabletas, las pastillas, las cápsulas y similares también pueden contener uno o más de los 10 siguientes: aglutinantes tales como goma de tragacanto, acacia, fécula de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como fécula de maíz, fécula de patata, ácido alginico y similares; y un lubricante tal como el estearato de magnesio. También se puede añadir un agente edulcorante tal como sucrosa, fructosa, lactosa o aspartamo; o un agente saborizante tal como menta, aceite de gaulteria o saborizante de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un 15 vehículo líquido tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Puede haber presentes otros diversos materiales, tales como recubrimientos u otras formas distintas de modificar la forma física de la forma de dosificación unitaria sólida. Por ejemplo, los comprimidos, las pastillas o las cápsulas se pueden recubrir con gelatina, cera, goma laca, azúcar o similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sucrosa o fructosa como agente edulcorante, metilparabenos y propilparabenos como conservantes, un colorante y un saborizante tal como uno con 20 sabor a cereza o naranja. Cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debería ser farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo se puede incorporar en preparaciones y los dispositivos de liberación sostenida.

El compuesto activo se puede administrar intravenosamente o intraperitonealmente mediante infusión o inyección. 25 Se pueden preparar soluciones del compuesto activo o sus sales en agua, opcionalmente mezcladas con una tensioactivo no tóxico. Se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina o mezclas de los mismos, o en un aceite farmacéuticamente aceptable. En condiciones de uso y almacenamiento normales, las preparaciones pueden contener un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéuticamente aceptables para inyección o infusión pueden incluir soluciones acuosas estériles, dispersiones, o polvos estériles que comprendan el ingrediente activo adaptado para la 30 preparación extemporánea de inyectables estériles o soluciones o dispersiones infusibles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. La forma de dosificación última debería ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El transportador o vehículo líquido puede ser un solvente o un medio de dispersión 35 líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez correcta se puede mantener, por ejemplo, mediante formación de liposomas, mediante mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antifúngicos y antibacterianos, por 40 ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tamponadores o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y/o gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante incorporación del compuesto activo, en la 45 cantidad requerida, en el solvente apropiado con diversos otros agentes anteriormente enumerados, según sea necesario, seguida opcionalmente de esterilización por filtración. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación pueden incluir técnicas secado al vacío y secado por congelación, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado 50 presente en las soluciones previamente esterilizadas por filtración.

Las dosis útiles de los compuestos descritos en el presente documento se pueden determinar mediante comparación de su actividad *in vitro* su actividad *in vivo* en modelos animales. Los métodos de extrapolación de las 55 dosis efectivas en ratones y otros animales a humanos se conocen en la técnica; véase, por ejemplo, la patente US4938949 (Borch y col.). La cantidad de un compuesto, o una sal activa o derivado de la misma, necesaria para su uso en el tratamiento variará, no solo con el compuesto concreto o la sal seleccionada, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la afección que se está tratando y la edad y estado del paciente, y, en última instancia, será según criterio de un médico o terapeuta encargado.

60 La combinación de compuestos se puede administrar cómodamente en una forma de dosificación unitaria que

contenga, por ejemplo, de 100 a 5000 mg/m², de 300 a 4000 mg/m², de 370 a 3700 mg/m², de 50 a 750 mg/m², o de 750 a 4000 mg/m² de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. Cada compuesto, individualmente o en combinación, también se puede administrar en de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, o aproximadamente 50 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, o aproximadamente 150 mg/kg, o en un intervalo desde cualquiera de los valores antes mencionados hasta cualquier otro de los valores antes mencionados. Los compuestos también se pueden administrar a un sujeto para proporcionar una concentración de los fármacos, por sí solos o en combinación, en el plasma estable, de aproximadamente 1 µmol/L a aproximadamente 25 µmol/L, o aproximadamente 10 µmol/L, o aproximadamente 15 µmol/L.

En algunas formas de realización, la invención proporciona los compuestos en concentraciones efectivas de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 µM. En otra forma de realización, las concentraciones efectivas son de aproximadamente 200 nM a aproximadamente 50 µM, de aproximadamente 500 nM a aproximadamente 40 µM, de aproximadamente 750 nM a aproximadamente 25 µM, de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 20 µM, o de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 10 µM. En otra forma de realización, la concentración efectiva se considera que es un valor tal como una concentración con una actividad del 50 % en un ensayo de activación de la procaspasa directo, en un ensayo de inducción de la apoptosis celular o en una evaluación clínica terapéutica en animales. En una forma de realización, tal valor es inferior a aproximadamente 200 µM. En otra forma de realización, el valor es inferior a aproximadamente 10 µM, pero superior a aproximadamente 10 nM. La dosis deseada se puede presentar cómodamente en una dosis única o en dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, de dos, tres, cuatro o más subdosis al día. Las subdosis en sí misma puede dividirse además en, por ejemplo, un número de administraciones discretas espaciadas holgadamente.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden ser agentes antitumorales y pueden tener mayor potencia y/o menor toxicidad que la administración de cualquier agente por separado. La invención proporciona métodos terapéuticos de tratamiento del cáncer en un mamífero, que implican la administración a un mamífero con cáncer de una cantidad efectiva de un compuesto o composición descritos en el presente documento. Un mamífero incluye un primate, humano, roedor, canino, felino, bovino, ovino, equino, porcino, caprino, bovino y similares. Cáncer se refiere a cualquiera de los diversos tipos de neoplasias malignas, por ejemplo, cáncer de colon, melanoma y leucemia, entre otros descritos en el presente documento, y, en general, se caracteriza por una proliferación celular no deseable, por ejemplo, crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión de tejidos locales y metástasis.

La capacidad de un compuesto de la invención para tratar el cáncer se puede determinar mediante el uso de ensayos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se conoce el diseño de protocolos de tratamiento, evaluación de la toxicidad, análisis de datos, cuantificación de la muerte de células tumorales e importancia biológica del uso de la detección de tumores trasplantables. Además, se puede determinar la capacidad de un compuesto para tratar el cáncer usando los ensayos descritos anteriormente y presentes en las referencias y los documentos de patente citados en el presente documento.

EJEMPLOS

45 Ejemplo 1. Eficacia *in vivo* del PAC-1 en combinación con temozolomida (TMZ) en el glioma 9L de rata

El gliosarcoma 9L se mantuvo como una masa sólida subcutánea en los costados de las ratas F344. Para la implantación intracraneal, se extirpó quirúrgicamente el tumor de tipo gliosarcoma 9L del animal que sirvió de vehículo y se cortó en trozos de 1 mm³ en el momento de la implantación. Estos trozos del tumor de 1 mm³ se implantaron intracranealmente en 32 ratas F344 tal y como se ha descrito anteriormente (Joshi y col., Evaluation of tyrosine kinase inhibitor combinations for glioblastoma therapy. PLoS One (2012) 7: e44372; Gallia y col., Inhibition of Akt inhibits growth of glioblastoma and glioblastoma stem-like cells. Mol. Cancer Ther. (2009) 8: 386-393).

Se dividieron los animales en los siguientes cuatro grupos experimentales, con ocho animales por grupo: (1) Control, (2) PAC-1 solo, (3) TMZ sola, and (4) PAC -1 + TMZ. Los animales control solo recibieron agua. Dos grupos de animales de PAC -1 solo y PAC -1 + TMZ recibieron mediante sonda oral PAC -1 suspendido en agua, administración que empezó el día 0, seis horas después de la implantación. Se administró PAC-1 solo durante 5 días, desde el día 0 hasta el día 4. Los animales de los grupos TMZ sola y PAC-1 + TMZ recibieron 5 dosis de TMZ en agua, administrada oralmente desde el día 5 hasta el día 9. Los animales experimentales no recibieron ningún tratamiento a partir de entonces y se evaluó su supervivencia global. Los animales tratados con la combinación

PAC-1 + TMZ presentaron una supervivencia significativamente mayor (supervivencia media = 28 días) que los animales tratados con TMZ sola (supervivencia media = 20 días) o los animales control no tratados (supervivencia media = 20 días) (**Figura 1**).

5 Ejemplo 2. Formas farmacéuticas de dosificación

Las formulaciones siguientes ilustran formas farmacéuticas de dosificación representativas que se pueden usar para la administración terapéutica o profiláctica de los compuestos combinados descritos en el presente documento (por ejemplo, PAC-1 y TMZ), o de sales o solvatos de los mismos farmacéuticamente aceptables (en lo sucesivo denominadas 'Compuestos X'):

(i) Comprimido 1	mg/comprimido
'Compuestos X'	200,0
Lactosa	77,5
Povidona	15,0
Croscarmelosa sódica	12,0
Celulosa microcristalina	92,5
Estearato de magnesio	3,0
	400,0
(ii) Comprimido 2	mg/comprimido
'Compuestos X'	120,0
Celulosa microcristalina	410,0
Almidón	50,0
Glicolato sódico de almidón	15,0
Estearato de magnesio	5,0
	600,0
(iii) Cápsula	mg/cápsula
'Compuestos X'	110,0
Dióxido de silicio coloidal	1,5
Lactosa	465,5
Almidón pregelatinizado	120,0
Estearato de magnesio	3,0
	700,0
(iv) Inyección 1 (1 mg/mL)	mg/mL
'Compuestos X'	1,0
Fosfato de sodio dibásico	12,0
Fosfato de sodio monobásico	0,7
Cloruro sódico	4,5
Solución de hidróxido sódico 1,0 N (ajuste del pH a 7,0-7,5)	c.s.p
Agua para inyectables	c.s.p. 1 mL
(v) Inyección 2 (10 mg/mL)	mg/mL
'Compuestos X'	10,0

(v) Inyección 2 (10 mg/mL)	mg/mL
Fosfato de sodio monobásico	0,3
Fosfato de sodio dibásico	1,1
Polietilenglicol 400	200,0
Solución de hidróxido sódico 0,1 N (ajuste del pH a 7,0-7,5)	c.s.p
Agua para inyectables	c.s.p. 1 mL
(vi) Aerosol	mg/bote
'Compuestos X'	20
Ácido oleico	10
Tricloromonofluorometano	5 000
Diclorodifluorometano	10 000
Diclorotetrafluoroetano	5 000

Estas formulaciones se pueden preparar mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica farmacéutica. Se apreciará que las composiciones farmacéuticas anteriormente mencionadas se pueden modificar de acuerdo con técnicas farmacéuticas bien conocidas para adaptarse a diferentes cantidades y tipos de ingrediente activo 'Compuestos X'. La formulación en aerosol (vi) se puede usar de manera conjunta con un dispensador de aerosol de dosis medidas estándar. Además, las proporciones e ingredientes concretos se dan meramente a título ilustrativo. Se pueden intercambiar los ingredientes por equivalentes adecuados y se pueden modificar las proporciones en función de las propiedades de la forma de dosificación de interés deseadas.

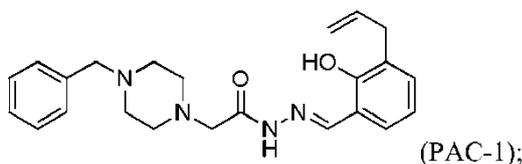
REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:
 (a) un compuesto de Fórmula (I):

5



- (b) el compuesto PAC-1:



10

Y

- (c) un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

15

2. Composición de la reivindicación 1 donde el vehículo comprende agua y opcionalmente un tampón, una ciclodextrina o una combinación de los mismos.

3. Composición de la reivindicación 2 donde la ciclodextrina es 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.

20

4. Composición de la reivindicación 1 donde la concentración del compuesto de Fórmula I es de 100 μM a 1 mM.

5. Composición de la reivindicación 1 donde la concentración de PAC-1 de 2 μM a 50 μM.

25

6. Composición de la reivindicación 1 donde la concentración del compuesto de Fórmula I es de 250 μM a 750 μM y la concentración de PAC-1 es de 5 μM a 30 μM.

7. Composición para uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, donde la composición es una cantidad efectiva de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, y donde dicho uso comprende la puesta en contacto de células cancerosas con una cantidad efectiva de la composición, inhibiendo de ese modo el crecimiento o la proliferación de las células cancerosas.

30

8. Método *in vitro* de inhibición del crecimiento o la proliferación de células cancerosas que comprende la puesta en contacto de células cancerosas con una cantidad efectiva de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, inhibiendo de ese modo el crecimiento o la proliferación de las células cancerosas.

35

9. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 7, o método *in vitro* de la reivindicación 8, donde las células cancerosas son células de glioblastoma o células de oligodendroglioma.

40

10. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 7, o método *in vitro* de la reivindicación 8, donde las células cancerosas son células de osteosarcoma.

11. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 7, o método *in vitro* de la reivindicación 8, donde la puesta en contacto de las células cancerosas con la composición induce la apoptosis en dichas células cancerosas.

45

12. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 o 9-11, o método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde la célula cancerosa se pone en contacto con el compuesto de

Fórmula (I) y el PAC-1 simultáneamente.

13. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 o 9-11, o método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde la célula cancerosa se pone en contacto con el compuesto de Fórmula (I) antes de poner en contacto la célula cancerosa con PAC-1.

14. Composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 o 9-11, o método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde la célula cancerosa se pone en contacto con PAC-1 antes de poner en contacto la célula cancerosa con el compuesto de Fórmula (I).

10 15. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el cáncer es un glioblastoma, un oligodendroglioma o un osteosarcoma.

PAC-1 sinergiza con TMZ para prolongar la supervivencia en un modelo de rata de glioblastoma

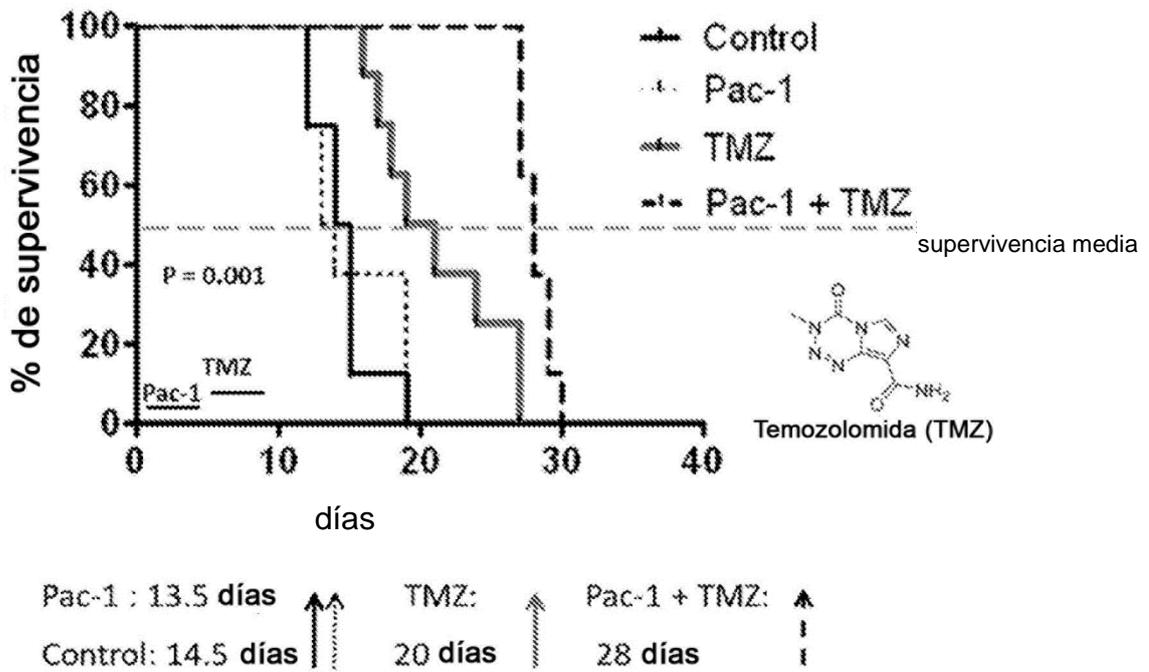


Figura 1

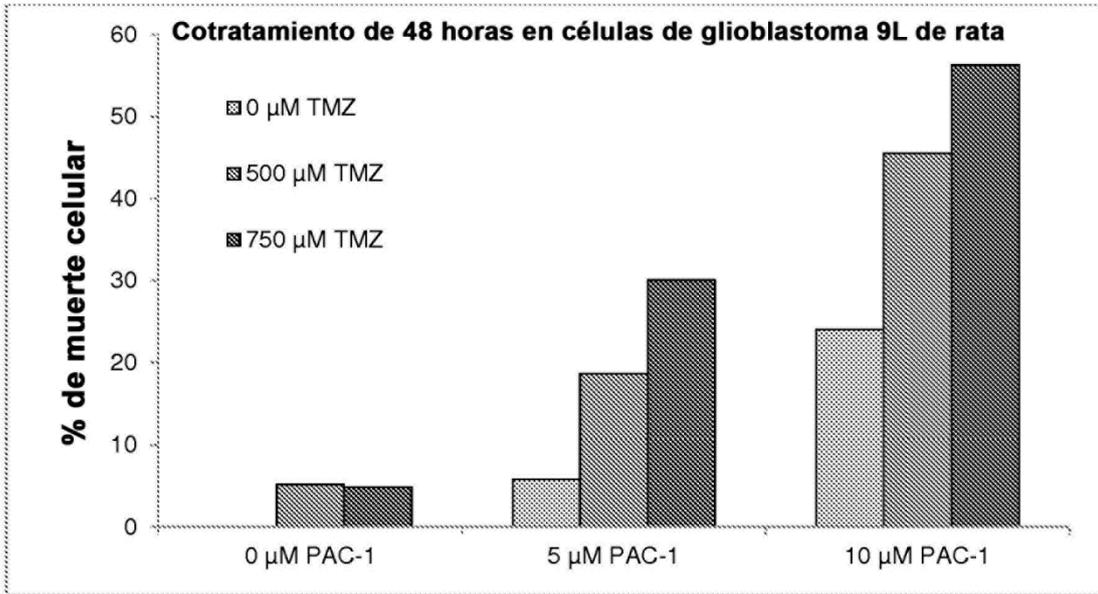


Figura 2A

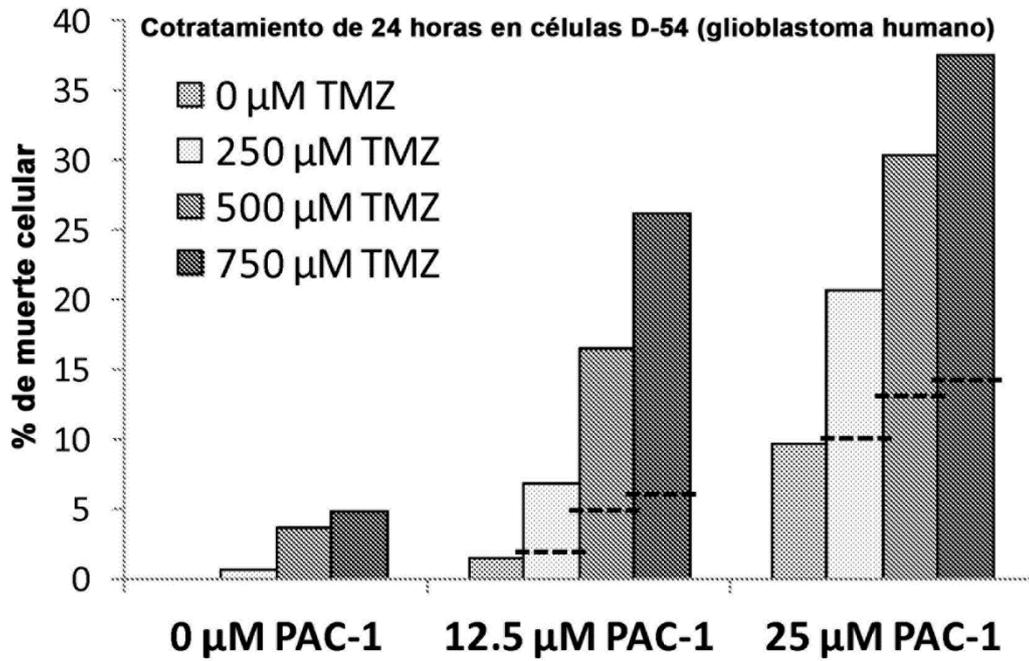


Figura 2B

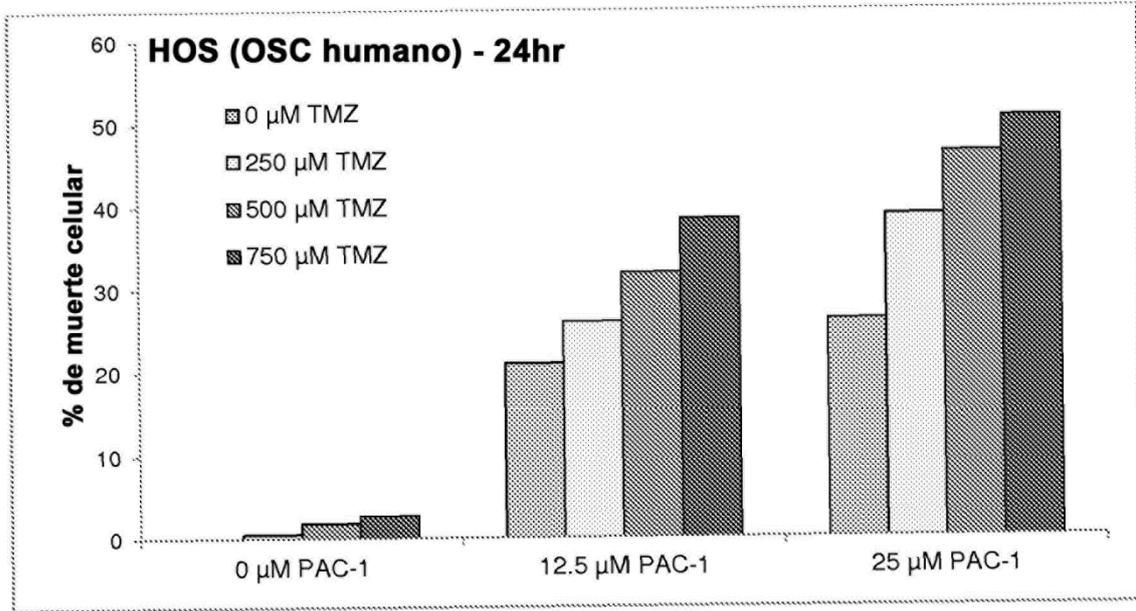


Figura 3A

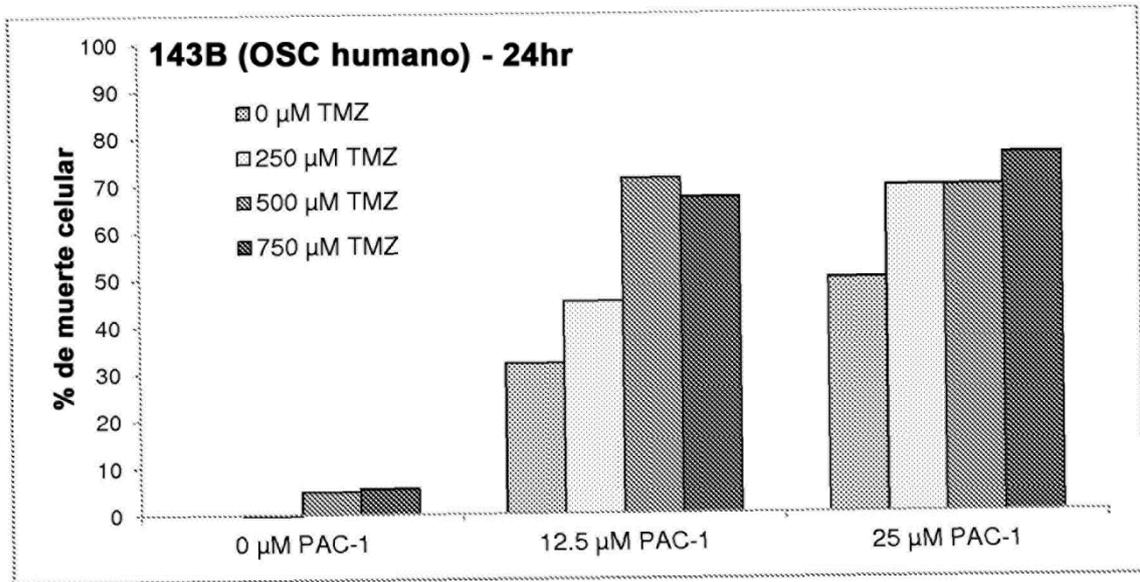


Figura 3B

PAC-1 sinergiza con TMZ para prolongar la supervivencia en un modelo de ratón de osteosarcoma metastásico

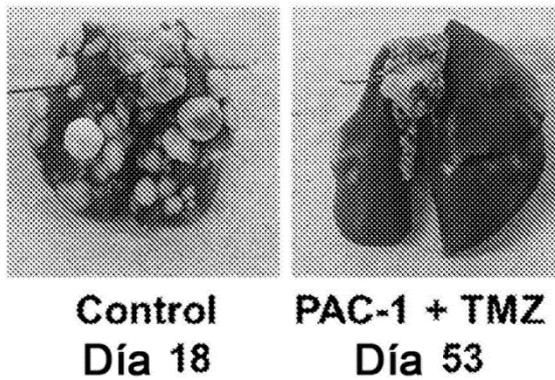
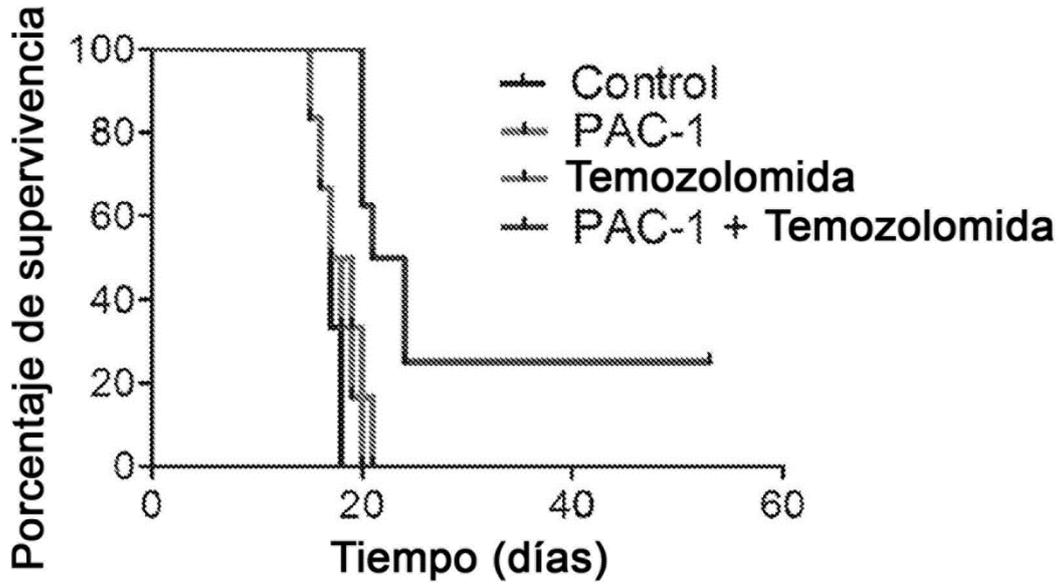


Figura 4