

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 216**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/70** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2010 PCT/US2010/037437**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO10141842**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2010 E 10784166 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2437749**

54 Título: **Método combinado para tratar el cáncer o un estado precanceroso**

30 Prioridad:

**05.06.2009 US 184658 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.03.2018**

73 Titular/es:

**CAVION, INC. (100.0%)  
600 East Water Street, Suite E  
Charlottesville, VA 22902, US**

72 Inventor/es:

**KROUSE, ANDREW J.;  
GRAY, LLOYD S.;  
MACDONALD, TIMOTHY y  
LINDEN, JOEL**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 661 216 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

Método combinado para tratar el cáncer o un estado precanceroso

### 5 Antecedentes de la invención

La terapia contra el cáncer convencional rara vez es curativa y puede tener efectos secundarios adversos significativos. En parte, esto se deriva del mecanismo de acción específico del ciclo celular de la mayoría de los fármacos quimioterápicos, que los hace menos eficaces contra una población de células que representan todas las fases del ciclo celular.

El ciclo celular es la serie de acontecimientos que se producen en una célula que conducen a su división y duplicación. En las células eucariotas, el ciclo puede dividirse en dos periodos, interfase y mitosis. El tránsito a través de estos dos periodos del ciclo celular se conoce como progresión o proliferación. Durante la interfase, la célula crece, acumula los nutrientes necesarios para la mitosis y duplica su ADN. Durante la mitosis, la célula se divide en dos células hijas distintas. La interfase incluye tres fases distintas, la fase de intervalo 1 (gap 1) ( $G_1$ ), la fase S y la fase de intervalo 2 (gap 2) ( $G_2$ ) mientras que la mitosis incluye dos procesos. La fase  $G_1$  incluye el aumento en tamaño de la célula, el aumento de las actividades biosintéticas de la célula y la síntesis de las enzimas necesarias para la replicación del ADN en la etapa posterior. La fase S incluye el comienzo de la síntesis del ADN y la replicación de todos los cromosomas. La fase  $G_2$  dura hasta que la célula entra en mitosis e incluye síntesis de proteínas incluyendo la producción de microtúbulos para la mitosis. La mitosis incluye un proceso en el que los cromosomas de la célula se dividen entre las dos células hijas y un proceso de citocinesis en el que el citoplasma de la célula original se divide formando dos células hijas distintas. El ciclo celular también incluye una fase de reposo, denominada normalmente  $G_0$ . Los límites entre las diversas fases, por ejemplo el límite entre las fases  $G_1$  y S, se denomina punto de control del ciclo celular.

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

En cualquier población de células cancerosas particular o tumor en un individuo, la duración del ciclo celular es variable. Esta variabilidad se debe a diferentes periodos transcurridos en  $G_1$  de  $G_0$ , mientras que la duración de tiempo desde el comienzo de la fase S hasta el final de la fase M es relativamente constante.

El tratamiento quimioterápico convencional sólo altera acontecimientos en la fase S o M del ciclo celular, dejando a las células en las otras fases del ciclo celular relativamente ilesas. Por ejemplo, un agente alquilante actuará en la fase S mientras que los fármacos de estabilización o alteración de microtúbulos actúan en la fase M. Desgraciadamente, no es probable que una célula particular esté en la fase S o M del ciclo celular en un momento específico. Para compensar esto, los fármacos quimioterápicos deben administrarse de manera repetitiva, durante largos periodos de tiempo para aumentar la posibilidad de alcanzar a una célula que está en la fase específica del ciclo celular. Esta administración repetitiva se traduce en dosis mayores de fármacos perjudiciales y en una toxicidad aumentada en un sujeto. El documento US2006/0003020 se refiere a métodos para inhibir la metástasis de células tumorales en cáncer que comprenden administrar una composición que comprende un inhibidor de los canales de calcio de tipo T, tal como mibefradil.

Lo que se desea es un tratamiento para detener el ciclo celular para una fracción clínicamente relevante de células en el punto de control del ciclo celular del SNC, de modo que pueda potenciarse la eficacia de los agentes quimioterápicos.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad o estado en un mamífero que comprende las etapas de; administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de los canales de calcio de tipo T para ralentizar o detener eficazmente la progresión de células eucariotas a través de las fases S,  $G_2$  y M del ciclo celular para aumentar la proporción de las células eucariotas en la fase  $G_1$ , detener la administración del inhibidor de los canales de calcio de tipo T durante un periodo de tiempo, y administrar una dosificación seleccionada del grupo que consiste en una dosificación de al menos un agente quimioterápico, una dosificación de radiación, y combinaciones de las mismas, para destruir la proporción de células eucariotas que progresan más allá de la fase  $G_1$  del ciclo celular tras detener la administración del inhibidor de los canales de calcio de tipo T.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática del ciclo celular. El anillo exterior incluye los estadios de interfase (I)

y mitosis (M), estando exagerada la duración de la mitosis en relación con las otras fases. El anillo interior incluye las fases de intervalo 1 ( $G_1$ ), intervalo 2 ( $G_2$ ) y síntesis (S). No se muestra la fase de intervalo 0 ( $G_0$ ) o de reposo.

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

La figura 3 es una representación esquemática del ciclo celular y la influencia que tienen varios antagonistas de los canales de calcio sobre la progresión del ciclo celular.

La figura 4 es una representación gráfica de los datos medidos durante la terapia combinada.

La figura 5 es una representación gráfica de los datos medidos durante terapia combinada.

## Definiciones

Al describir y reivindicar la invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones expuestas a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratar” incluye administrar terapia para prevenir, curar, mejorar, reducir, inhibir o aliviar/prevenir los síntomas asociados con, un trastorno, enfermedad, lesión o estado específico. Por ejemplo, tratar el cáncer incluye la inhibición o la detención completa del crecimiento de un tumor, la reducción del número de células tumorales, la reducción del tamaño del tumor, la inhibición de la infiltración de células tumorales en los órganos/tejidos periféricos, la inhibición de la metástasis así como el alivio, en cierta medida, de uno o más síntomas asociados con el trastorno. El tratamiento del cáncer también incluye la administración de un agente terapéutico que disminuye directamente la patología de las células tumorales, o que hace que las células tumorales sean más sensibles al tratamiento mediante otros agentes terapéuticos, por ejemplo, radiación y/o quimioterapia. Tal como se usa en el presente documento, el término “tratar” incluye la profilaxis del trastorno o estado específico, o el alivio de los síntomas asociados con un trastorno o estado específico y/o prevenir o eliminar dichos síntomas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. El término también engloba cualquiera de los agentes aprobados por un organismo regulador del gobierno federal de los EE.UU. o enumerado en la Farmacopea de los EE.UU. para su uso en animales, incluyendo humanos.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad de un compuesto de la presente invención que mejora, atenúa, reduce o elimina una enfermedad o estado particular o previene o retrasa la aparición de una enfermedad o estado particular.

Por “mamífero” pretende hacerse referencia a todos los mamíferos, incluyendo, por ejemplo, primates tales como humanos y monos. Ejemplos de otros mamíferos incluidos en el presente documento son conejos, perros, gatos, ganado bovino, cabras, ovejas, ratones, ratas y caballos. Preferiblemente, el mamífero es un humano hembra o macho.

La expresión “estado precanceroso” se refiere a una neoplasia que no es maligna pero que es probable que lo sea si no se trata. Un “estado precanceroso” también se conoce como “estado premaligno” por un experto habitual en la técnica.

Un experto en la técnica entiende que los “antagonistas de los canales de calcio de tipo T” también se conocen como “inhibidores de los canales de calcio de tipo T”.

Tal como se usa en el presente documento, el término “inhibidor del ciclo celular” se refiere a un compuesto que es capaz de ralentizar o detener la progresión de una célula o células en un estadio del ciclo celular impidiendo que progrese al siguiente estadio del ciclo celular.

Tal como se usa en el presente documento, el término “citotoxina” se refiere a un compuesto que es capaz de producir necrosis o apoptosis a una célula que está afectada por el compuesto.

## Descripción detallada de la invención

Las duraciones variables del ciclo celular se determinan predominantemente por el tiempo transcurrido en la fase  $G_1$ . Debido a esto, cualquier célula particular en una población se encontrará en  $G_1$  durante un periodo de tiempo antes de que la célula entre en la fase S del ciclo celular. Para detener el avance del ciclo celular más allá de un punto de control del ciclo celular, puede administrarse un inhibidor del ciclo celular, incluyendo un inhibidor de los canales de

calcio de tipo T.

El inhibidor del ciclo celular se administra en primer lugar a un mamífero en una cantidad terapéuticamente eficaz para ralentizar o detener eficazmente la progresión de células eucariotas a través de las fases S, G<sub>2</sub> y M del ciclo celular, aumentando de ese modo la proporción de las células eucariotas en el punto de control del ciclo celular entre las fases G<sub>1</sub> y S (G<sub>1</sub>/S). El mamífero puede ser un humano. Este método puede usarse para tratar estados cancerosos y precancerosos, y tumores cancerosos y precancerosos en un mamífero.

La administración del inhibidor del ciclo celular hace que las células cancerosas que progresan o proliferan de manera asincrónica en una población se acumulen en G<sub>1</sub>/S cuando avanzan a través del ciclo celular debido a que su capacidad para avanzar a la fase S se detiene por el inhibidor del ciclo celular. Para que una célula pase de la fase G<sub>1</sub> a la fase S a través del punto de control del ciclo celular, la célula requiere la entrada de calcio extracelular para desencadenar cascadas bioquímicas que son necesarias para la progresión. La retirada del calcio del medio extracelular bloquea el tránsito del ciclo celular para cada célula. Este bloqueo puede conseguirse a través de la administración de un inhibidor de los canales de calcio de tipo T. Los inhibidores de los canales de calcio de tipo T adecuados incluyen mibefradil, efonidipino, etosuximida, sunitinib, TTL-1177 (un compuesto patentado, descrito en la referencia: Gray, L.S., Perez-Reyes, E., Gomora, J.C., Haverstick, D.M., Shattock, M., McLatchie, L., Harper, J., Brooks, G., Heady, T., y MacDonald, T.L. (2004) *Cell Calcium* 36, 489-497) y níquel, entre otros. Por tanto, cada célula continúa en la fase G<sub>1</sub> tanto como lo haría en presencia de calcio extracelular, pero llega a bloquearse en su posición cuando se alcanza G<sub>1</sub>/S sin calcio, sincronizando de ese modo las células en G<sub>1</sub>/S. La entrada de calcio en una célula es necesaria para la progresión y el tránsito a través del ciclo celular. Esto se describe adicionalmente en el ejemplo 1 a continuación.

La administración del inhibidor del ciclo celular aumenta el porcentaje de células en G<sub>1</sub>/S. Tras esta administración, se administra una dosificación de al menos un agente quimioterápico, una dosificación de radiación, o una dosificación de ambos, teniendo como objetivo la dosificación destruir células en la fase S del ciclo celular. El agente quimioterápico puede ser un agente quimioterápico antineoplásico, una citotoxina o combinaciones de los mismos. La citotoxina puede ser un agente alquilante. El agente quimioterápico antineoplásico puede ser un antimetabolito o un antimitótico y puede seleccionarse de los ejemplos siguientes; temozolomida (Temo), 5-fluorouracilo, 6-mecaptopurina, bleomicina, carboplatino, cisplatino, dacarbazina, doxorubicina, epirubicina, etopósido, hidroxiurea, ifosfamida, irinotecán, topotecán, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina, mitomicina C y combinaciones de los mismos. La dosificación de al menos un agente quimioterápico puede administrarse antes, después o durante una dosificación de radiación. La dosificación de radiación puede administrarse antes, después o durante una dosificación de al menos un agente quimioterápico. El periodo entre la primera administración del inhibidor del ciclo celular y la citotoxina, permite la acumulación de células en G<sub>1</sub>/S del ciclo celular. Este método aumenta el porcentaje de las células que están en la fase S o M, aumentando de ese modo la eficacia de la dosificación de al menos un agente quimioterápico, la dosificación de radiación, o la dosificación de ambos y reduciendo posteriormente la carga tóxica requerida para destruir una cantidad predeterminada de células eucariotas.

El inhibidor del ciclo celular puede administrarse una segunda vez, tras la administración de la dosificación de al menos un agente quimioterápico, la dosificación de radiación, o la dosificación de ambos para ralentizar el crecimiento de nuevo de las células o tumores diana de modo que pueden proporcionarse administraciones adicionales de la dosificación según sea necesario. Esta segunda administración de un inhibidor del ciclo celular resincronizará un porcentaje de la población de células en G<sub>1</sub>/S.

El inhibidor del ciclo celular puede administrarse a través de varias vías incluyendo parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, de supositorio, transdérmica, tópica u oral. La administración oral del inhibidor del ciclo celular es la más preferida. Una administración oral puede administrarse como una forma farmacéutica unitaria, normalmente una píldora o cápsula junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los inhibidores de los canales de calcio de tipo T limitan la entrada de calcio extracelular en la célula lo que es crítico para varios procesos celulares vitales. El calcio necesario para estos procesos procede del medio extracelular entrando a través de los canales de calcio. Los canales de calcio se agrupan en varias familias basándose en el análisis de secuencia, las características biofísicas y la sensibilidad farmacológica. Estos canales de calcio se han implicado en la regulación de la tensión arterial, el ritmo cardíaco y la proliferación celular. Los estudios también sugieren que los canales de calcio de tipo T pueden desempeñar un papel importante en la degeneración macular relacionada con la edad. Se ha demostrado que al menos un agente farmacológico, el mibefradil, es clínicamente eficaz debido a la inhibición de la función de los canales de tipo T. Los inhibidores de la entrada de calcio son útiles para tratar la hipertensión, la arritmia cardíaca y la proliferación celular clínicamente perjudicial.

Los canales de calcio de tipo T están presentes en células, líneas celulares y específicamente líneas de células cancerosas. Específicamente, se ha demostrado que la isoforma Cav3.2 de los canales de calcio de tipo T se expresa de manera aberrante en tejido de cáncer de mama en comparación con tejido de mama adyacente normal en mujeres japonesas, tal como se comenta en la referencia Asaga, S., Ueda, M., Jinno, H., Kikuchi, K., Itano, O., Ikeda, T., y Kitajima, M. (2006) *Anticancer Res* 26, 35-42.

Los inhibidores del ciclo celular detienen o ralentizan eficazmente la progresión de células eucariotas en puntos de control del ciclo celular, incluyendo G<sub>1</sub>/S, lo que se explica adicionalmente en el ejemplo 2 a continuación. Además, la administración de inhibidores del ciclo celular ralentiza eficazmente el crecimiento o la proliferación de una enfermedad o estado, tal como se explica en el ejemplo 3 a continuación.

Tras la administración del inhibidor del ciclo celular, hay un periodo durante el cual no se añade inhibidor del ciclo celular. Este periodo puede oscilar entre aproximadamente 0 horas y aproximadamente 336 horas. Este periodo permite que las células que se han acumulado en G<sub>1</sub>/S entren en la fase S del ciclo celular. A través de la administración del inhibidor del ciclo celular, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 25 % de células se habrán acumulado en G<sub>1</sub>/S. El aumento en el número de células en la fase S hace que una dosificación administrada de al menos un agente quimioterápico, una dosificación de radiación, o una dosificación de ambos sea más eficaz debido al gran porcentaje de células que resultarán afectadas por cada dosis. Por "afectadas" quiere decirse destruidas o eliminadas.

Tras el periodo en el que no se añade inhibidor del ciclo celular, se administra una dosificación de al menos un agente quimioterápico, una dosificación de radiación, o una dosificación de ambos para destruir una proporción de células en la fase S. Por "destruir" quiere decirse que la célula se somete a apoptosis o necrosis. La dosificación específica de al menos un agente quimioterápico, una dosificación de radiación, o una dosificación de ambos vendrá determinada por la experiencia clínica de un experto en la técnica, donde enfermedades diferentes se tratan con dosificaciones diferentes y agentes diferentes. Para fines a modo de ejemplo únicamente, pueden usarse las siguientes dosificaciones de agentes quimioterápicos para tratar las siguientes enfermedades. En el tratamiento del glioblastoma, puede usarse la citotoxina temozolomida. En el tratamiento del melanoma, puede usarse la citotoxina melfalán o temozolomida. En el tratamiento del cáncer pancreático, puede usarse la citotoxina gemcitabina. En el tratamiento del cáncer de mama, puede usarse la citotoxina gemcitabina. En el tratamiento del cáncer de colon, puede usarse la citotoxina irinotecán o 5-fluorouracilo.

Esta terapia combinada, es decir, la administración de inhibidores del ciclo celular seguido por la administración de una dosificación de al menos un agente quimioterápico, una dosificación de radiación, o una dosificación de ambos, puede usarse para reducir la progresión, la proliferación o el crecimiento de una enfermedad o estado, tal como se explica más detenidamente en los ejemplos 4 y 5 a continuación. En el uso de esta terapia combinada, la misma dosificación de al menos un agente quimioterápico, una dosificación de radiación, o una dosificación de ambos es más eficaz en comparación con una dosificación de agente quimioterápico o radiación cuando se usan solos.

#### Ejemplo 1

Para medir la correspondencia entre la inhibición de la entrada de calcio y la progresión o proliferación, se representó gráficamente la capacidad de varios agentes químicos para inhibir la entrada de calcio frente a la capacidad del mismo agente para inhibir la proliferación, tal como puede observarse en la figura 2 a continuación. Estos agentes eran entidades químicas patentadas sintetizadas en la Universidad de Virginia. Se obtuvo una recta de correlación por mínimos cuadrados con una pendiente de 0,98 y un valor de R<sup>2</sup> de 0,92. De manera convencional, no puede usarse una correlación para inferir causalidad, pero en este caso, se requiere un método bayesiano porque la entrada de calcio es necesaria *a priori* para la proliferación, de manera que el bloqueo de la entrada de calcio bloqueará la proliferación de manera correspondiente. Una recta de regresión con una pendiente muy próxima a 1 significa que esencialmente toda la variación en las variables se traduce en la variación de la otra, lo que significa que no hay acción de estos agentes sobre la proliferación aparte de la inhibición de la entrada de calcio.

#### Ejemplo 2

Se realizó el análisis del ciclo celular usando citometría de flujo y tinción con BUdR. En la figura 3, "Con" representa células de control sin tratar. El resto de los cultivos celulares se trataron con nocodazol, que interfiere con la polimerización de microtúbulos y bloquea el ciclo celular durante la fase M. El tratamiento de células A10 con nocodazol solo bloqueó el tránsito del ciclo celular a través de la fase M tal como se determina mediante citometría de flujo. Dado que las células A10 residen principalmente en el punto de control del ciclo celular entre G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> (véase "Con" en la figura 3), la evaluación de la posibilidad de que un agente farmacológico inhiba el tránsito a la siguiente fase no es tan directa como determinar el bloqueo en otros puntos de control del ciclo celular. Por tanto, se trataron los cultivos celulares durante 24 horas con los antagonistas de los canales de calcio de tipo T mibefradil (mib), níquel (Ni) o TTL-1177 (un compuesto patentado propiedad del cesionario Tau Therapeutics), antes de añadir nocodazol. En caso de ausencia de el efecto sobre los antagonistas de los canales de calcio de tipo T, el nocodazol bloquearía las células en el punto de control del ciclo celular entre G<sub>2</sub> y M tal como ocurre con las células tratadas con este compuesto solo. En cambio, el tratamiento con los antagonistas de los canales de calcio de tipo T detuvo las células en el punto de control del ciclo celular entre G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> e impidió la acumulación en el punto de control del ciclo celular entre G<sub>2</sub> y M que se habría producido de otro modo con nocodazol. Esto muestra que los antagonistas de los canales de calcio de tipo T detienen el ciclo de células en G<sub>1</sub>/S.

Ejemplo 3

Se trasplantaron inmediatamente cánceres pancreáticos extirpados de pacientes en los costados de ratones atímicos y se mantuvieron mediante pases sucesivos, *in vivo*. Se implantaron los tumores trasplantados a un volumen de aproximadamente 100 mm<sup>3</sup> y se dejaron crecer hasta de 200 a 300 mm<sup>3</sup> antes del inicio del tratamiento. Los ratones que portaban el tumor PANC 219 o bien se dejaron sin tratar o bien se trataron con mibefradil a 65 mg/kg v.o. dos veces al día (n=10 en cada grupo). Se normalizó el crecimiento tumoral al tamaño medido al comienzo del tratamiento. Estos resultados se muestran en la figura 4. Un ratón en el grupo de tratamiento murió en el día 9 (D9) tal como se indica por la flecha en la figura 4. A diferencia de los fármacos quimioterápicos convencionales, el tratamiento con inhibidores de calcio de tipo T no produjo remisión tumoral. El tratamiento, en cambio, controló el crecimiento tumoral, mediante la detención de las células tumorales en G<sub>1</sub>/S.

Ejemplo 4

Se realizaron estudios de terapia combinada para glioblastoma humano en un modelo de xenoinjerto murino usando la línea celular D54. Se trataron ratones que portaban implantes subcutáneos de tumores D54, que se había dejado que llegaran a establecerse a un volumen de aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, con mibefradil a 40 mg/kg v.o. cuatro veces al día durante 7 días o se dejaron sin tratar. En el día siete, todos los animales recibieron la citotoxina de la fase S temozolomida a una dosis del 25 % de la DL<sub>10</sub> a lo largo de cinco días. Tras dos días sin tratamiento, se reanudó mibefradil a una dosis de 35 mg/kg v.o. cuatro veces al día en el grupo de ratones que originalmente se trataron con mibefradil. En el día 20, el volumen tumoral medio en el grupo de ratones con temozolomida solo fue de 173 mm<sup>3</sup> en comparación con el grupo de ratones con temozolomida más mibefradil, cuyo volumen tumoral medio fue de 102 mm<sup>3</sup> (p=0,0485; n=10/grupo; prueba de la t de Student de datos agrupados, bilateral). Una prueba de la t de Student de datos agrupados, bilateral en las siete mediciones del volumen tumoral dio p=0,0329. No se sacrificó ningún animal en ningún grupo debido al tamaño del tumor. El volumen medio en el grupo de control, que no recibió intervención, fue de 1214 mm<sup>3</sup> sacrificándose tres animales debido al tamaño del tumor.

Ejemplo 5

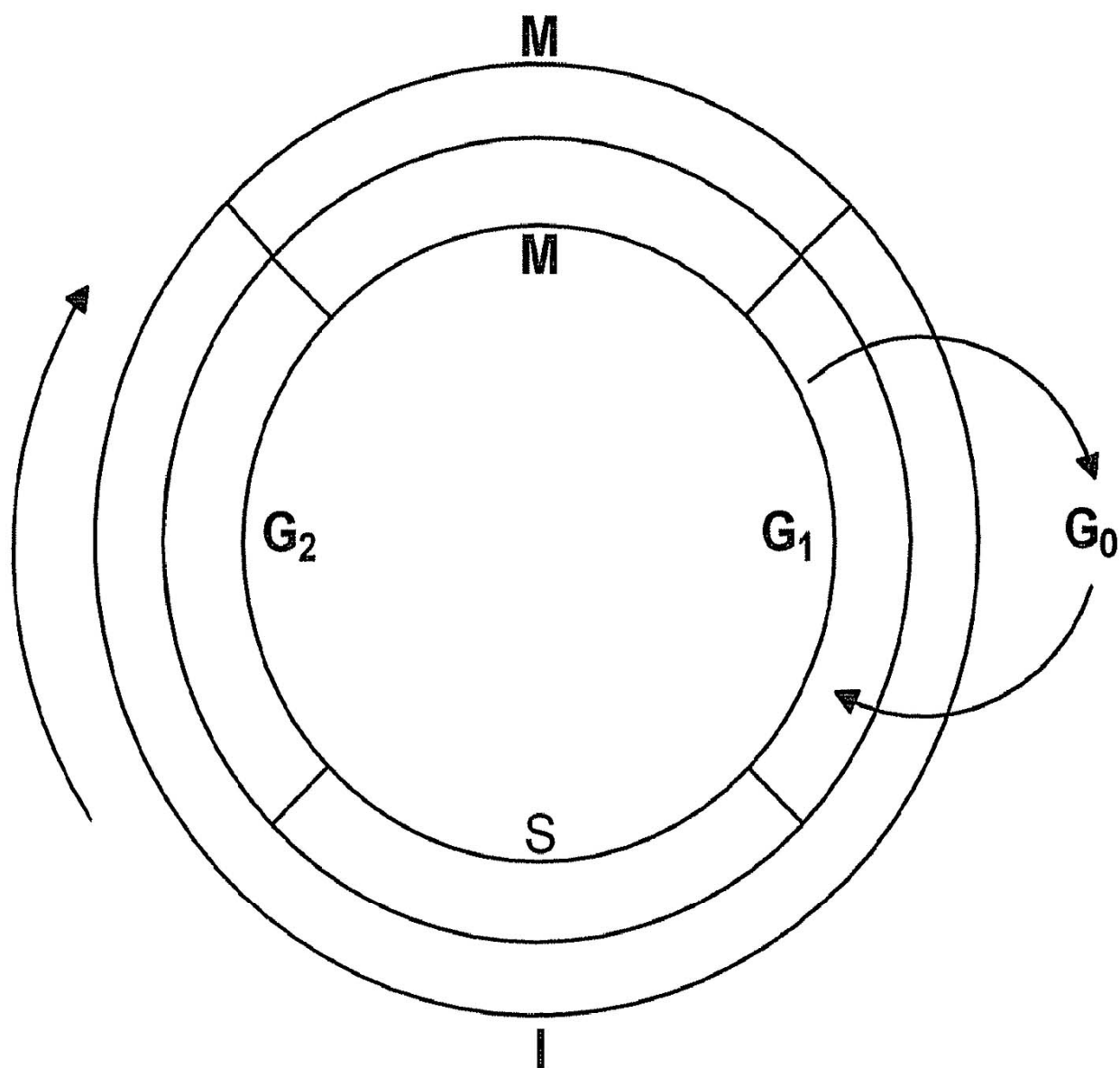
Se realizaron estudios adicionales de terapia combinada para glioblastoma humano en un modelo de xenoinjerto murino usando la línea celular D54. Se trataron ratones que portaban implantes subcutáneos de tumores D54, que se había dejado que llegaran a establecerse, con mibefradil a 40 mg/kg v.o. cuatro veces al día durante 7 días o se dejaron sin tratar. En el día siete, todos los animales recibieron la citotoxina de la fase S temozolomida a una dosis del 25 % de la DL<sub>10</sub> a lo largo de cinco días. Tras dos días sin tratamiento, se reanudó mibefradil a una dosis de 35 mg/kg v.o. cuatro veces al día en el grupo de ratones que originalmente se trataron con mibefradil. Tras cinco días de tratamiento con mibefradil, se administró de nuevo temozolomida durante 5 días, pero a una dosis que es el 10 % de la DL<sub>10</sub>, puesto que la citotoxina había hecho que los tumores en seis de los veinte ratones fueran demasiado pequeños para su medición tras la primera ronda de tratamiento con citotoxina. Los resultados se muestran a continuación en la figura 5. Los ratones tratados con temozolomida solo tuvieron tumores con un volumen medio de 156 ± 65 mm<sup>3</sup> frente a un volumen de 70 ± 19 mm<sup>3</sup> para los animales tratados con mibefradil y temozolomida. Las diferencias en volumen indican que los ratones tratados con terapia de combinación tenían tumores aproximadamente un 55 % más pequeños que los ratones tratados sólo con una citotoxina a lo largo de 30 días. Hacia el día 35, todos los ratones en el grupo combinado tenían cánceres que no podían palpase. Para una prueba de la t bilateral en ambos días 30 y 35, p<0,0001. La prueba de los rangos con signo de Wilcoxon no paramétrica dio el mismo valor de p de 0,00010 en el día 35. En parte, esto refleja el hecho de que todos los tumores en el grupo combinado habían remitido hasta un tamaño no palpable.

## REIVINDICACIONES

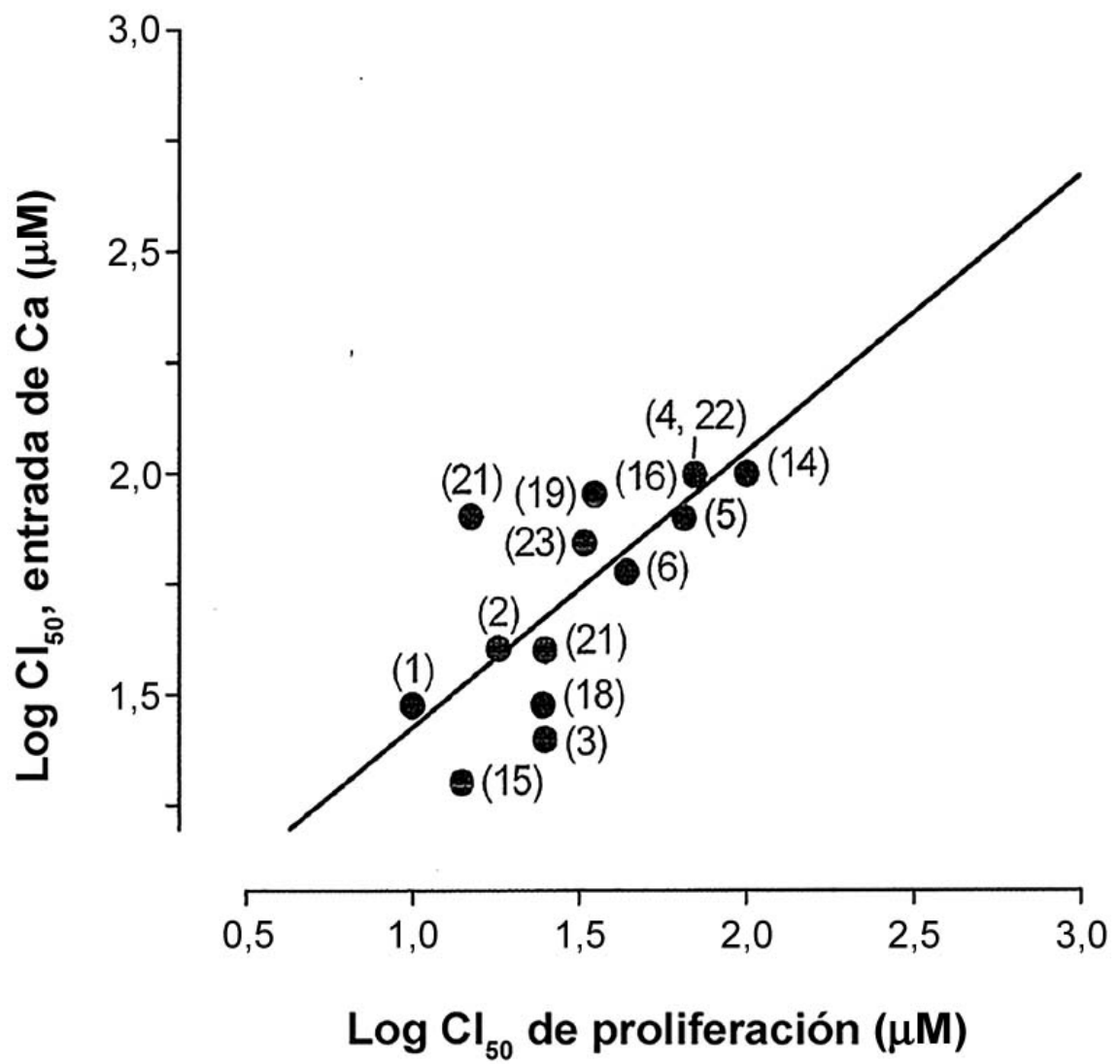
1. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T para su uso para aumentar la eficacia de destrucción de células en proliferación por un agente quimioterápico antineoplásico o radiación en el tratamiento de una enfermedad o estado canceroso o precanceroso en un mamífero, en el que el tratamiento comprende:
  - (a) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de los canales de calcio de tipo T para aumentar la proporción de las células en proliferación en la fase G<sub>1</sub>;
  - (b) detener la administración del inhibidor de los canales de calcio de tipo T durante un periodo de tiempo; y
  - (c) administrar posteriormente una dosificación seleccionada del grupo que consiste en una dosificación de al menos un agente quimioterápico antineoplásico, una dosificación de radiación, o una combinación de al menos un agente quimioterápico antineoplásico y una dosificación de radiación y combinaciones de las mismas, para destruir la proporción de células que progresan más allá de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular tras detener la administración del inhibidor de los canales de calcio de tipo T; y
  - (d) opcionalmente administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de los canales de calcio de tipo T tras administrar la dosificación seleccionada del grupo que consiste en una dosificación de al menos un agente quimioterápico, una dosificación de radiación, y combinaciones de las mismas.
2. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en el que el tratamiento comprende (d) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de los canales de calcio de tipo T tras administrar la dosificación seleccionada del grupo que consiste en una dosificación de al menos un agente quimioterápico, una dosificación de radiación, y combinaciones de las mismas.
3. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, en el que el tratamiento es un tratamiento prolongado en el que las etapas (a)-(c) se repiten una o más veces.
4. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso según las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enfermedad o estado canceroso o precanceroso es un tumor.
5. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el periodo de tiempo entre detener el tratamiento con el inhibidor de los canales de calcio de tipo T y administrar posteriormente al mamífero la dosificación de al menos un agente quimioterápico antineoplásico, la dosificación de radiación o la combinación de al menos un agente quimioterápico antineoplásico y radiación es de aproximadamente 0 horas a aproximadamente 336 horas.
6. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la enfermedad o estado canceroso o precanceroso se selecciona del grupo que consiste en glioblastoma, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de mama y cáncer de colon.
7. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el inhibidor de los canales de calcio de tipo T se selecciona de mibefradil, efonidipino, etosuximida, sunitinib, TTL-1177 y níquel.
8. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según la reivindicación 7 para el uso según la reivindicación 7, en el que el inhibidor de los canales de calcio de tipo T es mibefradil.
9. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el tratamiento comprende administrar una dosificación de al menos un agente quimioterápico en la etapa (b).
10. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el tratamiento comprende tratamiento con un agente quimioterápico antineoplásico seleccionado del grupo que consiste en temozolomida, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, bleomicina, carboplatino, cisplatino, dacarbazina, doxorubicina, epirubicina, etopósido, hidroxiurea, ifosfamida, irinotecán, topotecán, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina, mitomicina C y combinaciones de los mismos.
11. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el tratamiento comprende administrar una

dosificación de radiación en la etapa (b).

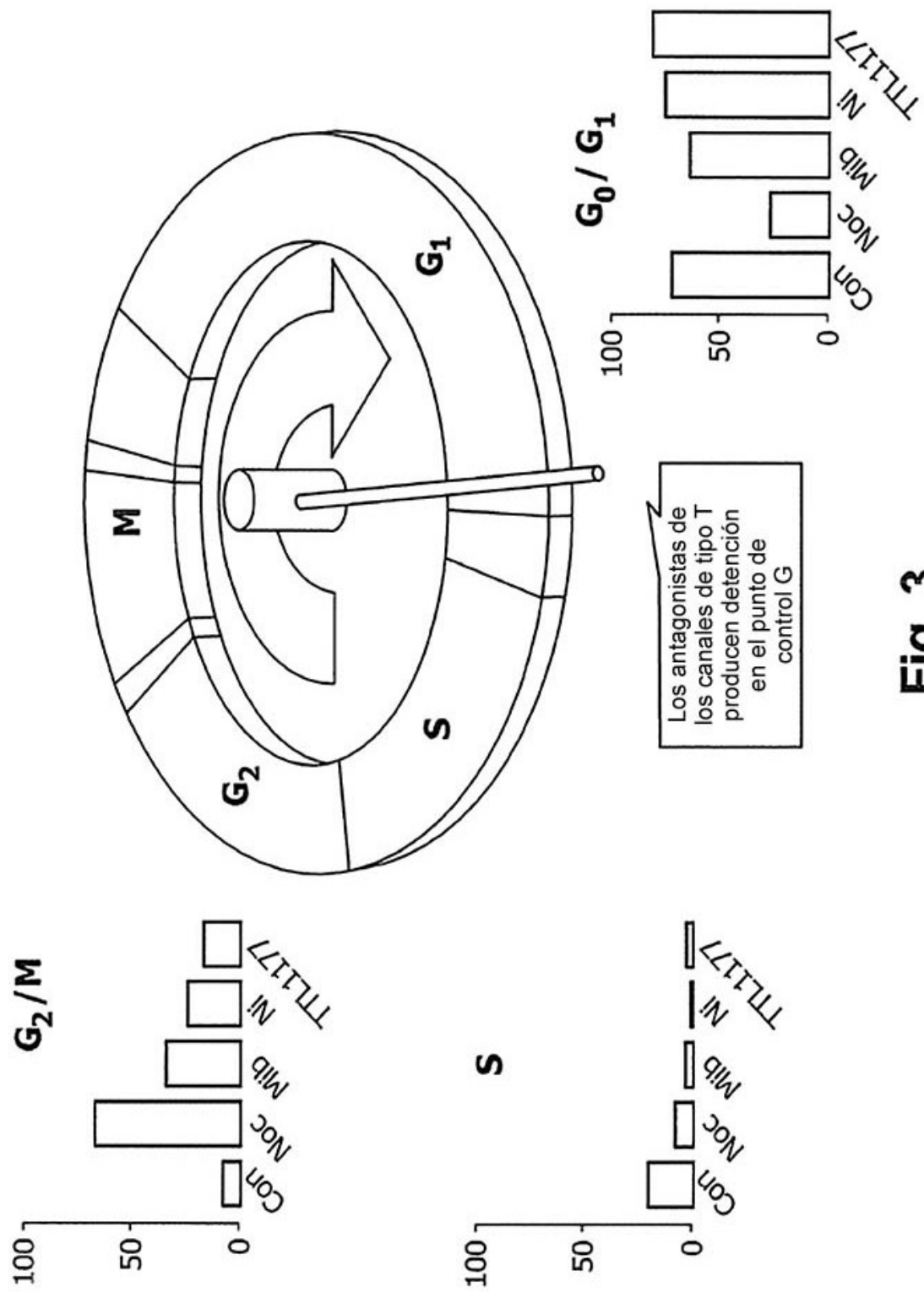
- 5 12. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el al menos un agente quimioterápico es temozolomida.
13. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según la reivindicación 12 para el uso según la reivindicación 12, en el que la enfermedad o estado canceroso o precanceroso es glioblastoma.
- 10 14. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el al menos un agente quimioterápico es melfalán.
- 15 15. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según la reivindicación 12 ó 14 para el uso según la reivindicación 12 o 14, en el que la enfermedad o estado canceroso o precanceroso es melanoma.
- 20 16. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el al menos un agente quimioterápico es carboplatino.
- 25 17. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el al menos un agente quimioterápico es gemcitabina.
- 30 18. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según la reivindicación 17 para el uso según la reivindicación 17, en el que la enfermedad o estado canceroso o precanceroso es cáncer pancreático.
19. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según la reivindicación 17 para el uso según la reivindicación 17, en el que la enfermedad o estado canceroso o precanceroso es cáncer de mama.
20. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el al menos un agente quimioterápico es irinotecán.
- 35 21. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el al menos un agente quimioterápico es 5-fluorouracilo.
- 40 22. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según la reivindicación 20 ó 21 para el uso según la reivindicación 20 o 21, en el que la enfermedad o estado canceroso o precanceroso es cáncer de colon.
23. Inhibidor de los canales de calcio de tipo T según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que el mamífero es un humano.
- 45



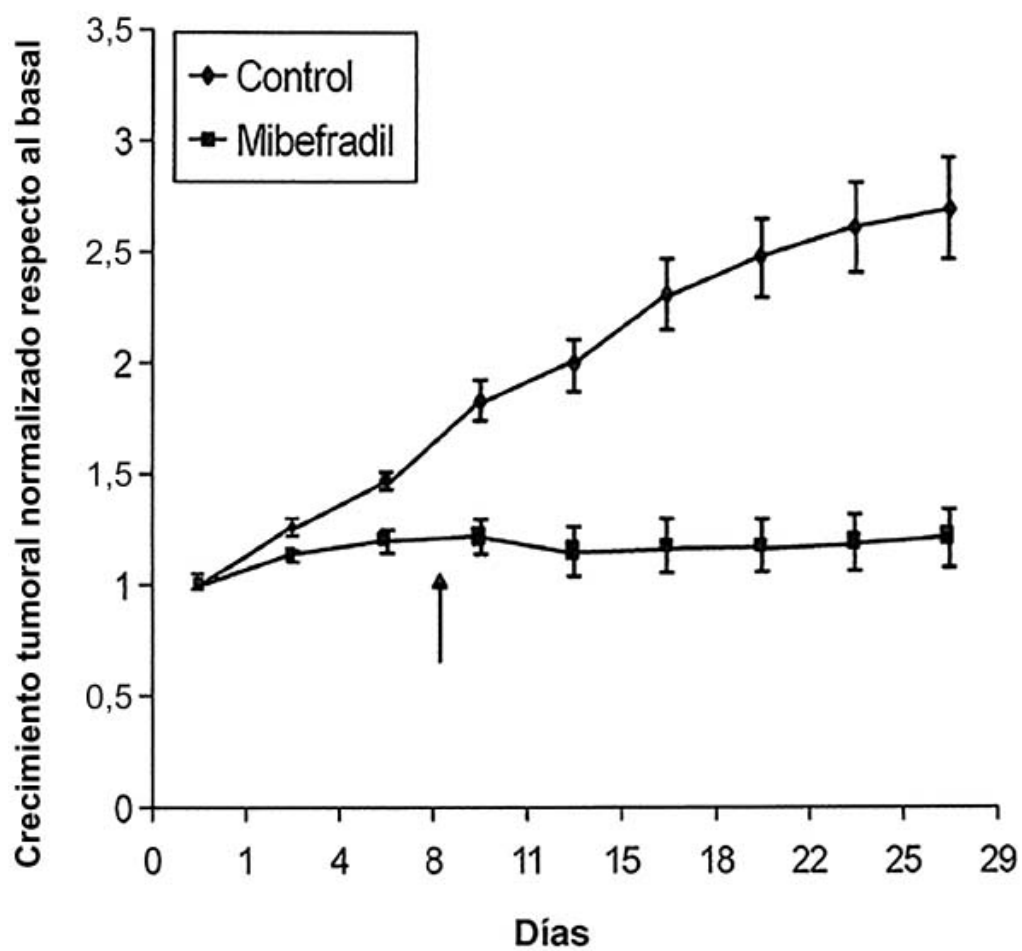
**Fig. 1**

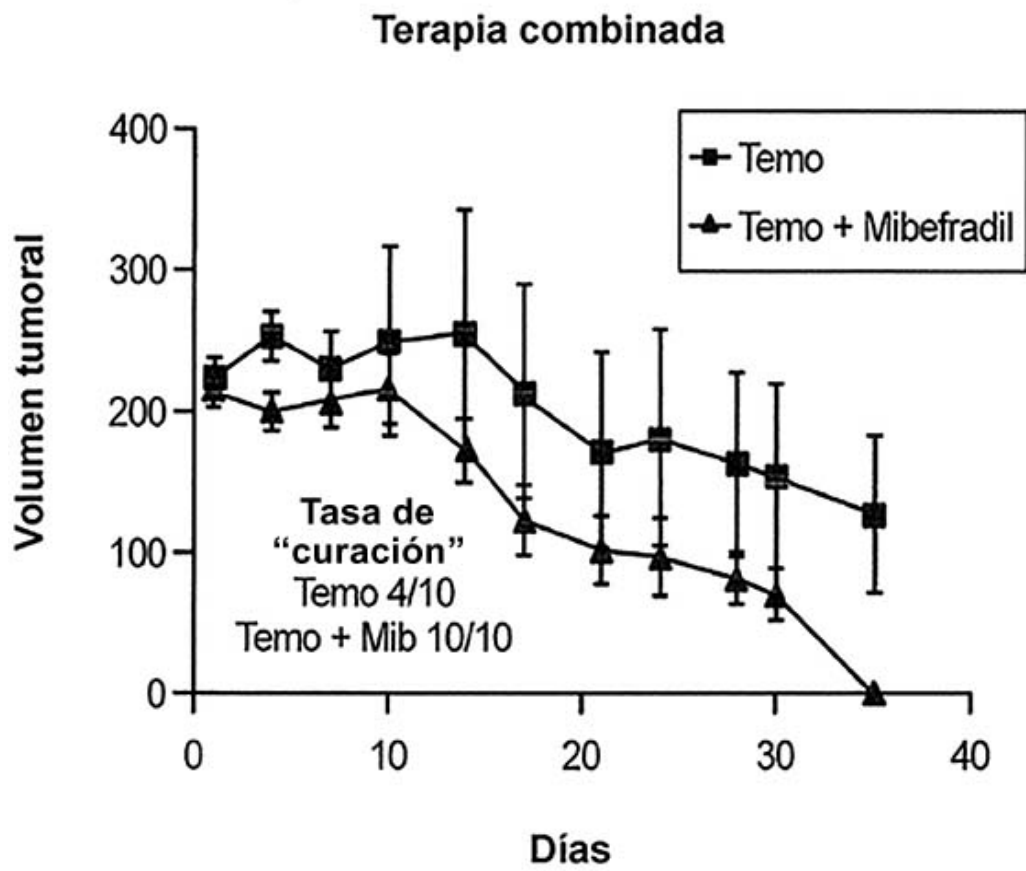


**Fig. 2**



**Fig. 3**

**Fig. 4**



**Fig. 5**