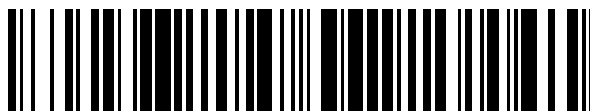


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 938**

51 Int. Cl.:

A61K 31/131 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2007 PCT/US2007/088666**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2008 WO08083107**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007 E 07865990 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2173333**

54 Título: **Combinaciones de agente antifolato y metoxiamina en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

29.12.2006 US 877836 P
03.01.2007 US 883266 P
08.01.2007 US 883959 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2018

73 Titular/es:

TRACON PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
4350 La Jolla Village Drive, Suite 800
San Diego, CA 92122, US

72 Inventor/es:

THEUER, CHARLES, P. y
ADAMS, BONNE, JEAN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 688 938 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

Combinaciones de agente antifolato y metoxiamina en el tratamiento del cáncer

Aplicaciones relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. de serie 60/877.836, presentada el 29 de diciembre de 2006, por Theuer et al., y titulada "ANTIMETABOLITE AGENT COMBINATIONS IN THE TREATMENT OF CANCER," la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos de serie No. 60/883,266, presentada el 3 de enero de 2007, por Theuer et al., y titulada "ANTIMETABOLITE AGENT COMBINATIONS IN THE TREATMENT OF CANCER," y la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos de serie No. 60/883,959, presentada el 8 de enero de 2007, por Theuer et al., y titulada "ANTIMETABOLITE AGENT COMBINATIONS IN THE TREATMENT OF CANCER".

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a compuestos que tienen diversas utilidades que incluyen usos para investigación, diagnóstico y terapia. Más específicamente, se describen y proporcionan en este documento composiciones que comprenden metoxiamina y un agente anticancerígeno antimetabolito, y métodos de tratamiento de ciertos cánceres mediante la administración de estas composiciones.

Antecedentes

El cáncer es un problema mundial. Como tal, encontrar composiciones y métodos novedosos para el tratamiento del cáncer es de vital interés. El tratamiento del cáncer se divide en tres categorías generales: quimioterapia, radioterapia y cirugía. A menudo, las terapias se combinan ya que una combinación de terapias a menudo aumenta la probabilidad de que el cáncer sea erradicado en comparación con las estrategias de tratamiento que utilizan una única terapia. Por lo general, la extirpación quirúrgica de grandes masas tumorales es seguida por quimioterapia y/o radioterapia.

Los agentes quimioterapéuticos pueden funcionar de varias maneras. Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos pueden funcionar al interferir con la progresión del ciclo celular o al generar rupturas de cadenas de ADN. Si la célula cancerosa no es capaz de superar el bloqueo del ciclo celular o la lesión celular causada por el compuesto terapéutico, la célula a menudo morirá a través de mecanismos apoptóticos. El uso de un único agente quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer, con o sin cirugía o radiación, tiene varias desventajas. Comúnmente, las células cancerosas desarrollan resistencia al agente quimioterapéutico. Tal resistencia da como resultado ya sea en el requerimiento de dosis más altas del fármaco y/o la extensión renovada del cáncer. Los agentes quimioterapéuticos pueden ser tóxicos para el paciente. Por lo tanto, existe un límite superior práctico para la cantidad que un paciente puede recibir. Sin embargo, si se puede desarrollar un segundo agente para inhibir la ruta que causa la resistencia, las células cancerosas se pueden volver susceptibles a los efectos del agente quimioterapéutico. El documento CN 1846679 describe formulaciones anticancerosas inyectables que comprenden metotrexato e inhibidores de la enzima de reparación del ADN. El documento WO 03/070234 describe combinaciones de un agente antifolato y un inhibidor de la reparación por escisión de base.

El diseño de un fármaco para superar la resistencia al tratamiento quimioterapéutico del cáncer debe abordarse con los objetivos de 1) encontrar una combinación que invierta la resistencia y no simplemente mejore la actividad del agente quimioterapéutico con respecto a la actividad en el tumor, y 2) encontrar un segundo fármaco que no potencie los efectos tóxicos del primer agente quimioterapéutico. Estas condiciones requieren una gran cantidad de pruebas empíricas de agentes que se sabe que tienen propiedades anticancerígenas con agentes que pueden tener ya sea propiedades anticancerígenas o que pueden aumentar el primer agente de otras maneras. Desafortunadamente, dichos enfoques hasta ahora han demostrado ser en gran medida infructuosos para combinaciones de muchos agentes anticancerígenos.

Por lo tanto, existen terapias insuficientes que invierten la resistencia a la quimioterapia para el tratamiento del cáncer.

Resumen

La presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. Comprende una primera formulación que comprende pemetrexed y una segunda formulación que comprende metoxiamina, para su uso según la reivindicación 1. Las características o realizaciones identificadas en este resumen se incluyen solo con fines de ilustración y no de restricción.

Estos y otros aspectos y realizaciones de las invenciones descritas y reivindicadas en este documento serán evidentes a partir de y a lo largo de la solicitud y las reivindicaciones, todas las cuales se considerarán como parte de la descripción escrita de las mismas.

En este documento se describen composiciones para uso en el tratamiento de ciertos cánceres. En parte, esta aplicación se basa en el reconocimiento hasta ahora desconocido de que ciertas moléculas que se dirigen a lesiones abasicas o sitios AP (apurínicos/apirimidínicos) en el ADN mejoran, aumentan o potencian la eficacia de agentes

anticancerígenos. Un inhibidor de la ruta de escisión de la base, tal como la metoxiamina, se combina con un agente anticancerígeno antimetabolito. Un agente anticancerígeno antimetabolito es un agente quimioterapéutico con una estructura similar a una sustancia (un metabolito) necesaria para las reacciones bioquímicas normales, pero lo suficientemente diferente como para interferir con las funciones normales de las células, incluida la división celular. Los antifolatos son una clase preferida de agentes antimetabolitos. Un agente anticancerígeno antifolato es un agente quimioterapéutico con una estructura similar al ácido fólico, pero lo suficientemente diferente como para bloquear la actividad del ácido fólico y alterar los mecanismos dependientes de folato necesarios para la replicación celular. Estos agentes anticancerígenos antifolato incluyen pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, ralitrexed, PT523 y trimetrexato. Se contempla el uso de cualquier agente anticancerígeno antifolato en combinación con un inhibidor de la BER (reparación de la escisión de la base). En un aspecto, el método comprende proporcionar i) un sujeto diagnosticado con cáncer, ii) una primera formulación que comprende un agente anticancerígeno antifolato y iii) una segunda formulación que comprende metoxiamina; administrar dicha primera formulación a dicho sujeto; y administrar dicha segunda formulación a dicho sujeto en el que la metoxiamina se administra en una cantidad suficiente para aumentar o aumentar el efecto del agente anticancerígeno antifolato. La segunda formulación se puede administrar por vía oral. En otro aspecto, el método comprende: proporcionar i) un paciente diagnosticado con cáncer, en el que dicho cáncer es al menos parcialmente resistente al tratamiento con pemetrexed solo, ii) una primera formulación que comprende pemetrexed; y iii) una segunda formulación que comprende metoxiamina; administrar dicha primera formulación a dicho paciente; y administrar dicha segunda formulación a dicho paciente en el que la metoxiamina se administra en una cantidad suficiente para potenciar la actividad de dicho pemetrexed y superar dicha resistencia. En estos métodos, la metoxiamina y el agente anticancerígeno antifolato se pueden administrar como una formulación. También, la metoxiamina y el agente anticancerígeno antifolato se pueden administrar secuencialmente, en cualquier orden. También, la metoxiamina se puede administrar por vía oral y el agente anticancerígeno antifolato se puede administrar ya sea por vía oral o intravenosa. También, la cantidad de dicha metoxiamina puede ser una cantidad suficiente para sensibilizar las células cancerosas sin causar una sensibilización indebida de las células normales. También, la metoxiamina y el agente anticancerígeno antifolato se pueden administrar para lograr un efecto sinérgico. También, el agente anticancerígeno antifolato se puede administrar por vía oral o intravenosa y dicha metoxiamina se puede administrar por vía oral, no más de dos veces al día, en una cantidad suficiente para potenciar la actividad de dicho agente anticancerígeno antifolato. También, el paciente se puede seleccionar como que tiene un cáncer al menos parcialmente resistente al tratamiento con un agente anticancerígeno antifolato solo, y en el que dicha segunda formulación que comprende metoxiamina se administra en una cantidad eficaz para potenciar la actividad de dicho agente anticancerígeno antifolato y superar dicha resistencia. También, la proporción de dicha metoxiamina a dicho agente anticancerígeno antifolato puede estar entre 1:5 y 1:500, más preferiblemente entre 1:15 y 1:40, y aún más preferiblemente entre aproximadamente 1:20 y aproximadamente 1:30. También, el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en carcinomas, melanomas, sarcomas, linfomas, leucemias, astrocitomas, gliomas, melanomas malignos, leucemia linfocítica crónica, cánceres de pulmón, cáncer colorrectal, cánceres de ovario, cáncer de páncreas, cánceres renales, cáncer de endometrio, cánceres gástricos, cánceres de hígado, cánceres de cabeza y cuello y cáncer de mama. En realizaciones preferidas, el agente anticancerígeno antifolato es pemetrexed.

Se describe una mejora en un método de tratamiento del cáncer en un paciente diagnosticado con cáncer que comprende administrar un agente anticancerígeno antifolato al paciente, comprendiendo la mejora la administración de metoxiamina al paciente en una cantidad suficiente para potenciar la toxicidad de dicho agente anticancerígeno antifolato. También se describen formulaciones anticancerígenas que comprenden una forma de dosificación que comprende pemetrexed y una forma de dosificación que comprende una cantidad sinérgica de metoxiamina, y métodos de uso de dicha formulación según la presente divulgación. En otro caso, se describe un uso mejorado de metoxiamina, en el uso de un agente anticancerígeno antifolato para tratar el cáncer en un paciente, comprendiendo la mejora el uso de metoxiamina en una cantidad suficiente para potenciar la toxicidad de dicho agente anticancerígeno antifolato en dicho paciente.

En un aspecto, la presente invención se basa en el reconocimiento previamente desconocido de que ciertas moléculas, tales como metoxiamina, que se dirigen a los sitios AP son completamente biodisponibles por vía oral y mantienen concentraciones eficaces mínimas cuando se administran una o dos veces al día mediante administración oral. Los agentes anticancerígenos se administran por lo general como un bolo intravenoso, ya que raramente se absorben bien en el tracto gastrointestinal. La dosificación intravenosa tiene desventajas. Primero, la inyección intravenosa de quimioterapia requiere tratamiento en un consultorio médico u hospital. En segundo lugar, la terapia intravenosa por lo general se administra como un bolo, que da como resultado una exposición al fármaco muy alta pero transitoria. Algunos agentes anticancerígenos pueden ser los más activos después de la exposición sostenida que se puede lograr con dosis orales repetidas. Esto es particularmente cierto para los agentes que inhiben los mecanismos de resistencia a los fármacos de quimioterapia, donde la inhibición prolongada de las vías de resistencia puede ser necesaria para un efecto beneficioso deseado. La exposición prolongada al fármaco se puede lograr con la administración intravenosa continua. Sin embargo, la administración de agentes anticancerígenos como infusiones continuas requiere un aparato de infusión de fármacos complicado y cateterización intravenosa. La administración oral evita la necesidad de infusión intravenosa continua y es una ruta de administración preferida por los pacientes. Sin embargo, hasta donde sabemos, los inhibidores de la BER que revierten la resistencia a la quimioterapia y tienen una biodisponibilidad oral casi completa como se proporciona en este documento no se han desarrollado hasta la fecha.

El pemetrexed es un antifolato multidireccional que actúa de forma que es mecánicamente diferente de 5-FU y otros antimetabolitos de primera generación. Pemetrexed es único en que es un análogo de la pirrolopirimidina antifolato que se metaboliza intracelularmente a formas de poliglutamato superiores mediante la folilpoliglutamato sintetasa (FPGS). La forma de pentaglutamato es la especie intracelular predominante y los poliglutamatos de pemetrexed son aproximadamente 60 veces más potentes que el compuesto de monoglutamato original; los poliglutamatos pemetrexed también presentan retenciones celulares prolongadas. Por consiguiente, los efectos farmacológicos de pemetrexed persisten durante muchos días después de la administración de bolo intravenoso.

El pemetrexed inhibe la timidilato sintasa (TS), la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (GARFT), todas las enzimas dependientes de folato implicadas en la biosíntesis de novo de los nucleótidos de timidina y purina. Por el contrario, 5-FU y otros antimetabolitos de primera generación inhiben principalmente la TS únicamente. El mecanismo preciso por el cual pemetrexed causa la muerte celular aún no se resuelve, pero implica más que la inhibición de TS. Por consiguiente, mientras que en un panel de línea celular de cáncer de colon humano no seleccionado heterogéneo, el mejor predictor de sensibilidad a 5FU era la actividad de TS, los determinantes de sensibilidad múltiple eran importantes para pemetrexed, incluyendo la actividad de FPGS y la cinética de enzima TS (van Triest B, Pinedo HM, van Hensbergen Y. Thymidylate synthase level as the main predictor parameter for sensitivity to 5-FU, but not for Folate-based Thymidylate Synthase Inhibitors, in 13 Nonselected Colon Cancer Cell Lines. Clin. Cancer. Res. 1999; 5:643-54). Un estudio adicional confirmó que la sensibilidad de las líneas celulares gastrointestinales al pemetrexed no podía predecirse mediante la expresión de TS (Kim JH, Lee KW, Jung Y et al. Cytotoxic effects of pemetrexed in gastric cancer cells. Cancer Sci. 2005; 96:365-71).

La actividad farmacológica única de pemetrexed se hace evidente mediante el estudio in vitro de la actividad en múltiples líneas de células cancerosas en comparación con 5-FU. En una serie de 13 líneas celulares de cáncer de colon, por ejemplo, pemetrexed fue de 18 a 627 veces más potente que 5-FU (van Triest et al, 1999). Esta farmacología única y el hecho de que se cree que el pemetrexed tiene múltiples mecanismos de acción que no se comprenden completamente hace que sea difícil saber qué tan eficaz puede ser cuando se combina con otros agentes anticancerígenos particulares para el tratamiento de cánceres específicos.

Un aspecto de la presente divulgación es el hallazgo de una mejora inesperada en el tratamiento de cánceres mediante la administración combinada de metoxiamina con un compuesto antifolato. De este modo, un caso descrito en este documento se dirige a métodos que comprenden proporcionar i) un paciente diagnosticado con cáncer, ii) una primera formulación que comprende un agente anticancerígeno antifolato y iii) una segunda formulación que comprende metoxiamina; administración de la primera formulación al paciente; y administración de la segunda formulación a dicho paciente en la que la metoxiamina se puede administrar en una cantidad suficiente para potenciar o aumentar el efecto (esto es, actividad potenciada) del agente anticancerígeno antifolato. Se puede usar cualquier agente anticancerígeno antifolato, con la condición de que en ciertos casos el método, 5-FU se excluya específicamente. El agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, ralitrexed, PT523, trimetrexato, aminopterina, ácido 5,10-Dideazatetrahidrofilico (DDATHF), piritrexim, raltitrexed, GW1843 [ácido (S)-2-[5-[(1,2-dihidro-3-metil-1-oxobenzof[quinazolin-9-il)metil]amino-1-oxo-2-isoindolinil]-glutárico], sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En un ejemplo más típico, el agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, ralitrexed, PT523, trimetrexato, aminopterina, sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En un ejemplo más típico, el agente anticancerígeno puede ser pemetrexed y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Por ejemplo, el pemetrexed puede ser la sal disódica. En un caso de ejemplo, el pemetrexed puede ser el heptahidrato de sal disódica.

En un ejemplo típico, el agente anticancerígeno antifolato es pemetrexed. La metoxiamina y agente anticancerígeno antifolato se pueden administrar secuencialmente (en cualquier orden) o administrarse conjuntamente como una formulación. El pemetrexed, por ejemplo, se administrar por vía intravenosa en una dosis de entre 200 y 1,000 mg/m² de superficie corporal por día, o en una dosis de entre 500 y 600 mg/m² de superficie corporal por día. En otro ejemplo, la proporción de metoxiamina con el agente anticancerígeno antifolato puede estar entre 1:5 y 1:500.

En otro aspecto, la metoxiamina se puede administrar por vía oral en una cantidad suficiente para sensibilizar el cáncer sin provocar una sensibilización indebida del tejido normal. En ejemplos preferidos, la metoxiamina se administra por vía oral de manera que tiene una biodisponibilidad enormemente potenciada con respecto a otros agentes anticancerígenos administrados por vía oral. En otros ejemplos preferidos, la metoxiamina se administra por vía oral de manera que mantiene una concentración eficaz mínima cuando se dosifica una vez al día o dos veces al día. Una forma de medir la biodisponibilidad oral es comparar los niveles alcanzados con los de la metoxiamina administrada por vía intravenosa. De este modo, en otro aspecto, la metoxiamina se administra por vía oral para obtener una biodisponibilidad de al menos 50% con respecto a la administración intravenosa, al menos 60% con respecto a la administración intravenosa, al menos 70% con respecto a la administración intravenosa, al menos 75% con respecto a la administración intravenosa, al menos 80% con respecto a la administración intravenosa, al menos 85% con respecto a la administración intravenosa, al menos 90% con respecto a la administración intravenosa, al menos 95% con respecto a la administración intravenosa, o aproximadamente equivalente a la administración intravenosa. Es significativo reconocer que, además del alto grado inesperado de biodisponibilidad alcanzado por administración oral en comparación con la administración intravenosa de metoxiamina, se obtiene un perfil de pK más deseable en

comparación con la administración intravenosa de metoxiamina. En otro aspecto, la metoxiamina administrada por vía oral mantiene concentraciones eficaces mínimas después de una o dos administraciones diarias debido a una vida media de >4 horas en plasma. Esta ventaja permite un régimen de dosificación oral deseable para metoxiamina, que incluye administración una o dos veces al día. Aunque se prefiere la administración intravenosa de pemetrexed combinado con la administración oral de metoxiamina, se contemplan otras rutas de administración para cada uno de los agentes anticancerígenos.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para el tratamiento de ciertos cánceres que son resistentes al tratamiento con un agente anticancerígeno. De acuerdo con lo anterior, también se proporcionan métodos que comprenden:

proporcionar i) un paciente diagnosticado con cáncer, en el que dicho cáncer puede ser resistente al tratamiento con pemetrexed solo, ii) una primera formulación que comprende un agente anticancerígeno antifolato; y iii) una segunda formulación que comprende metoxiamina;

administración de la primera formulación al paciente; y

administración de la segunda formulación al paciente en la que la metoxiamina se puede administrar en una cantidad suficiente para potenciar o aumentar el efecto (esto es, potenciar la toxicidad) del agente anticancerígeno antifolato. El agente anticancerígeno antifolato puede ser pemetrexed. La metoxiamina y el agente anticancerígeno antifolato se puede administrar secuencialmente (en cualquier orden) o administrar conjuntamente como una formulación. El pemetrexed se puede administrar por vía intravenosa en una dosis de entre 200 y 1,000 mg/m² de superficie corporal por día, o en una dosis de entre 500 y 600 mg/m² de superficie corporal por día. La proporción de pemetrexed a metoxiamina puede estar entre 1:5 y 1:500. La cantidad de metoxiamina se puede administrar por vía oral en una cantidad suficiente para sensibilizar el cáncer sin causar una sensibilización indebida del tejido normal. La cantidad de metoxiamina se puede administrar por vía oral, ya sea una vez al día o dos veces al día, en una cantidad suficiente para sensibilizar el cáncer sin causar una sensibilización indebida del tejido normal. Si bien la administración oral de metoxiamina es una ruta de administración inesperadamente preferida, son posibles otros tipos de administración.

Otro caso se refiere a un método de tratamiento del cáncer proporcionando una primera y segunda formulación en el que dicha primera formulación comprende un antifolato y la segunda formulación comprende una metoxiamina administrada por vía oral. La primera formulación que comprende un antifolato se puede administrar por rutas de administración convencionales, que incluyen por vía intravenosa. Un antifolato preferido no limitante es pemetrexed. De acuerdo con lo anterior, en un caso, el antifolato es pemetrexed y la segunda formulación que comprende metoxiamina se administra por vía oral en una cantidad que es sinérgicamente eficaz en comparación con un tratamiento con pemetrexed solo.

El método se puede usar para tratar cánceres que son resistentes al pemetrexed solo. El pemetrexed se administra en una cantidad que revierte la resistencia (y por lo tanto es sinérgico) al antifolato solo. De este modo, en un caso, la metoxiamina se administra por vía oral en una cantidad eficaz para potenciar o aumentar la toxicidad del pemetrexed y superar la resistencia del cáncer al tratamiento con pemetrexed. Por ejemplo, la efectividad del pemetrexed para tratar el cáncer se puede reducir debido al desarrollo de resistencia durante el ciclo de tratamiento. La administración de metoxiamina puede eludir la resistencia desarrollada proporcionando un efecto mayor que aditivo al tratamiento del cáncer con ya sea metoxiamina o pemetrexed solo.

También se proporcionan métodos que comprenden:

proporcionar i) un paciente diagnosticado con cáncer, en el que el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en carcinomas, melanomas, sarcomas, linfomas, leucemias, astrocitomas, gliomas, melanomas malignos, leucemia linfocítica crónica, cánceres de pulmón, cánceres colorrectales, cánceres de ovario, cánceres de páncreas, cánceres renales, cánceres endometriales, cánceres gástricos, cánceres de hígado, cánceres de cabeza y cuello y cáncer de mama, y en los que el cáncer puede ser resistente al tratamiento con pemetrexed solo, ii) una primera formulación que comprende un agente anticancerígeno antifolato y iii) una segunda formulación que comprende metoxiamina;

administración de la primera formulación a dicho paciente; y

administración de la segunda formulación a dicho paciente en la que la metoxiamina se puede administrar en una cantidad suficiente para potenciar o aumentar el efecto del agente anticancerígeno antifolato. La metoxiamina y el agente anticancerígeno antifolato se pueden administrar secuencialmente o administrarse conjuntamente como una formulación. Por ejemplo, la metoxiamina se puede administrar primero y luego el agente anticancerígeno antifolato se puede administrar por última vez o el agente anticancerígeno antifolato se puede administrar primero y la metoxiamina se puede administrar en último lugar.

El pemetrexed se puede administrar por vía intravenosa en una dosis de entre 200 y 1,000 mg/m² de superficie corporal por día, o en una dosis de entre 500 y 600 mg/m² de superficie corporal por día. La proporción de pemetrexed a metoxiamina puede estar entre 1:5 y 1:500. En otro caso, la cantidad de metoxiamina se puede administrar por vía oral en una cantidad suficiente para hacer que las células cancerosas sean susceptibles de tratamiento con el agente anticancerígeno (esto es, sensibilizar) sin causar daño indebido a las células normales. En otro caso, la cantidad de

metoxiamina se puede administrar por vía oral ya sea una o dos veces al día en una cantidad suficiente para sensibilizar el cáncer sin causar una sensibilización indebida del tejido normal.

Otro caso puede ser una formulación que comprende metoxiamina y un agente anticancerígeno antifolato, en el que la metoxiamina se puede administrar en una cantidad suficiente para potenciar la toxicidad del agente anticancerígeno antifolato. Preferiblemente, el agente anticancerígeno antifolato es pemetrexed.

La proporción de metoxiamina con el agente anticancerígeno antifolato puede estar entre 1:5 y 1:500 en cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

Se puede administrar un segundo agente anticancerígeno antes o después del tratamiento con metoxiamina y el agente anticancerígeno antifolato en cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

En otro caso, se describe un método de tratamiento del cáncer en un paciente diagnosticado con cáncer que comprende administrar un agente anticancerígeno antimetabolito al paciente, que tiene la siguiente mejora: administrar metoxiamina al paciente en una cantidad suficiente para potenciar la toxicidad de dicho agente anticancerígeno antimetabolito. El agente anticancerígeno antimetabolito puede ser un agente anticancerígeno antifolato. El agente anticancerígeno antifolato puede ser pemetrexed, y la proporción entre dicha metoxiamina y el agente anticancerígeno antifolato puede estar entre 1:5 y 1:500. El cáncer puede ser resistente al tratamiento con pemetrexed solo.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-B muestran el efecto de pemetrexed y MX sobre las rupturas de cadena de ADN usando el ensayo de Cometa alcalino (Figura 1A) y neutro (Figura 1B).

Las figuras 1C-D muestran una comparación de la longitud de la cola del Comet entre células tratadas con pemetrexed solo o MX solo, y pemetrexed más MX en células sometidas a los ensayos de Cometa alcalino (Figura 1C) y neutro (Figura 1D).

La figura 2 es un gráfico que muestra la concentración media de MX en plasma de ratas Sprague-Dawley macho en diferentes puntos de tiempo después de una dosificación en bolo única de MX mediante administración intravenosa y oral a 20 mg/kg de peso corporal.

La figura 3 es un gráfico que muestra la concentración media de MX en plasma de ratas Sprague-Dawley hembras en diferentes puntos de tiempo después de una única dosificación en bolo de MX mediante administración intravenosa y oral a 20 mg/kg de peso corporal.

La figura 4A es un gráfico que muestra la cantidad relativa de sitios AP detectados en células H460 24 horas después del tratamiento con pemetrexed y MX.

La figura 4B es un gráfico que muestra la cantidad relativa de sitios AP detectados en células H460 a las 24 horas, 48 horas y 72 horas.

La figura 5A muestra un diagrama esquemático de la preparación de sustratos de ADN con sitios AP normales o sitios MX-AP.

La figura 5B muestra que los sitios AP unidos a MX son resistentes a la escisión por AP-endonucleasa (APE).

La figura 6 muestra el efecto de Pemetrexed y MX en combinación en rupturas de doble cadena de ADN y apoptosis.

La figura 7 muestra el efecto de Pemetrexed y MX en combinación sobre los niveles de proteína BER en células H460.

La figura 8 muestra el efecto de Pemetrexed y MX sobre el volumen medio de tumores NCI-H460, tumores A549, tumores HCT116 y tumores MDA-MB-468 cultivados en ratones desnudos.

Descripción detallada

La divulgación se refiere generalmente a nuevas composiciones que comprenden metoxiamina y un agente anticancerígeno antifolato para uso en el tratamiento de ciertos cánceres.

Definiciones

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes significados cuando se usan en este documento y en las reivindicaciones adjuntas. Aquellos términos que no están definidos a continuación o en otra parte en la especificación tendrán su significado reconocido en la técnica.

El término "agente" y "fármaco" se usan en este documento, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para referirse a compuestos químicos, mezclas de compuestos químicos, macromoléculas biológicas o extractos hechos de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos, o células o tejidos de animales

particularmente mamíferos que se sospecha tienen propiedades terapéuticas. El agente o fármaco se puede purificar, purificarse sustancialmente o purificarse parcialmente.

5 El término "antimetabolito" se usa en este documento, para los propósitos de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para significar un agente quimioterapéutico con una estructura similar a una sustancia (un metabolito, por ejemplo, nucleósido) requerida para reacciones bioquímicas normales, pero lo suficientemente diferente como para interferir con las funciones normales de las células, incluida la división celular.

10 El término "antifolato" se usa en este documento, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para significar un agente quimioterapéutico con una estructura similar al ácido fólico, pero suficientemente diferente para bloquear la actividad del ácido fólico e interrumpir los mecanismos dependientes de folato necesarios para replicación celular. Como se usa en este documento, los antifolatos son una clase de antimetabolitos.

El término "antineoplásico" se usa en este documento, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para referirse a un quimioterapéutico destinado a inhibir o prevenir la maduración y proliferación de neoplasmas (tumores) que pueden volverse malignos, dirigiéndose al ADN.

15 El término "tinción" se usa en este documento, a los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para referirse a cualquier cantidad de procedimientos conocidos para aquellos en el campo que se usan para visualizar, distinguir o identificar mejor un(os) componente(s) específico(s) y/o función(es) de una célula o células.

20 El término "en combinación operable", "en orden operable" y "unido operativamente" se usa en este documento, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para significar el enlace de secuencias de ácido nucleico de tal manera que se produce una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la transcripción de un gen dado y/o la síntesis de una molécula de proteína deseada. El término también se refiere al enlace de las secuencias de aminoácidos de tal manera que se produce una proteína funcional.

El término "antígeno" se usa en este documento, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para referirse a una proteína, glucoproteína, lipoproteína, lípido u otra sustancia que sea reactiva con un anticuerpo específico para una porción de la molécula.

25 El término "morfología" se usa en este documento, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para referirse a la apariencia visual de una célula u organismo cuando se observa con el ojo, un microscopio óptico, un microscopio confocal o un microscopio electrónico, según corresponda.

30 El término "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan en este documento, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para referirse a un ser humano u otro animal, como animales de granja o animales de laboratorio (por ejemplo, conejillo de Indias o ratones) capaces de tener enfermedades determinadas por el ciclo celular (influenciadas), ya sean naturales o inducidas, que incluyen, pero no se limitan a, cáncer.

35 El término "resistencia a la inversión" significa que el uso de un segundo agente en combinación con un agente quimioterapéutico primario puede producir una disminución significativa en el volumen tumoral a un nivel de significación estadística (por ejemplo, $p < 0.05$) en comparación con el tumor volumen de tumor no tratado en la circunstancia en que el quimioterapéutico primario solo no puede producir una disminución estadísticamente significativa en el volumen tumoral en comparación con el volumen tumoral del tumor no tratado. Esto generalmente se aplica a las mediciones de volumen tumoral realizadas en un momento en que el tumor no tratado crece de forma rítmica.

40 El término "potenciado" como se usa en este documento significa potenciar o aumentar la actividad beneficiosa o la eficacia del agente anticancerígeno sobre el que se esperaría del agente anticancerígeno solo o del agente potenciador solo.

El término "sensibilizar" como se usa en este documento significa alterar células cancerosas o células tumorales de una manera que permite un tratamiento más eficaz de la enfermedad neoplásica asociada con un agente anticancerígeno o radioterapia. En algunos casos, las células normales no se ven afectadas hasta el punto de hacer que las células normales se dañen indebidamente con la quimioterapia o la radioterapia.

45 El término "efecto sinérgico" como se usa en este documento significa que el efecto combinado de dos o más agentes anticancerígenos o fármacos de quimioterapia puede ser mayor que la suma de los efectos separados de los agentes anticancerígenos o los fármacos de quimioterapia solos. Por ejemplo, el efecto combinado de un inhibidor de BER, como metoxiamina, y un agente anticancerígeno, como pemetrexed, puede ser mayor que la suma de los efectos separados de metoxiamina y pemetrexed solos.

50 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad del compuesto en cuestión que provocará una respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que se busca, por ejemplo, mediante un investigador, veterinario, médico u otro clínico.

El término célula o línea celular de "tipo salvaje" (wt) se usa en este documento, para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para referirse a una línea celular que retiene las características normalmente asociadas con ese

tipo de célula o línea celular para el procedimiento fisiológico o característica morfológica que se está examinando. Es permisible que la línea celular o célula tenga características de tipo no salvaje para el procedimiento fisiológico o características morfológicas que no se están examinando siempre que no afecten apreciablemente el procedimiento o la característica que se están examinando.

- 5 El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto que no causa irritación significativa a un organismo al que se administra y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto. En algunos casos, la sal es una sal de adición de ácido del compuesto. Las sales farmacéuticas se pueden obtener haciendo reaccionar un compuesto con ácidos inorgánicos tales como ácido hidroácido (por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido bromhídrico), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Las sales farmacéuticas también se pueden obtener haciendo reaccionar un compuesto con un ácido orgánico tal como ácidos carboxílicos o sulfónicos alifáticos o aromáticos, por ejemplo, ácido acético, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, nicotínico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluensulfónico, ácido salicílico o ácido naftalensulfónico. También se pueden obtener sales farmacéuticas haciendo reaccionar un compuesto con una base para formar una sal tal como una sal de amonio, una sal de metal alcalino, tal como una sal de sodio o potasio, una sal de metal alcalinotérreo, tal como una sal de calcio o de magnesio, una sal de bases orgánicas tales como diciclohexilamina, N-metil-D-glucamina, tris(hidroximetil) metilamina, alquilamina C₁-C₇, ciclohexilamina, trietanolamina, etilendiamina y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y similares .

- 20 El daño en el ADN ocurre cuando se introduce una ruptura de una sola cadena, se elimina una base dejando su socio matriz no apareado, se modifica covalentemente una base, se convierte una base en otra que no se empareja adecuadamente con la base del socio o se introduce un enlace covalente entre bases en cadenas opuestas. Los sistemas de reparación por escisión eliminan la base mal emparejada o dañada de la cadena de ADN y luego sintetizan nuevo ADN para reemplazarla. La reparación por escisión de bases (BER) se inicia durante la replicación del ADN y permite la corrección de bases dañadas/bases mal emparejadas antes de completar la replicación.

- 25 La reparación por escisión de bases (BER) se inicia mediante un ADN glicosilasa que elimina enlaces N-glucosídicos (azúcar base), liberando la base dañada y generando un sitio abásico (por ejemplo, un sitio apurínico o apirimidínico (AP)). Un sitio apurínico o apirimidínico (AP) resulta de la pérdida de un residuo de purina o pirimidina, respectivamente, a partir del ADN (ácido desoxirribonucleico). Los residuos de uracilo se pueden formar a partir de la desaminación espontánea de citosina y pueden conducir a una transición C→T si no se repara. También hay una glicosilasa que reconoce y escinde la hipoxantina, el producto de desaminación de la adenina. Otras glicosilasas eliminan las bases alquiladas (tal como 3-metiladenina, 3-metilguanina y 7-metilguanina), purinas abiertas por anillo, bases dañadas por oxidación y, en algunos organismos, fotodimímetros UV. La uracil ADN glicosilasa (UDG) es un ejemplo de un ADN glicosilasa. Los niveles de proteína BER de UDG se ven afectados por el tratamiento de una combinación de pemetrexed y MX (Fig. 7).

- 35 El sitio AP se procesa adicionalmente mediante una 5'-3' endonucleasa (endonucleasa AP (APE)) que corta el enlace fosfodiéster en ambos lados de la base de purina o pirimidina dañada. Las endonucleasas AP introducen rupturas de cadena mediante la escisión de los enlaces fosfodiéster en los sitios AP.

- 40 PARP ayuda en el procesamiento de rupturas de cadenas de ADN inducidas durante la BER. PARP es una proteína de vigilancia de nick de ADN que se une débilmente a intermedios de BER cuando la BER de un solo nucleótido continúa normalmente hasta su finalización. Por el contrario, cuando la BER de un solo nucleótido se detiene por un bloqueo en la etapa de escisión, PARP se une fuertemente al intermediario BER, junto con la endonucleasa AP (APE), ADN pol β y FEN-1.

En células de mamífero, el fosfato de azúcar 5'-desoxirribosa se elimina mediante la actividad de AP liasa intrínseca (dRP) de la ADN polimerasa β (pol β). La enzima ADN polimerasa también llena los vacíos con nuevos nucleótidos.

- 45 Finalmente, el ADN ligasa une covalentemente el extremo 3' del nuevo material al material viejo. De este modo, la secuencia de tipo salvaje se restaura.

Las topoisomerasas I y II también están implicadas en la reparación del ADN, ya que reconocen sitios AP espontáneos y forman complejos escindibles estables. Los inhibidores de la topoisomerasa II promueven la escisión del ADN y otras aberraciones cromosómicas, incluidos los intercambios de cromátidas hermanas.

En este documento se describen métodos que comprenden:

- 50 proporcionar i) un paciente diagnosticado con cáncer, ii) una primera formulación que comprende un agente anticancerígeno antifolato y iii) una segunda formulación que comprende metoxiamina;

administración de la primera formulación al paciente; y administración de la segunda formulación a dicho paciente en el que la metoxiamina se puede administrar en una cantidad suficiente para potenciar o aumentar el efecto del agente anticancerígeno antifolato. Se puede usar cualquier agente anticancerígeno antifolato, con la condición de que en ciertas realizaciones el método, 5-FU se excluya específicamente.

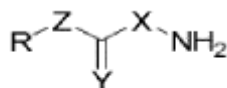
En un caso típico, el agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, raltitrexed, PT523, trimetrexato, aminopterina, ácido 5,10-Dideazatetrahidrofólico (DDATHF), piritrexim, raltitrexed, GW1843 [ácido (S)-2-[5-[(1,2-dihidro-3-metil-1-oxobenzo[f]quinazolin-9-il)metil]amino-1-oxo-2-isoindolinil]-glutárico], sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, raltitrexed, PT523, trimetrexato, aminopterina, sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En una realización más típica, el agente anticancerígeno puede ser pemetrexed y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Por ejemplo, el pemetrexed puede ser la sal disódica. En una realización de ejemplo, el pemetrexed puede ser el heptahidrato de sal disódica.

En ciertos casos, la presente divulgación contempla el uso de un agente anticancerígeno que induce la formación de sitios AP, y un inhibidor de BER.

El agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, raltitrexed, PT523, trimetrexato, aminopterina, ácido 5,10-Dideazatetrahidrofólico (DDATHF), piritrexim, raltitrexed, GW1843 [ácido (S)-2-[5-[(1,2-dihidro-3-metil-1-oxobenzo[f]quinazolin-9-il)metil]amino-1-oxo-2-isoindolinil]-glutárico], sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, raltitrexed, PT523, trimetrexato, aminopterina, sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el agente anticancerígeno puede ser pemetrexed y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Por ejemplo, el pemetrexed puede ser la sal disódica. En una realización de ejemplo, el pemetrexed puede ser el heptahidrato de sal disódica.

En un caso típico, el inhibidor de BER se puede seleccionar del grupo que consiste en metoxiamina, etopósido (VP-16, VP-16-123), meso-4,4'-(2,3-butanodiilo)-bis-(2,6-piperazindiona) (ICRF-193, una bisdioxopiperazina), doxorubicina (DOX), amsacrina (4',9-acridinilaminometanosulfon-m-anisidida; mAMSA), pazelliptina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico, novobiocina, coumermicina A1, fostriecina, tenipósido, mitoxantrona, daunorrubicina, N-[2-dimetilamino]etil]acridina-4-carboxamida (DACA), merbarona, quinacrina, elipticinas, epipodofilotoxinas, bromuro de etidio, epirubicina, pirarubicina, 3'-deamino-3'-morfolino-13-desoxo-10-hidroxi carminomicina; 2",3"-bis pentafluorofenoxiacetil-4',6'-etilideno-beta-D glucósido de sal 4'-fosfato-4'-dimetilepipodofilotoxina 2N-metil glucamina (F11782, un epipodofiloide lipofílico fluorado), adriamicina, actinomicina D, antraciclinas (tales como 9-aminoantraciclina), pirazoloacridina (PZA), camptotecina, sales farmacéuticas de topotecán y solvatos de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el inhibidor de BER se puede seleccionar del grupo que consiste en metoxiamina (MX), N-etilmaleimida, O⁶-bencilguanina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y cualquier combinación. En una realización más típica, el inhibidor de BER puede ser metoxiamina (MX) o las sales del mismo.

En un caso, el inhibidor de BER puede ser compuestos que tienen estructuras de fórmula I:



Fórmula I

en la que X es O o NH,

Y es O, S o NH,

Z está ausente o representa O, S o NH,

R representa un hidrógeno o una unidad estructural hidrocarburo, y

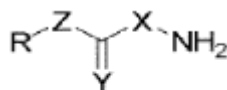
las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En algunos casos, se puede usar un inhibidor de BER para tratar a un paciente o sujeto que tiene una enfermedad neoplásica. Por ejemplo, la enfermedad neoplásica puede ser un cáncer seleccionado del grupo que consiste en carcinomas, melanomas, sarcomas, linfomas, leucemias, astrocitomas, gliomas, melanomas malignos, leucemia linfocítica crónica, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cánceres renales, cánceres de endometrio, cánceres gástricos, cánceres de hígado, cánceres de cabeza y cuello.

En algunos casos, se puede usar un inhibidor de BER para tratar a un paciente o individuo que tiene una enfermedad neoplásica que se está tratando con un agente anticancerígeno.

En un caso típico, el inhibidor de BER se puede seleccionar del grupo que consiste en metoxiamina, etopósido (VP-16, VP-16-123), meso-4,4'-(2,3-butanodiil)-bis-(2,6-piperazindiona) (ICRF-193, una bisdioxopiperazina), doxorubicina (DOX), amsacrina (4',9-acridinilaminometanosulfon-m-anisidida; mAMSA), pazelliptina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico,

- novobiocina, coumermicina A1, fostriecina, tenipósido, mitoxantrona, daunorrubicina, N-[2-dimetilamino)etil]acridina-4-carboxamida (DACA), merbarona, quinacrina, elipticinas, epipodofilotoxinas, bromuro de etidio, epirubicina, pirarubicina, 3'-deamino-3'-morfolino-13-desoxo-10-hidroxi carminomicina; 2",3"-bis pentafluorofenoxiacetil-4',6'-etilideno-beta-D glucósido de sal 4'-fosfato-4'-dimetilepipodofilotoxina 2N-metil glucamina (F11782, un epipodofilode lipofílico fluorado), adriamicina, actinomicina D, antraciclina (tales como 9-aminoantraciclina), pirazoloacridina (PZA), camptotecina, topotecán sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el inhibidor de BER se puede seleccionar del grupo que consiste en metoxiamina (MX), N-etilmaleimida, O⁶-bencilguanina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y cualquier combinación. En una realización más típica, el inhibidor de BER puede ser metoxiamina (MX) o las sales del mismo.
- En un caso típico, el agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, raltrexed, PT523, trimetrexato, aminopterina, ácido 5,10-dideazatetrahidrofólico (DDATHF), piritrexim, raltitrexed, GW1843 [ácido (S)-2-[5-[(1,2-dihidro-3-metil-1-oxobenzo[f]quinazolin-9-il)metil]amino-1-oxo-2-isoindolinil]-glutárico], sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, raltrexed, PT523, trimetrexato, aminopterina, sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el agente anticancerígeno puede ser pemetrexed y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo. Por ejemplo, el pemetrexed puede ser la sal disódica. En un caso de ejemplo, el pemetrexed puede ser el heptahidrato de sal disódica.
- En algunos casos, el inhibidor de BER y el agente anticancerígeno se pueden administrar a un individuo en combinación. Por ejemplo, el inhibidor de BER y el agente anticancerígeno se pueden administrar a un individuo juntos en una formulación parenteral. Alternativamente, el inhibidor de BER y el agente anticancerígeno se pueden administrar a un individuo juntos en una formulación oral, tal como una formulación de dosificación sólida.
- En algunos casos, el inhibidor de BER y el agente anticancerígeno se pueden administrar a un individuo secuencialmente, donde al individuo se le administra primero el agente anticancerígeno y luego se le administra el inhibidor de BER. Por ejemplo, al individuo se le puede dar el agente anticancerígeno en una formulación parenteral, tal como una formulación intravenosa, o una formulación oral, tal como una dosificación sólida y luego se le da el inhibidor de BER en una formulación parenteral, tal como una formulación intravenosa, o una formulación oral, tal como una formulación de dosificación sólida.
- Alternativamente, en algunos casos, el inhibidor de BER y el agente anticancerígeno se pueden administrar a un individuo secuencialmente, donde al individuo se le administra primero el inhibidor de BER y luego se le administra el agente anticancerígeno. Por ejemplo, al individuo se le puede dar el inhibidor de BER en una formulación parenteral, tal como una formulación intravenosa, o una formulación oral, tal como una formulación de dosificación sólida y luego se le administra el agente anticancerígeno en una formulación parenteral, tal como una formulación intravenosa, o una formulación oral, tal como una formulación de dosificación sólida.
- En algunos casos, el agente anticancerígeno y el inhibidor de BER pueden crear un efecto anticancerígeno mayor que el de los efectos anticancerígenos separados de los agentes individuales. Por ejemplo, el efecto anticancerígeno combinado del agente anticancerígeno y el inhibidor de BER puede ser mayor que el efecto anticancerígeno agregado del agente anticancerígeno y el inhibidor de BER cuando se usa individualmente.
- De este modo, los compuestos útiles como inhibidores de BER tales como metoxiamina (MX), N-etilmaleimida, O⁶-bencilguanina, y los compuestos que tienen estructuras de fórmula I:

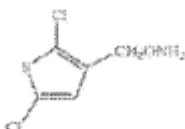
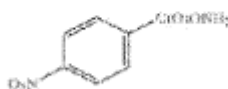
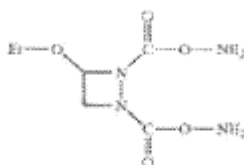
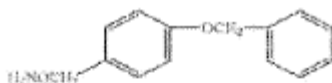


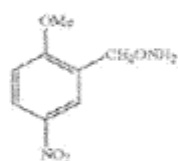
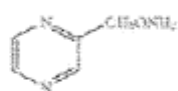
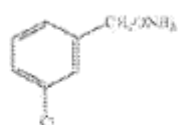
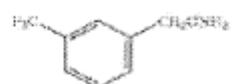
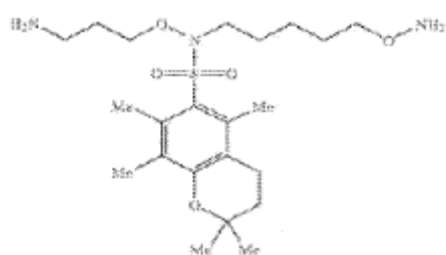
Fórmula I

- en la que X es O o NH,
Y es O, S o NH,
Z está ausente o representa O, S o NH, y
- R representa un hidrógeno o una unidad estructural hidrocarburo,
y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

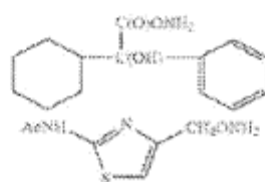
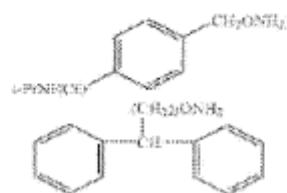
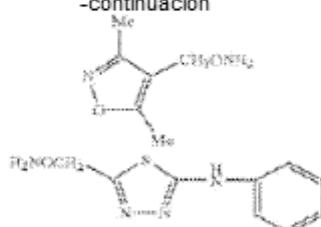
En la BER de un solo nucleótido, la desoxirribosa fosfato (dRP) en el sitio abásico se elimina mediante la actividad liasa de ADN pol β. Los compuestos tales como la metoxiamina reaccionan con el aldehído de un sitio abásico, haciéndolo refractario a la etapa de eliminación β del mecanismo de la dRP liasa, bloqueando de este modo la BER de un solo nucleótido.

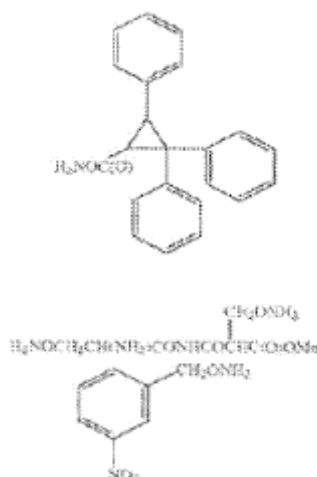
- En algunos casos, los compuestos apropiados pueden evitar que el sustrato de la endonucleasa AP sea susceptible a la escisión. Los agentes anticancerígenos pueden actuar uniéndose a los sitios AP y evitando la escisión de los enlaces fosfodiéster mediada por APE. Otros compuestos que se pueden unir a los sitios AP y prevenir la escisión mediada por APE de los enlaces fosfodiéster incluyen O-bencilhidroxilamina; aminooxiacetato de etilo; ácido aminooxiacético; aminooxiacetato de etilo; $\text{H}_2\text{NOCHMeCO}_2\text{H}$; carboximetoxiamina; ácido aminooxiacético; $\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{ONH}_2$; $\text{H}_2\text{N}-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{SC}(\text{NH}_2)=\text{NH}$; $\text{MeOC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{O}-\text{NH}_2$; $\text{H}_2\text{NOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$; canalina; $\text{H}_2\text{N}-\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{O}-\text{NH}_2$; O-(p-nitrobencil) hidroxilamina; 2-amino-4-(aminooximetil)tiazol; 4-(aminooximetil) tiazol; O,O'-(o-fenilendimetileno)dihidroxilamina; 2,4-dinitrofenoxiamina; O,O'-(m-fenilendimetileno)dihidroxilamina; O,O'-(p-fenilendimetileno)dihidroxilamina; $\text{H}_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{O}-\text{NH}_2$; $\text{H}_2\text{N}-\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{O}-\text{NH}_2$; $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_{15}\text{O}-\text{NH}_2$, éster dimetílico de dietilo del ácido 2,2'-(1,2-etanodiol)bis(3-aminooxi)butenodioico; compuestos que tienen cualquiera de las siguientes estructuras:





-continuación





y las sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos compuestos.

Los compuestos útiles como inhibidores de BER incluyen inhibidores de PARP, tales como 4-amino-1,8-naftalimida (ANI), PD128763, 3-AB, 6-AN y 8-hidroxi-2-metil-quinazolin-4-[3H]ona (NU-1025).

- 5 Los compuestos útiles como inhibidores de BER incluyen inhibidores de ADN polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa β , γ o ϵ), tales como prunasina, afidicolina, 2',3'-didesoxicitidina trifosfato (ddCTP), 2',3'-didesoximidina trifosfato (ddTTP), 2',3'-dideoxiadenosina trifosfato (ddATP), 2',3'-didesoxiguanosina trifosfato (ddGTP), 1-beta-D-arabinofuranosilcitosina (Ara-C), cafeína, arabinocitidina y bleomicina.

- 10 Los compuestos útiles como inhibidores de BER incluyen inhibidores de ADN ligasa (por ejemplo, ADN ligasa I, II o III), tales como ácidos ursólico y oleanólico, ácido aleurítico, ácido protolicheterínico, swertifranching, fulvoplumierina, cloruro de fagaronina y bleomicina. XRCC1 es la proteína asociada del ADN ligasa III, y los inhibidores de XRCC1, tal como 3-AB, también son útiles como inhibidores de la BER.

- 15 Los inhibidores de topoisomerasa II inducen la escisión del ADN y otras aberraciones cromosómicas, que incluyen intercambios de cromátidas hermanas. Compuestos útiles como inhibidores de BER también incluyen inhibidores de topoisomerasa II, tal como etopósido (VP-16, VP-16-123), meso-4,4'-(2,3-butanodiil)-bis-(2,6-piperazindiona) (ICRF-193, una bisdioxopiperazina), doxorubicina (DOX), amsacrina (4',9-acridinilaminometanosulfon-m-anisida; mAMSA), pazelliptina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico, novobiocina, coumermicina A1, fostriecina, tenipósido, mitoxantrona, daunorrubicina, N-[2-dimetilamino]etil]acridina-4-carboxamida (DACA), merbarona, quinacrina, elipticinas, epipodofilotoxinas, bromuro de etidio, epirubicina, pirarrubicina, 3'-deamino-3'-morfolino-13-deoxo-10-hidroxicarminomicina; 2",3"-bis pentafluorofenoxiacetil-4',6'-etilideno-beta-D glucósido de sal 4'-fosfato-4'-dimetilepipodofilotoxina 2N-metil glucamina (F11782, un epipodofilotoxina lipofílico fluorado), adriamicina, actinomicina D, antraciclinas (tal como 9-aminoantraciclina) y pirazoloacridina (PZA). Los inhibidores de topoisomerasa I, tales como camptotecina y topotecán también se pueden usar como inhibidores de BER.

- 25 En algunos casos, otros inhibidores de enzimas, ya sean conocidos en la técnica o identificados en lo que sigue, así como inhibidores de otros elementos de la ruta de BER, tales como ADN alquiltransferasa, se pueden emplear en composiciones y métodos de la presente divulgación.

En ciertos casos, la presente divulgación contempla el uso de un agente anticancerígeno, tal como pemetrexed, que induce la formación de sitios AP y un inhibidor de BER (distinto de un inhibidor de topoisomerasa), tal como metoxiamina.

- 30 En un caso típico, el agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, raltrexed, PT523 y trimetrexato. En un caso más típico, el agente anticancerígeno puede ser pemetrexed y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Por ejemplo, el pemetrexed puede ser la sal disódica. En un caso de ejemplo, el pemetrexed puede ser el heptahidrato de sal disódica.

- 35 En algunos casos, el agente anticancerígeno se puede administrar en una dosis desde aproximadamente 25 mg/m² a aproximadamente 5,000 mg/m² de superficie corporal. Por ejemplo, la dosis puede ser desde aproximadamente 25 mg/m² a aproximadamente 200 mg/m² de superficie corporal; la dosis puede ser desde aproximadamente 150 mg/m² a aproximadamente 500 mg/m² de superficie corporal; la dosis puede ser desde aproximadamente 400 mg/m² a aproximadamente 1000 mg/m² de superficie corporal; la dosis puede ser desde aproximadamente 900 mg/m² a aproximadamente 5,000 mg/m² de superficie corporal; la dosis puede ser desde aproximadamente 200 mg/m² a aproximadamente 1,000 mg/m² de superficie corporal; o la dosis puede ser desde aproximadamente 500 mg/m² a aproximadamente 600 mg/m² de superficie corporal. Los antifolatos son una clase preferida no limitativa de agentes

anticancerígenos. En algunos casos, el agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, raltrexed, PT523 y trimetrexato. En un caso más típico, el agente anticancerígeno puede ser pemetrexed y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Por ejemplo, el pemetrexed puede ser la sal disódica. En un caso de ejemplo, el pemetrexed puede ser el heptahidrato de sal disódica.

En algunos casos, la proporción de inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10000. Por ejemplo, la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:100; la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:500; la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:450 a aproximadamente 1:10000; proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:500; la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:50; la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:40; o la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:30. En un caso típico, el inhibidor de BER se puede seleccionar del grupo que consiste en metoxiamina (MX), N-etilmaleimida, O⁶-bencilguanina, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el inhibidor de BER puede ser metoxiamina (MX).

En algunos casos, se administra un inhibidor de BER en una cantidad suficiente para potenciar o aumentar el efecto de un agente anticancerígeno.

En un caso típico, el agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, raltrexed, PT523, trimetrexato, aminopterina, ácido 5,10 dideazatetrahidrofólico (DDATHF), piritrexim, raltitrexed, GW1843 [ácido (S)-2-[5-[(1,2-dihidro-3-metil-1-oxobenzo[f]quinazolin-9-il)metil]amino-1-oxo-2-isoindolinil]-glutámico], las sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, raltitrexed, PT523, trimetrexato, aminopterina, sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el agente anticancerígeno puede ser pemetrexed y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Por ejemplo, el pemetrexed puede ser la sal disódica. En una realización de ejemplo, el pemetrexed puede ser el heptahidrato de sal disódica.

En un caso típico, el inhibidor de BER se puede seleccionar del grupo que consiste en metoxiamina, etopósido (VP-16, VP-16-123), meso-4,4'-(2,3-butanodiol)-bis-(2,6-piperazindiona) (ICRF-193, una bisdioxopiperazina), doxorubicina (DOX), amsacrina (4',9-acridinilaminometanosulfon-m-anisidida; mAMSA), pazelliptina, ácido nalidíxico, ácido oxolínico, novobiocina, coumermicina A1, fostriecina, tenipósido, mitoxantrona, daunorubicina, N-[2-dimetilamino)etil]acridina-4-carboxamida (DACA), merbarona, quinacrina, elipticinas, epipodofilotoxinas, bromuro de etidio, epirubicina, pirarrubicina, 3'-deamino-3'-morfolino-13-desoxo-10-hidroxi carminomicina; 2'',3''-bis pentafluorofenoxiacetil-4',6'-etilideno-beta-D glucósido de sal 4'-fosfato-4'-dimetilepipo-dofilotoxina 2N-metil glucamina (F11782, un epipodofiloide lipofílico fluorado), adriamicina, actinomicina D, antraciclinas (tales como 9-aminoantraciclina), pirazoloacridina (PZA), camptotecina, sales farmacéuticas de topotecán de las mismas y cualquier combinación. En un caso más típico, el inhibidor de BER se puede seleccionar del grupo que consiste en metoxiamina (MX), N-etilmaleimida, O⁶-bencilguanina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y cualquier combinación. En una realización más típica, el inhibidor de BER puede ser metoxiamina (MX) o las sales del mismo. Por ejemplo, el inhibidor de BER puede ser clorhidrato de metoxiamina (MX).

En algunos casos, la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10000. Por ejemplo, proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:100; proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:500; proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:450 a aproximadamente 1:10000; proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:500; proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:50; la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:40; o proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:30. En un caso típico, el inhibidor de BER se puede seleccionar del grupo que consiste en metoxiamina (MX), N-etilmaleimida, O⁶-bencilguanina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el inhibidor de BER puede ser metoxiamina (MX). En el caso más típico, el inhibidor de BER puede ser metoxiamina (MX) y el agente anticancerígeno puede ser pemetrexed. Por ejemplo, el pemetrexed puede ser la sal disódica de pemetrexed. En un caso de ejemplo, el pemetrexed puede ser el heptahidrato de sal disódica.

Un método de tratamiento del cáncer, comprende

proporcionar una primera formulación que contiene un agente anticancerígeno y una segunda formulación que contiene un inhibidor de BER que se puede administrar por separado o como una formulación combinada.

seleccionar un sujeto diagnosticado con cáncer, en el que dicho cáncer es resistente al tratamiento con el agente anticancerígeno solo o en combinación con otros agentes anticancerígenos;

administrar dicha primera formulación y dicha segunda formulación;

- 5 en el que la cantidad de dicha primera formulación y la cantidad de dicha segunda formulación pueden estar en una cantidad que cuando se administra a dicho sujeto el efecto anticanceroso puede ser mayor que el efecto anticancerígeno de la primera formulación sola.

10 En algunos casos, la primera formulación puede comprender un agente anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, ralitrexed, PT523, trimetrexato, aminopterina, sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En un caso típico, el agente anticancerígeno puede ser pemetrexed. En algunos casos, la segunda formulación puede comprender un inhibidor de BER seleccionado del grupo que consiste en metoxiamina (MX), N-etilmaleimida, O⁶-bencilguanina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y cualquier combinación. En un caso típico, el inhibidor de BER puede ser metoxiamina.

15 En algunos casos, el agente anticancerígeno se puede administrar en una dosis desde aproximadamente 25 mg/m² a aproximadamente 5,000 mg/m² de superficie corporal. Por ejemplo, la dosis puede ser desde aproximadamente 25 mg/m² a aproximadamente 200 mg/m² de superficie corporal; la dosis puede ser desde aproximadamente 150 mg/m² a aproximadamente 500 mg/m² de superficie corporal; la dosis puede ser desde aproximadamente 400 mg/m² a aproximadamente 1000 mg/m² de superficie corporal; la dosis puede ser desde aproximadamente 900 mg/m² a aproximadamente 5,000 mg/m² de superficie corporal; la dosis puede ser desde aproximadamente 200 mg/m² a aproximadamente 1,000 mg/m² de superficie corporal; o la dosis puede ser desde aproximadamente 500 mg/m² a aproximadamente 600 mg/m² de superficie corporal. En algunos casos, el agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, ralitrexed, PT523 y trimetrexato. En un caso más típico, el agente anticancerígeno puede ser pemetrexed y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Por ejemplo, el pemetrexed puede ser la sal disódica. En una realización de ejemplo, el pemetrexed puede ser el heptahidrato de sal disódica.

25 En algunos casos, la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10000. Por ejemplo, proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:100; proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:500; proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:450 a aproximadamente 1:10000; proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:500; proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:50; la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:40; o la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:30. En un caso típico, el inhibidor de BER se puede seleccionar del grupo que consiste en metoxiamina (MX), N-etilmaleimida, O⁶-bencilguanina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el inhibidor de BER puede ser metoxiamina (MX).

Algunos casos proporcionan un método de tratamiento del cáncer, que comprende

proporcionar una primera formulación que contiene un agente anticancerígeno y una segunda formulación que contiene un inhibidor de BER que se puede administrar por separado o como una formulación combinada;

- 40 seleccionando un tema diagnosticado con cáncer;

administrar dicha primera formulación y dicha segunda formulación;

45 en el que la cantidad de dicha primera formulación y la cantidad de dicha segunda formulación pueden estar en una cantidad que cuando se administra a dicho sujeto el efecto anticancerígeno puede ser mayor que el efecto anticancerígeno añadido de la primera formulación que contiene un agente anticancerígeno y la segunda formulación que contiene un inhibidor de BER

50 En algunos casos, la primera formulación puede comprender un agente anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, ralitrexed, PT523, trimetrexato, aminopterina, sales farmacéuticas de los mismos y cualquier combinación. En un caso típico, el agente anticancerígeno puede ser pemetrexed. En algunos casos, la segunda formulación puede comprender un inhibidor de BER seleccionado del grupo que consiste en metoxiamina (MX), N-etilmaleimida, O⁶-bencilguanina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y cualquier combinación. En un caso típico, el inhibidor de BER puede ser metoxiamina.

55 En algunos casos, el agente anticancerígeno se puede administrar en una dosis desde aproximadamente 25 mg/m² a aproximadamente 5,000 mg/m² de superficie corporal. Por ejemplo, la dosis puede ser desde aproximadamente 25 mg/m² a aproximadamente 200 mg/m² de superficie corporal; la dosis puede ser desde aproximadamente 150 mg/m² a aproximadamente 500 mg/m² de superficie corporal; la dosis puede ser desde aproximadamente 400 mg/m² a aproximadamente 1000 mg/m² de superficie corporal; la dosis puede ser desde aproximadamente 900 mg/m² a

aproximadamente 5,000 mg/m² de superficie corporal; la dosis puede ser desde aproximadamente 200 mg/m² a aproximadamente 1,000 mg/m² de superficie corporal; o la dosis puede ser desde aproximadamente 500 mg/m² a aproximadamente 600 mg/m² de superficie corporal. En algunos casos, el agente anticancerígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en pemetrexed, capecitabina, edatrexato, metotrexato, lometrexol, nolatrexed, raltitrexed, PT523 y trimetrexato. En un caso más típico, el agente anticancerígeno puede ser pemetrexed y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Por ejemplo, el pemetrexed puede ser la sal disódica. En un caso de ejemplo, el pemetrexed puede ser el heptahidrato de sal disódica.

En algunos casos, la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10000. Por ejemplo, proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:100; proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:500; proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:450 a aproximadamente 1:10000; proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:500; la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:50; la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:40; o la proporción del inhibidor de BER a agente anticancerígeno puede ser desde aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:30. En un caso típico, el inhibidor de BER se puede seleccionar del grupo que consiste en metoxiamina (MX), N-etilmaleimida, O⁶-bencilguanina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y cualquier combinación. En un caso más típico, el inhibidor de BER puede ser metoxiamina (MX).

Otro aspecto de la divulgación actual es el inesperado que muestra que ciertos inhibidores de BER actúan sinérgicamente en combinación con ciertos antifolatos para invertir inesperadamente la resistencia a ciertos antifolatos. De este modo, en ejemplos preferidos, el agente anticancerígeno antimetabolito es un agente anticancerígeno antifolato. Estos antifolatos interrumpen los procedimientos metabólicos dependientes de folato esenciales para la replicación celular. Los antifolatos son distintos de otros agentes quimioterapéuticos porque actúan para interrumpir los procedimientos celulares implicados en el metabolismo del folato. Estos incluyen la inhibición de enzimas dependientes de folato, que incluyen, pero no se limitan a, timidilato sintasa (TS). La interrupción de los procedimientos dependientes de folato conduce a la replicación inadecuada del ADN y la apoptosis de las células que se dividen rápidamente, incluidas las células cancerosas. En un caso, la proporción de MX a agente anticancerígeno antimetabolito está entre aproximadamente 1:5 y 1:500. En ciertos casos, la proporción de MX a agente anticancerígeno antimetabolito está entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100, entre aproximadamente 1:25 y aproximadamente 1:75, entre aproximadamente 1:15 y aproximadamente 1:40, o entre aproximadamente 1:20 y aproximadamente 1:30. Además, se puede administrar un segundo agente anticancerígeno antes o después de la combinación de MX y agente anticancerígeno antimetabolito.

Composiciones farmacéuticas

Se apreciará que las composiciones proporcionadas en este documento pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un sólido, líquido o gas (por ejemplo, aerosol). Otras rutas de administración apropiadas incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral (por ejemplo, sublingual o bucal), sublingual, rectal, vaginal e intranasal. El término parenteral, como se usa en este documento, incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intratecal, intramesetal, intrauretral o técnicas de infusión. La composición farmacéutica se formula de modo que permita que los ingredientes activos contenidos en la misma sean biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un paciente toman la forma de una o más unidades de dosificación, donde, por ejemplo, un comprimido puede ser una única unidad de dosificación, y un recipiente de uno o más compuestos de la divulgación en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende agentes con actividad de superficie, portadores, diluyentes, excipientes, agentes suavizantes, agentes de suspensión, sustancias formadoras de película y agentes auxiliares de recubrimiento fisiológicamente aceptables, o una combinación de los mismos; y un compuesto descrito en este documento. Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). Se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes, edulcorantes, fragancias, agentes aromatizantes y similares en la composición farmacéutica. Por ejemplo, se pueden añadir benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico como conservantes. Además, se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión. En diversos casos, se pueden usar alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados y similares como agentes con actividad de superficie; sacarosa, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, silicato anhidro ligero, aluminato de magnesio, aluminato de metasilicato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio, carbonato ácido de sodio, hidrogenofosfato de calcio, carboximetil celulosa de calcio, y similares se pueden usar como excipientes; estearato de magnesio, talco, aceite endurecido y similares se pueden usar como agentes suavizantes; aceite de coco, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de maní, la soja se pueden usar como agentes de suspensión o lubricantes; ftalato de acetato de celulosa como un derivado de un carbohidrato tal como celulosa o azúcar, o copolímero de metilacetato-metacrilato como un derivado de polivinilo se

pueden usar como agentes de suspensión; y plastificantes tales como éster de ftalatos y similares se pueden usar como agentes de suspensión.

5 El término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un compuesto descrito en este documento con otros componentes químicos, tales como diluyentes o portadores. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un organismo. En la técnica existen múltiples técnicas de administración de un compuesto que incluyen, pero no se limitan a, administración oral, inyección, aerosol, parenteral y tópica. Las composiciones farmacéuticas también se pueden obtener haciendo reaccionar compuestos con ácidos inorgánicos u orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares.

10 El término "portador" define un compuesto químico que facilita la incorporación de un compuesto en células o tejidos. Por ejemplo, el dimetilsulfóxido (DMSO) es un portador comúnmente usado ya que facilita la absorción de muchos compuestos orgánicos en las células o tejidos de un organismo.

15 El término "diluyente" define compuestos químicos diluidos en agua que disolverán el compuesto de interés, así como estabilizarán la forma biológicamente activa del compuesto. Las sales disueltas en soluciones reguladas se utilizan como diluyentes en la técnica. Una solución regulada comúnmente usada es la solución salina regulada con fosfato porque imita las condiciones de sal de la sangre humana. Dado que las sales reguladas pueden controlar el pH de una solución a bajas concentraciones, un diluyente regulado raramente modifica la actividad biológica de un compuesto.

El término "fisiológicamente aceptable" define un portador o diluyente que no deroga la actividad biológica y las propiedades del compuesto.

20 Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento se pueden administrar a un paciente humano per se, o en composiciones farmacéuticas en las que se mezclan con otros ingredientes activos, como en terapia de combinación, o portadores o excipientes apropiados. Las técnicas para la formulación y administración de los compuestos de la presente solicitud se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition, 1990.

25 Las rutas de administración apropiadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, tópica o intestinal; administración parenteral, que incluye inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares. Los compuestos también se pueden administrar en formas de dosificación de liberación sostenida o controlada, que incluyen inyecciones de depósito, bombas osmóticas, píldoras, parches transdérmicos (que incluyen electrotransporte) y similares, para administración pulsada prolongada y/o temporizada a una velocidad predeterminada.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden fabricar de una manera que se conoce por sí misma, por ejemplo, por medio de procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o de elaboración de comprimidos.

35 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente divulgación pueden de este modo formularse de manera convencional usando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la ruta de administración elegida. Cualquiera de las técnicas, portadores y excipientes bien conocidos se pueden usar como apropiados y como se entienden en la técnica; por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, arriba.

40 Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas apropiadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los excipientes apropiados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, clorhidrato de cisteína y similares. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes reguladores del pH y similares. Las soluciones reguladoras fisiológicamente compatibles incluyen, pero no se limitan a, solución de Hanks, solución de Ringer o solución salina reguladora fisiológica. Si se desea, se pueden usar preparaciones potenciadoras de la absorción (por ejemplo, liposomas).

45 Para la administración transmucosal, se pueden usar penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear en la formulación.

50 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua, incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones de inyección aceitosas apropiadas. Los solventes o vehículos lipófilos apropiados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo u otros aceites orgánicos tales como aceites de soja, pomelo o almendra, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la

suspensión también puede contener estabilizantes o agentes apropiados que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo apropiado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

Para la administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales portadores permiten que los compuestos de la invención se formen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente que se va a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse combinando los compuestos activos con excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares apropiados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes apropiados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Los núcleos de grageas cuentan con recubrimientos apropiados. Para este fin, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos apropiados o mezclas de solventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos. Para este fin, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos apropiados o mezclas de solventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a las comprimidos o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos apropiados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones apropiadas para tal administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o comprimidos para deshacer en la boca formulados de manera convencional.

Para la administración por inhalación, los compuestos para uso según la presente divulgación se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas apropiado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo apropiada tal como lactosa o almidón.

Se describen adicionalmente en este documento diversas composiciones farmacéuticas bien conocidas en la técnica farmacéutica para usos que incluyen administración intraocular, intranasal e intraauricular. Los penetrantes apropiados para estos usos son generalmente conocidos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas para administración intraocular incluyen soluciones oftálmicas acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, tales como gotas para los ojos, o en goma gellan (Shedden et al., Clin. Ther., 23(3):440-50 (2001)) o hidrogeles (Mayer et al., Ophthalmologica, 210(2):101-3 (1996)); ungüentos oftálmicos; suspensiones oftálmicas, tales como micropartículas, pequeñas partículas poliméricas que contienen fármaco que están suspendidas en un medio portador líquido (Joshi, A., J. Ocul. Pharmacol., 10(1):29-45 (1994)), formulaciones solubles en lípidos (Alm et al., Prog. Clin. Biol. Res., 312:447-58 (1989)), y microesferas (Mordenti, Toxicol. Sci., 52(1):101-6 (1999)); e insertos oculares. Tales formulaciones farmacéuticas apropiadas se formulan con la mayor frecuencia y de preferencia para que sean estériles, isotónicas y reguladas para la estabilidad y la comodidad. Las composiciones farmacéuticas para administración intranasal también pueden incluir gotas y aerosoles preparados a menudo para simular en muchos aspectos secreciones nasales para asegurar el mantenimiento de la acción ciliar normal. Como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990), y bien conocido para los expertos en el arte, las formulaciones apropiadas son más a menudo y preferiblemente isotónicas, ligeramente reguladas para mantener un pH de 5.5 a 6.5, y más frecuente y preferiblemente incluyen conservantes antimicrobianos y estabilizantes de fármacos apropiados. Las formulaciones farmacéuticas para administración intraauricular incluyen suspensiones y ungüentos para aplicación tópica en el oído. Los solventes comunes para tales formulaciones aurales incluyen glicerina y agua.

Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Para los compuestos hidrófobos, un portador farmacéutico apropiado puede ser un sistema de cosolventes que comprende alcohol bencílico, un surfactante no polar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase acuosa. Un sistema de cosolventes común usado es el sistema de cosolventes VPD, que es una solución de alcohol bencílico al 3% p/v, 8% p/v del surfactante no polar Polysorbate 80™ y 65% p/v de polietilenglicol 300, hecho hasta volumen en etanol absoluto. Naturalmente, las proporciones de un sistema de cosolventes se pueden variar considerablemente sin destruir sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los componentes cosolventes se puede variar: por ejemplo, se pueden usar otros surfactantes no polares de baja toxicidad en lugar de POLYSORBATE 80™; el tamaño de la fracción de polietilenglicol puede variarse; otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar polietilenglicol, por ejemplo, polivinilpirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituir a la dextrosa.

Alternativamente, se pueden emplear otros sistemas de administración para compuestos farmacéuticos hidrófobos. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de administración o portadores para fármacos hidrófobos. También se pueden emplear ciertos solventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, aunque habitualmente a costa de una mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos se pueden administrar usando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido diversos materiales de liberación sostenida y son bien conocidos para los expertos en el arte. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, según su naturaleza química, liberar los compuestos durante algunas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

Los agentes destinados para ser administrados intracelularmente se pueden administrar usando técnicas bien conocidas para los expertos en el arte. Por ejemplo, tales agentes se pueden encapsular en liposomas. Todas las moléculas presentes en una solución acuosa en el momento de la formación del liposoma se incorporan en el interior acuoso. Los contenidos liposómicos están protegidos del microambiente externo y, debido a que los liposomas se fusionan con las membranas celulares, se administran eficientemente al citoplasma de la célula. El liposoma puede estar recubierto con un anticuerpo específico de tejido. Los liposomas serán dirigidos y tomados selectivamente por el órgano deseado. Alternativamente, pequeñas moléculas orgánicas hidrófobas se pueden administrar directamente intracelularmente.

Se pueden incorporar agentes terapéuticos o de diagnóstico adicionales en las composiciones farmacéuticas. Alternativa o adicionalmente, las composiciones farmacéuticas se pueden combinar con otras composiciones que contienen otros agentes terapéuticos o de diagnóstico.

Métodos de administración

Los compuestos o composiciones farmacéuticas se pueden administrar al paciente por cualquier medio apropiado. Los ejemplos no limitantes de métodos de administración incluyen, entre otros, (a) administración a través de vías orales, cuya administración incluye la administración en cápsulas, comprimidos, gránulos, pulverizaciones, jarabes u otras formas similares; (b) administración a través de vías no orales tales como rectal, vaginal, intrauretral, intraocular, intranasal o intraauricular, cuya administración incluye la administración como una suspensión acuosa, una preparación oleosa o similares o como un goteo, pulverización, supositorio, bálsamo, ungüento o similares; (c) administración por inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternal o similares, incluida la administración de la bomba de infusión; (d) administración localmente tal como mediante inyección directamente en el área renal o cardíaca, por ejemplo, mediante implantación de depósito; así como también (e) administración tópica; según lo consideren apropiado los expertos en el arte para poner en contacto el compuesto de la divulgación con tejido vivo.

Las composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr su propósito previsto. La cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos descritos en este documento requeridos como una dosis dependerá de la ruta de administración, el tipo de animal, incluido el ser humano, que se está tratando, y las características físicas del animal específico en consideración. La dosis se puede adaptar para lograr el efecto deseado, pero dependerá de factores tales como el peso, la dieta, la medicación concurrente y otros factores que los expertos en la medicina reconocerán. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de compuesto eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en el arte, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en este documento.

Como será fácilmente evidente para un experto en el arte, la dosificación útil in vivo que se va a administrar y el modo particular de administración variarán dependiendo de la edad, el peso y las especies de mamíferos tratadas, los compuestos particulares empleados, y el específico uso para el que se emplean estos compuestos. La determinación de los niveles de dosificación eficaces, es decir los niveles de dosificación necesarios para lograr el resultado deseado, puede ser realizada por un experto en el arte usando métodos farmacológicos de rutina. Por lo general, las aplicaciones clínicas humanas de productos se inician a niveles de dosificación más bajos, aumentándose el nivel de dosificación hasta que se consigue el efecto deseado. Alternativamente, se pueden usar estudios in vitro aceptables para establecer dosis útiles y rutas de administración de las composiciones identificadas por los presentes métodos usando métodos farmacológicos establecidos.

En estudios en animales no humanos, las aplicaciones de productos potenciales se inician a niveles de dosificación superiores, disminuyendo la dosificación hasta que ya no se consigue el efecto deseado o desaparecen los efectos secundarios adversos. La dosificación puede variar ampliamente, dependiendo de los efectos deseados y la indicación terapéutica. Por lo general, las dosificaciones pueden estar entre aproximadamente 10 microgramos/kg y 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 100 microgramos/kg y 10 mg/kg de peso corporal. Alternativamente, las dosificaciones se pueden basar y calcular sobre el área superficial del paciente, tal como entienden los expertos en el arte.

La formulación, la ruta de administración y la dosificación exactas para las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden ser elegidas por el médico individual a la vista del estado del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl et al. 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", con referencia particular a Ch. 1, p.1). Por lo general, el intervalo de dosis de la composición administrada al paciente puede ser desde aproximadamente 0.5 a 1000 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosificación puede ser una sola o una serie de dos o más administrados en el transcurso de uno o más días, según lo necesite el paciente. En casos en los que las dosificaciones humanas para compuestos se han establecido para al menos alguna condición, la presente divulgación usará las mismas dosificaciones, o dosificaciones que están entre aproximadamente 0.1% y 500%, más preferiblemente entre aproximadamente 25% y 250% de la dosificación para humano establecida. Cuando no se establezca una dosificación humana, como será el caso de compuestos farmacéuticos recientemente descubiertos, se puede inferir una dosificación humana apropiada a partir de valores ED₅₀ o ID₅₀, u otros valores apropiados derivados de estudios in vitro o in vivo, según se califica por los estudios de toxicidad y estudios de eficacia en animales.

Se debe observar que el médico tratante sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a la toxicidad o disfunciones orgánicas. Por el contrario, el médico tratante también sabría ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta clínica no fuera apropiada (excluyendo la toxicidad). La magnitud de una dosis administrada en el tratamiento del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección que se va a tratar y con la ruta de administración. La gravedad de la condición puede, por ejemplo, evaluarse, en parte, mediante métodos de evaluación de pronóstico estándar. Además, la dosis y tal vez la frecuencia de la dosis también variarán según la edad, el peso corporal y la respuesta del paciente individual. Un programa comparable al discutido anteriormente se puede usar en medicina veterinaria.

Aunque la dosificación exacta se determinará en base a fármaco por fármaco, en la mayoría de los casos, pueden hacerse algunas generalizaciones con respecto a la dosificación. El régimen de dosificación diaria para un paciente humano adulto puede ser, por ejemplo, una dosis oral de entre 0.1 mg/m² y 2000 mg/m² de superficie corporal por día de cada ingrediente activo, por lo general entre 1 mg/m² y 500 mg/m² de superficie corporal por día, por ejemplo 5 mg/m² a 200 mg/m² de superficie corporal por día. En otros casos, una dosis intravenosa, subcutánea o intramuscular de cada ingrediente activo de entre 0.01 mg/m² y 100 mg/m² de superficie corporal por día, por lo general entre 0.1/m² mg y 60 mg/m² de superficie corporal por día, por ejemplo, se puede usar 1 mg/m² a 40 mg/m² de superficie corporal por día. En los casos de administración de una sal farmacéuticamente aceptable, las dosificaciones se pueden calcular como la base libre. En algunos casos, la composición se administra de 1 a 4 veces por día. Alternativamente, las composiciones de la divulgación se pueden administrar mediante infusión intravenosa continua, preferiblemente a una dosis de cada ingrediente activo hasta 1000 mg/m² de superficie corporal por día. Como entenderán los expertos en el arte, en ciertas situaciones puede ser necesario administrar los compuestos descritos en este documento en cantidades que excedan, o incluso excedan, el intervalo de dosis preferido indicado anteriormente para tratar eficaz y agresivamente particularmente enfermedades o infecciones agresivas. En algunos casos, los compuestos se administrarán durante un período de terapia continua, por ejemplo, durante una semana o más, o durante meses o años.

La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles en plasma de la unidad estructural del activo que son suficientes para mantener los efectos moduladores, o una concentración eficaz mínima (MEC). La MEC variará para cada compuesto, pero puede estimarse a partir de datos in vitro. Las dosis necesarias para lograr la MEC dependerán de las características individuales y la ruta de administración. Sin embargo, los ensayos de HPLC o bioensayos se pueden usar para determinar las concentraciones en plasma.

Los intervalos de dosificación también se pueden determinar usando el valor de MEC. Las composiciones se deben administrar usando un régimen que mantenga los niveles de plasma por encima de MEC, durante el 10-90% del tiempo, por lo general entre el 30-90% y más por lo general entre el 50-90%.

En casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la concentración en plasma.

La cantidad de composición administrada puede depender del sujeto que se está tratando, del peso del sujeto, la gravedad de la afección, la forma de administración y el juicio del médico que prescribe.

5 Los compuestos descritos en este documento pueden evaluarse para determinar su eficacia y toxicidad usando métodos conocidos. Por ejemplo, la toxicología de un compuesto particular, o de un subconjunto de los compuestos, que comparten ciertas unidades estructurales químicas, se puede establecer determinando la toxicidad in vitro hacia una línea celular, tal como una línea celular de mamífero, y preferiblemente humana. Los resultados de tales estudios a menudo son predictivos de toxicidad en animales, tales como los mamíferos, o más específicamente, los humanos.

10 Alternativamente, la toxicidad de compuestos particulares en un modelo animal, tal como ratones, ratas, conejos o monos, se puede determinar usando métodos conocidos. La eficacia de un compuesto en particular se puede establecer usando varios métodos reconocidos, tales como métodos in vitro, modelos animales o ensayos clínicos en humanos. Existen modelos in vitro reconocidos para casi todas las clases de afecciones, que incluyen, pero no se limitan a, cáncer, enfermedades cardiovasculares y diversas disfunciones inmunológicas. De forma similar, se pueden usar

15 modelos animales aceptables para establecer la eficacia de los productos químicos para tratar tales afecciones. Cuando se selecciona un modelo para determinar la eficacia, el experto en el arte se puede guiar por el estado de la técnica para elegir un modelo, dosis y ruta de administración, y régimen apropiados. Por supuesto, los ensayos clínicos en humanos también se pueden usar para determinar la eficacia de un compuesto en humanos.

20 Las composiciones pueden, si se desea, estar presentar en un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El paquete puede comprender, por ejemplo, lámina metálica o de plástico, tal como un paquete blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones de administración. El paquete o dispensador también puede ir acompañado de un aviso asociado con el recipiente en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, notificación que refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma del fármaco para

25 humanos o administración veterinaria. Tal aviso, por ejemplo, puede ser el etiquetado aprobado por the U.S. Food and Drug Administration, para medicamentos con receta o el prospecto del producto aprobado. Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un portador farmacéutico compatible también se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para uso en el tratamiento de una afección indicada.

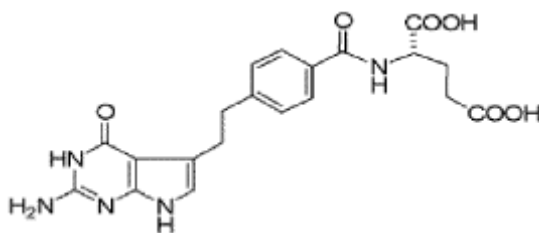
30 A lo largo de la memoria descriptiva, se debe entender que cualquier recitación de un compuesto particular abarca ese compuesto y cualesquiera (otras) sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En la primera etapa de BER, una serie de glicosilasas reconocen bases anormales tales como N³ mA y N⁷ mG (O'Connor et al. "Isolation and structure of a cDNA expressing a mammalian 3-methyladenine-DNA glycosylase" EMBO J. 9:3337-3342, 1990; Samson et al. "Cloning and characterization of a 3-methyladenine DNA glycosylase cDNA from human cells whose gene maps to chromosome 16" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9127-9131, 1991), el apareamiento erróneo T:G (Neddermann et al. "Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor alpha and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130" J. Biol. Chem. 271:12767-12774, 1996), y bases desaminadas tales como hipoxantina/8-oxo-7,8-dihidroguanina oxidada o uracilo:A (Vollberg et al. "Isolation and characterization of the human uracil DNA glycosylase gene" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8693-8697, 1989; Olsen et al. "Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme" EMBO J. 8:3121-3125, 1989; Radicella et al. "Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8010-8015, 1997; Rosenquist et al. "Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7429-7434, 1997). Tras la hidrólisis enzimática o espontánea del enlace N-glicosídico y la liberación de la base anormal, la endonucleasa AP (apurínica/apirimidínica) hidroliza el esqueleto del fosfodiéster 5' a la lesión y dRpasa (una desoxirribosofodiesterasa del ADN y su actividad se asocia con la polimerasa β) corta la dRp residual, generando una brecha de un nucleótido. La ADN polimerasa β llena la brecha y la ADN ligasa sella el nick. Esta vía se llama BER de parche corto. Una vía alternativa para BER implica la síntesis de ADN para llenar una brecha de 2 a 13 nucleótidos. Esta larga reparación de parche largo requiere la proliferación del antígeno nuclear celular (PCNA) y el ADN polimerasa dependiente de PCNA (Wilson "Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta" Mutation Res. 407:203-215, 1998).

50 Poli (ADP-ribosa)-polimerizado (PARP) actúa como un sensor de nick de rupturas de cadena de ADN por sí mismo o la interacción con XRCC1 y se implica en BER. PARP une el ADN dañado, lo que produce autoribosilación. La proteína modificada libera y permite que otras proteínas accedan y reparen las rupturas de la cadena de ADN (Wilson "Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta" Mutation Res. 407:203-215, 1998; Molinete et al. "Over production of the poly (ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells" EMBO J. 12:2109-2117, 1993; Caldecott et al. "XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro" Nucleic Acids Res. 24:4387-4394, 1996). Por lo tanto, PARP participa en BER después de la formación de nick en la reparación tanto de parche corto como de parche largo. Parece más activo en la ruta alternativa (reparación de parche largo) para BER. La figura 6 muestra que la combinación de Pemetrexed y MX mejora la formación de PARP escindido. La mejora de las rupturas de cadena doble de ADN y la apoptosis es independiente de la ruta de Bcl-2.

Generalmente, la nomenclatura usada en lo que sigue y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, cultivo de tejidos, biología tumoral y genética molecular descritos a continuación son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para métodos de cultivo celular, diseño experimental y formulación y nomenclatura de compuestos. En general, las reacciones químicas y las etapas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente según métodos convencionales en la técnica y diversas referencias generales (véase, en general, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., and *Current Protocols in Molecular Biology* (1996) John Wiley and Sons, Inc., N.Y., que se incorporan en este documento como referencia) que se proporcionan a lo largo de este documento.

10 Pemetrexed (ácido 2-[4-[2-(4-amino-2-oxo-3,5,7-triazabicyclo[4.3.0]nona-3,8,10-trien-9-il)etil] benzoil] aminopentanodioico) (ALIMTA™; Eli Lilly & Co.) es un agente quimioterapéutico antimetabolito que tiene la siguiente estructura:



15 Pemetrexed es un agente antineoplásico antifolato que ejerce su acción al alterar los mecanismos dependientes de folato necesarios para la replicación celular. Pemetrexed inhibe la timidilato sintasa (TS), la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la ribonucleótido formiltransferasa de glicinamida (GARFT), enzimas implicadas en la biosíntesis de novo de nucleótidos de timidina y purina. Pemetrexed está aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer de pulmón de célula no pequeña y aprobado en combinación con cisplatino (un fármaco de quimioterapia basado en platino) para el tratamiento del mesotelioma pleural maligno. La dosis recomendada para el tratamiento de mesotelioma (en combinación con cisplatino) o cáncer de pulmón de célula no pequeña es aproximadamente 500 mg/m² de superficie corporal por día administrada como una infusión intravenosa durante 10 minutos el día 1 de cada ciclo de 21 días. Para uso en terapia de combinación con metoxiamina, los intervalos de dosificación típicos de pemetrexed son generalmente entre 200 mg/m² y 1,000 mg/m² de superficie corporal por día, o entre 500 mg/m² y 600 mg/m² de superficie corporal por día; y los intervalos de dosificación típicos de metoxiamina están entre 1 y 200 mg/m² de superficie corporal por día, o de 6 a 120 mg/m² de superficie corporal por día. En un caso, pemetrexed se administra de la misma manera que se describió anteriormente; sin embargo, la infusión intravenosa se puede realizar durante 15 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min o más, y se puede realizar en el día 1, más uno o más días adicionales de un ciclo determinado, que puede ser de 1 semana, 2 semanas, tres semanas, un mes o más.

Ejemplos

30 Materiales y métodos

Productos químicos y reactivos. La metoxiamina (MX) se adquirió en Sigma (St. Louis, MO). MX se disolvió en agua esterilizada (pH 7.0).

35 Transferencia de Western para la detección de escisión de PARP. Los extractos celulares se resolvieron mediante SDS-PAGE (poliacrilamida al 12%) en un aparato minigel Bio-Rad a 150 V durante 1 hora. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDV, usando una célula Bio-Rad mini Trans-Blot durante 1 hora a 100 V. Las membranas transferidas se bloquearon con leche seca al 5% en 15 soluciones reguladoras TBS y luego se sondearon durante 2 horas con anticuerpo anti-PARP C2-10 (Trevigen, Gaithersburg, Md.). Después de tres lavados de 5 minutos con TBSTween20 (0.05%), las transferencias se incubaron con anticuerpo secundario, anti-IgG de HRP antiraton durante 1 hora (Amersham Life Science, Arlington Height Ill.). La unión del anticuerpo se visualizó mediante ECL según las instrucciones del fabricante (Amersham Life Science, Arlington Heights, Ill.).

45 Tumores en ratones desnudos. Se inyectaron células tumorales (5x10⁶) en los flancos de ratones desnudos HSD atómicos hembra, a las 6-8 semanas de edad. Los animales recibieron cinco inyecciones intraperitoneales diarias de ya sea solución salina, pemetrexed solo (150 mg/kg), MX solo (4 mg/kg) o una combinación de pemetrexed (150 mg/kg) y MX (4 mg/kg) con un pemetrexed a una relación de MX de 26.7: 1.0. Los tumores se midieron con calibradores usando la fórmula del Instituto Nacional del Cáncer: V=L (mm) x l² (mm)/2 donde L es el diámetro más grande e l es el diámetro más pequeño del tumor. Cuando el volumen de los nódulos había alcanzado aproximadamente 100-150 mm³, los ratones portadores de tumores se asignaron aleatoriamente para los grupos control o de tratamiento (6-9 ratones/grupo).

Ejemplo 1

La figura 8 muestra que todos los grupos que recibieron metoxamina (MX) + pemetrexed exhibieron mayor retraso del crecimiento tumoral en comparación con los grupos que recibieron solo pemetrexed en el modelo de línea celular NCI-H460 NSCLC humana, modelo de línea celular A549 NSCLC, modelo de línea celular de cáncer de colon HCT116 y el modelo de línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468. MX revirtió la resistencia de la línea celular NCI-H460 NSCLC y la línea celular de cáncer de colon HCT116 a los efectos de la quimioterapia con pemetrexed.

Ejemplo 2

Para determinar el efecto de pemetrexed + metoxamina (MX) en comparación con pemetrexed solo en el número de sitios AP generados, se utilizó un reactivo de sonda de reactivo aldehído (ARP) para medir los sitios AP formados por pemetrexed y bloqueados por MX. ARP y MX tienen una reactividad similar con los sitios AP, y reaccionan específicamente con un grupo aldehído, una forma de anillo abierto de los sitios AP. El ensayo se describe en Liu et al. (Molecular Cancer Therapeutics 2:1061-1066, 2003), y se realizó esencialmente como se describe por Nakamura et al. (Cancer Res. 58:222-225, 1998). Las células H460 se trataron con pemetrexed (0, 100, 200 o 400 μ M) durante 24 horas. A continuación, se extrajo ADN (15 μ g) de las células y se incubó con ARP 1 mM a 37°C, durante 10 minutos. El ADN se precipitó y se lavó con etanol, luego se resuspendió en solución reguladora TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.2, EDTA 1 mM) y se desnaturizó a 100°C, durante 5 min. El ADN se enfrió rápidamente en hielo y se mezcló con una cantidad igual de acetato de amonio (2 M). El ADN monocatenario se inmovilizó luego sobre una membrana de nitrocelulosa usando un dispositivo de filtro de vacío. La membrana se incubó con peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina a temperatura ambiente durante 30 minutos y se enjuagó con solución reguladora de lavado (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0.26 M, Tween-20 al 1%). Los sitios ARP-AP se visualizaron con reactivos ECL (Amersham, Piscataway, NJ). Los resultados se muestran en 4A. El pemetrexed a dosis de 100, 200 y 400 μ M indujo la formación de sitios AP, con el grado de inducción del sitio AP proporcional a la dosis de pemetrexed (Fig 4A). La adición de MX a pemetrexed redujo significativamente la cantidad de sitios AP detectables en comparación con pemetrexed solo. El efecto de la combinación de 200 μ M de pemetrexed y MX 6 mM se observó a las 24 horas, 48 horas y 72 horas. Los resultados se muestran en la figura 4B. Con el tiempo, el número de sitios AP detectables se redujo tanto con pemetrexed solo como con pemetrexed en combinación con MX.

En resumen, pemetrexed induce la formación de sitios AP, mientras que la combinación de pemetrexed y MX 100 μ M redujo los sitios AP detectables para controlar los niveles que se debe, no a la ausencia de sitios AP, sino a la ocupación de los sitios AP por MX, lo que los hace no disponibles para ARP. La ocupación de los sitios AP depende del tiempo, lo que indica que los niveles sostenidos de MX son necesarios para un efecto máximo.

Ejemplo 3

Se realizó un ensayo de ruptura de cadena de ADN para determinar la capacidad de pemetrexed y metoxamina (MX) para aumentar la muerte celular tumoral mediada por apoptosis y ruptura de cadena de ADN. El ensayo de Comet se describe en Liu et al. (supra), y se basa en la capacidad de los fragmentos de ADN escindidos y desnaturizados para migrar fuera de la célula bajo la influencia de un campo eléctrico. El ADN no dañado migra más lentamente y permanece dentro de los confines del núcleo cuando se aplica una corriente. El daño al ADN se evaluó en una célula basándose en la evaluación de la forma de la cola "comet" de ADN y la distancia de migración (Helma et al., Mutat. Res. 466:9-15, 2000). Las células se recogieron y se lavaron con PBS después de la exposición a pemetrexed 200 μ M, MX 6 mM o pemetrexed 200 μ M + MX 6 mM, cada uno durante 4 horas. Se mezcló una suspensión de células H460 (1 x 10⁵/ml de PBS frío) con agarosa al 1% a baja temperatura de gelificación a 42°C en una proporción de 1:10 (v/v) y se pipetearon 75 μ l inmediatamente sobre CometSlide (Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD). Cuando se ajustó la baja temperatura de gelificación de la agarosa, los portaobjetos se sumergieron en solución reguladora de lisis enfriada previamente (Tris-HCl 10 mM, pH 10.5-11.5, NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, que contenía Triton X-100 al 1%, añadido justo antes del uso) a 4°C, durante 1 h. Después de la lisis, los portaobjetos se lavaron con agua destilada, se dispusieron longitudinalmente en un tanque de electroforesis y se sumergieron en solución reguladora alcalina (NaOH 50 mM, pH 12-12.5, EDTA 1 mM) durante 30 minutos. Los portaobjetos se sometieron a electroforesis en álcali (pH>13, NaOH 300 mM, EDTA 1 mM) y solución neutra (1 X TBE) durante 25 min a 18 V (0.6 V/cm), 250 mA. La electroforesis alcalina detecta rupturas de ADN tanto monocatenario y bicatenario, resultantes de sitios AP así como de otros aductos de ADN lábiles a los álcalis, mientras que la electroforesis neutro detecta rupturas de ADN bicatenario predominantemente. Los portaobjetos se retiraron y se lavaron con solución reguladora de neutralización (Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5) durante 10 minutos, luego con PBS, luego se dejaron secar al aire durante la noche a temperatura ambiente. El ADN se tiñó usando el kit de tinción de plata (Trevigen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los Comets se visualizaron usando un microscopio Olympus. Las imágenes se capturaron usando una cámara digital y se analizaron usando el software de imágenes NIH.

Las imágenes de Comet se muestran en las figuras 1A (ensayo alcalino) y 1B (ensayo neutro). Después del tratamiento con pemetrexed y MX, se observaron Comets distintos, y la longitud de la cola fue aproximadamente 4 veces mayor que con MX sola, y aproximadamente dos veces mayor que con pemetrexed solo (Figuras 1C-D).

Los resultados del estudio de eficacia del xenoinjerto, el ensayo del sitio AP y el ensayo Comet muestran que MX actúa como un modulador estructural de los sitios AP, potenciando el efecto terapéutico del agente antimetabolito pemetrexed al invertir la resistencia a la quimioterapia, produciendo así un efecto sinérgico.

Ejemplo 4

Análisis del efecto del sitio AP o del sitio MX-AP en la escisión de ADN mediada por topoisomerasa II. Se incorporó un sitio apurínico de posición específica reemplazando un nucleósido único con desoxiuridina en un sitio de escisión de topoisomerasa II y luego se eliminó la base de uracilo con uracilo-ADN glicosilasa, generando sitios AP que se incuban adicionalmente con MX para producir sitios MX-AP (FIG 5A).

En primer lugar, se determinó si APE tiene un efecto diferencial entre sitios AP normales y sitios MX-AP localizados en un sitio de posición específica para la escisión topo II. Los resultados muestran que APE puede escindir sitios AP regulares en lugar de sitios AP unidos a MX (Figura 5B), sin embargo, ambos sitios AP y MX-AP son escindidos por topoisomerasa II, lo que indica que los sitios MX-AP son capaces de estimular la escisión de ADN mediada por topoisomerasa II.

Ejemplo 5

Estudio de biodisponibilidad oral e intravenosa de MX a través de una única administración en bolo para ratas Sprague Dawley (sin GLP). Los estudios que se describen a continuación se realizaron para evaluar la biodisponibilidad de la metoxiamina (MX) en el nivel de dosis segura mediante la comparación de los parámetros farmacocinéticos después de administraciones únicas de bolo oral e intravenosa de MX

Animales de prueba. Durante el estudio se usaron treinta ratas Sprague Dawley machos y treinta hembras, 250-350 g, de 7-10 semanas.

Preparación y concentración de dosis. Se preparó una solución de dosis el mismo día de la administración de la dosis, ajustada para la pureza del 98% del artículo de prueba, para alcanzar una concentración de 4.00 mg/ml de MX "activo", se disolvieron 816.77 mg de MX en dextrosa al 5% en un matraz volumétrico de 200 mL. La solución preparada se dividió por igual en dos botellas ámbar designadas para administración oral o intravenosa. Se tomaron alícuotas para su análisis en la preparación y después de la dosificación, se transportaron en hielo seco y se almacenaron a <-70°C.

Administración de dosis. Todos los animales se pesaron el día de la administración de la dosis. Las dosis individuales de los animales se basaron en este peso corporal. Se usó un volumen de dosis constante de 5 mL/kg. Se administraron dosis IV a través de una única inyección en bolo en la vena de la cola usando una jeringa de 3 mL unida a una aguja de 26G x 1". La dosis IV se administró a una velocidad de aproximadamente 2 mL/min. Se administraron dosis orales como un único bolo con una aguja de alimentación de 18G x 2" conectada a una jeringa de 3 mL.

Recogida de muestras de sangre. Se tomaron muestras de sangre a las 5, 15, 30 minutos y 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas después de la dosis, con recolección en dos puntos de tiempo para cada animal. Se recogieron muestras de sangre a través de la vena yugular para el punto de tiempo anterior y a través de la vena abdominal en el sacrificio para el punto de tiempo posterior. La sangre se transfirió desde la jeringa de extracción a un tubo de recogida de sangre de 2 mL que contenía K₃-EDTA como anticoagulante y se invirtió para mezclar. La extracción de sangre en la vena abdominal se realizó inmediatamente después de la eutanasia con CO₂.

Preparación de muestra de plasma y condiciones de almacenamiento. El tubo de sangre se colocó en hielo húmedo antes de la centrifugación para la preparación del plasma. Las muestras de sangre entera se centrifugaron a 3,000 rpm a 4°C, durante 10 min. El plasma se pipeteó en tubos y se colocó en hielo seco inicialmente y luego se almacenó a <-70°C.

Espectrometría de masas (MS). La detección por espectrometría de masas se realizó mediante ionización de electroaspersión con aspersión turbo positiva, según las especificaciones enumeradas a continuación.

Instrumento MS: Applied Biosystems 3000

Instrumento HPLC: bomba binaria Agilent serie 1100

Automuestreador: LEAP Technologies CTC-PAL

Condiciones de ionización por electroaspersión (ESI):

Temperatura:	500 °C
Gas nebulizador:	Nitrógeno
Gas CAD:	Nitrógeno
DP:	40
Gas de cortina (CUR):	10

ES 2 688 938 T3

Gas de colisión: 6
 Voltaje de aspersión de iones (IS): 5000
 Potencial de salida (EP): 10
 NEB: 12

Monitor:

Analito: 207.0/149.3 y 207.0/178.4 amu
 IS (Acenocoumerol): 354.2/296.0 y 354.2/163.1 amu

Condiciones de HPLC (en Agilent 1100):

Fase móvil A: ácido fórmico al 0.1% en agua

Fase móvil B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo

5 Columna: Thermo Aquasil C18, 50 x 3 mm

Columna de protección: Thermo Aquasil C18, 10 x 4 mm

Velocidad de flujo: 1.0 mL/min

Volumen de inyección: 50 µL

Gradiente:

Tiempo (min)	% B
0.0	0%
2.0	10%
2.2	90%
4.5	90%
4.6	0%
5.6	0%

10 Muestra de plasma para análisis de LC-MS/MS. Las muestras de plasma individuales se descongelaron a temperatura ambiente y se tomaron alícuotas de 250 µL para el análisis si no se necesitaba una dilución. Las muestras tomadas a los 5 minutos a 1 hora de animales dosificados IV o de 15 minutos a 8 horas a partir de animales dosificados por vía oral requirieron una dilución de 5 a 40 veces para que cayeran en el intervalo lineal del método (1 a 1,000 ng/mL). Para las muestras que requieren dilución, se tomó un volumen apropiado y se mezcló con plasma de rata blanco que contenía el mismo anticoagulante para obtener un volumen total de 250 µL. Los resultados de cuantificación se corrigieron con el factor de dilución. El plasma se preparó para el análisis LC-MS/MS de la siguiente manera:

- Las alícuotas de plasma se agitaron en vórtex durante 30 segundos y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos para precipitar las partículas interferentes.

- Se tomó una alícuota de 100 µL del sobrenadante y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

20 • A la alícuota de plasma de 100 µL, se le añadieron 310 µL de H₂O: ácido fórmico (2:1), 30 µL de acenocoumerol (IS) en H₂O (10 mg/mL) y 100 µL de dietilaminobenzaldehído en solución de H₂O: ácido fórmico 2:1 (10 mg/mL) y se mezclaron bien.

- La mezcla se incubó a continuación en un baño de agua a 80°C, durante 2 h. Después de la incubación, el sobrenadante se transfirió a un vial de HPLC para la cuantificación de LC-MS/MS.

25 Análisis de farmacocinética y biodisponibilidad de metoxiamina (MX). Análisis de farmacocinética. Se determinaron los perfiles farmacocinéticos (PK) y la biodisponibilidad oral de la metoxiamina (MX) en ratas Sprague Dawley machos y hembras después de una dosificación única en bolo de MX mediante administración intravenosa y oral a 20 mg/kg de peso corporal. Treinta ratas (15 machos y 15 hembras) de cada ruta de dosificación se usaron en el análisis farmacocinético. Las muestras de plasma, para fines de caracterización farmacocinética MX, se obtuvieron en los tiempos de muestreo nominal de la predosis, 5, 15, 30 minutos y 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas después de la

administración de la dosis. Para mantener condiciones de salud normales, cada rata tenía un máximo de dos extracciones de sangre en el punto de tiempo predeterminado para generar plasma. La concentración de MX representativa se obtuvo promediando los valores de las tres ratas para cada punto de tiempo dentro del mismo sexo y la ruta de dosificación. Para la cantidad de dosis media, los tiempos de muestreo reales medios se obtuvieron correspondientemente de las tres ratas para cada punto de tiempo nominal dentro del mismo sexo y la ruta de dosificación. La concentración media de MX en plasma, la cantidad de dosis media y el tiempo de muestreo real medio se usaron para el análisis farmacocinético para cada ruta de dosificación.

Se construyeron las curvas de concentración media de MX en plasma frente a tiempo medio de muestra para cada sexo y vía de dosificación usando Microsoft Excel 2000-SR1™ (Figuras 2-3). Las concentraciones en plasma de MX reportadas como límites cuantificables inferiores (BQL) o no detectables, si las hubiera, se consideraron como 0.00 ng/mL con fines de modelado farmacocinético.

El análisis de parámetros farmacocinéticos se realizó usando modelado no compartimental a través de WinNonlin 5.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Los parámetros farmacocinéticos incluyeron la concentración en plasma máxima (C_{max}), el tiempo de concentración en plasma máxima (T_{max}), la semivida de eliminación ($t_{1/2}$), el área bajo la curva de concentración en plasma versus tiempo desde el tiempo cero hasta la última concentración en plasma medible (AUC_{ultima}) y el área bajo la curva de concentración en plasma frente al tiempo desde el tiempo cero extrapolado al infinito ($AUC_{0-\infty}$). Para comparación, la $AUC_{0-\infty}$ se normalizó a una cantidad de dosis de MX total nominal de 5 mg ($AUC_{0-\infty 5}$). Los parámetros farmacocinéticos se abreviaron como se indicó anteriormente.

Análisis de biodisponibilidad. La biodisponibilidad oral absoluta se determinó por la proporción oral a la metoxiamina IV (MX) $AUC_{0-\infty}$ (normalizada a la cantidad de dosis total de 5 mg de MX) con Microsoft Excel 2000-SR1™ usando la siguiente ecuación (MX=TRC102):

$$\text{Biodisponibilidad de TRC102 oral (\%)} = \frac{(\text{Dosis IV}) * (AUC_{0-\infty} \text{ oral})}{(\text{Dosis Oral}) * (AUC_{0-\infty} \text{ IV})} \times 100$$

Los niveles de dosis reales de MX fueron 20.1 mg/kg, 20.1 mg/kg para ratas macho y hembra en el grupo de dosificación IV, y 19.9 mg/kg, 20.0 mg/kg para ratas macho y hembra en grupos de dosificación oral, respectivamente.

Farmacocinética y biodisponibilidad. Los parámetros farmacocinéticos de la metoxiamina (MX) para las ratas Sprague Dawley macho y hembra, después de una dosificación única en bolo de MX a través de administración intravenosa y oral a 20 mg/kg de peso corporal, se describen en la tabla 1.

Tabla 1 Parámetros de farmacocinética de MX en plasma de ratas Sprague Dawley macho y hembra después de una dosificación en bolo único de MX mediante administración intravenosa y oral a 20 mg/kg de peso corporal

	Macho		Hembras	
	IV	Oral	IV	Oral
Cantidad media total de dosis de MX (mg)	5.63	5.56	4.73	4.61
C _{max} (ng/mL)	15510	2205	10965	2959
T _{max} (h)	0.08	1.0	0.08	0.50
t _{1/2} (h)	5.2	4.2	4.6	5.7
AUC _{última} (ng/mL*h)	12518	13596	12971	11643
AUC _{0-∞} (ng/mL*h)	12706	13811	13142	12029
AUC ₀₋₅ (ng/mL*h) ^a	11284	12420	13892	13047
Biodisponibilidad (%)	110		94	
F	1.1		0.94	
^a se obtiene un AUC _{0-∞} 5 (ng/mL*hr) normalizando la AUC _{0-∞} (ng/mL*h) hasta una cantidad de dosis total de 5 mg de MX.				

- Para ratas macho, hubo concentraciones de MX cuantificables en el plasma a lo largo de todo el período de muestreo de 24 horas, tanto para la administración intravenosa como para la oral. La inspección visual de la curva de concentración media en plasma de MX por vía intravenosa masculina frente al tiempo medio sugiere una fase de distribución rápida que se completó aproximadamente 2 horas después de la dosis. La C_{max} por vía intravenosa fue 15,510 ng/mL y se produjo inmediatamente después de la finalización de la administración del bolo. La exposición sistémica a MX, según lo indicado por $AUC_{última}$ y $AUC_{0-\infty}$, fue 12,518 ng/mL*hr y 12,706 ng/mL*hr, respectivamente. La $AUC_{0-\infty}$ ajustado por vía intravenosa a la cantidad de dosis nominal total de 5 mg ($AUC_{0-\infty 5}$) fue de 11,284 ng/mL*h.
- Para las ratas macho en la ruta de dosificación oral, la absorción de MX fue rápida con una T_{max} de 1.0 h. La C_{max} de 2,205 ng/mL fue considerablemente menor que la de la vía de dosificación intravenosa. La exposición sistémica a MX, según lo indicado por $AUC_{última}$ oral y $AUC_{0-\infty}$, fue de 13,596 ng/mL*h y 13,811 ng/mL*h, respectivamente. La $AUC_{0-\infty}$ oral ajustada a la cantidad de dosis nominal total de 5 mg ($AUC_{0-\infty 5}$) fue de 12,420 ng/mL*h. Las semividas de eliminación fueron cortas y similares entre las dos vías de dosificación (IV: 5.2 h, Oral: 4.2 h). La biodisponibilidad absoluta calculada mediante administración oral en ratas macho Sprague Dawley fue del 110 por ciento.
- Para las ratas hembras, hubo concentraciones en plasma de MX cuantificables, a lo largo de todo el período de muestreo de 24 horas, para las rutas de dosificación tanto intravenosa como oral. La inspección visual de la curva de concentración en plasma media de MX por vía intravenosa de hembras frente al tiempo medio sugiere una fase de distribución rápida que aparece, como las ratas macho, completa aproximadamente a las 2 horas después de la dosis. La vía intravenosa C_{max} fue de 10,965 ng/mL y se produjo inmediatamente después de la finalización de la administración del bolo. La exposición sistémica a MX, según lo indicado por $AUC_{última}$ y $AUC_{0-\infty}$, fue de 12,971 ng/mL*h y 13,142 ng/mL*h, respectivamente. El $AUC_{0-\infty}$ por vía intravenosa ajustado a la cantidad de dosis nominal total de 5 mg ($AUC_{0-\infty 5}$) fue de 13,892 ng/mL*h.
- Para las ratas hembras en la ruta de dosificación oral, la absorción de MX fue rápida con un T_{max} de 0.5 h. La C_{max} de 2959 ng/mL fue considerablemente menor que la vía intravenosa, pero similar a la de las ratas macho en la ruta de dosificación oral. La exposición sistémica a MX, según lo indicado por $AUC_{última}$ oral y $AUC_{0-\infty}$, fue de 11,643 ng/mL*h y 12,029 ng/mL*h respectivamente. La $AUC_{0-\infty}$ oral ajustada a la cantidad de dosis nominal total de 5 mg ($AUC_{0-\infty 5}$) fue de 13,047 ng/mL*h. Las semividas de eliminación fueron rápidas, similares entre las dos rutas de dosificación (IV: 4.6 h, Oral: 5.7 h), y comparables a las de las ratas macho. La biodisponibilidad absoluta calculada en ratas Sprague Dawley hembras fue del 94 por ciento.
- Las ratas dosificadas con 20 mg/kg de peso corporal (BW) administradas por vía intravenosa u oral no mostraron signos clínicos de toxicidad.
- En ratas Sprague Dawley machos y hembras, administrados con MX a 20 mg/kg peso corporal mediante una única administración oral en bolo es rápidamente (T_{max} 0.5-1.0 h) y completamente absorbido con una biodisponibilidad absoluta sistémica de aproximadamente 100 por ciento. Aunque la C_{max} de MX oral es significativamente menor que la C_{max} IV, la exposición sistémica a MX, según lo indicado por $AUC_{última}$ y $AUC_{0-\infty}$, parece ser similar entre las dos rutas de dosificación. Además, los niveles en suero excedieron la C_{max} diana asociada con la actividad en modelos de cáncer de ratón humano (50 ng/mL) después de la dosificación oral en puntos de tiempo que permitirían el uso de un programa de dosificación oral único o dos veces al día.
- Estos datos son significativos porque indican que la metoxiamina es completamente biodisponible por vía oral y tiene una vida media de 4-6 horas que permite alcanzar concentraciones mínimamente eficaces con dosificación única o dos veces al día. Ambos hallazgos son inesperados. La mayoría de los agentes anticancerígenos no son biodisponibles por vía oral en cantidades suficientes para permitir la administración oral. Se debe observar que los intentos de administrar otros fármacos anticancerígenos particulares por vía oral han dado como resultado una biodisponibilidad mucho más baja que la obtenida en este documento. Véase, por ejemplo, bleomicina, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, paclitaxel, raltitrexed (un antifolato), topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, todos los cuales tienen menos del 50% de biodisponibilidad (Chu E and DeVita VT. Physicians' Cancer Chemotherapy Drug manual 2002. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 2002). Segundo, la vida media demostrada es más larga de lo esperado para una molécula pequeña con masa molecular <100 dalton que reacciona fácilmente con aldehídos que pueden estar presentes en el plasma y la vida media en plasma más larga de lo esperado permite los niveles sostenidos del fármaco (por encima de la concentración eficaz mínima) con un programa de dosificación oral único o dos veces al día. La biodisponibilidad completa y la semivida de 4 a 6 horas pueden permitir la administración oral mediante un programa de dosificación único o dos veces al día que puede ser conveniente para pacientes con cáncer.
- A partir de lo anterior, será obvio para los expertos en el arte que se pueden realizar diversas modificaciones en los métodos y composiciones descritos anteriormente. Las realizaciones y ejemplos actuales, por lo tanto, se deben considerar en todos los aspectos como ilustrativos y no restrictivos.
- Por lo tanto, se entenderá que no hay intención en el uso de tales términos y expresiones para excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la divulgación.

Todas las patentes, publicaciones, artículos científicos, sitios web y otros documentos y materiales mencionados o de referenciados en este documento son indicativos de los niveles de habilidad de los expertos en el arte a la que pertenece la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una primera formulación que comprende pemetrexed y una segunda formulación que comprende metoxiamina, para uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con cáncer seleccionado entre cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer de endometrio, cáncer gástrico, cáncer de hígado y cáncer de mama, en la que la metoxiamina se administra al paciente en una cantidad suficiente para potenciar la actividad de pemetrexed.
2. La primera formulación y la segunda formulación de la reivindicación 1 para uso según la reivindicación 1, en la que dicho cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal o cáncer de mama.
3. La primera formulación y la segunda formulación de las reivindicaciones 1-2 para uso según la reivindicación 1, en la que dicho paciente se selecciona por tener un cáncer al menos parcialmente resistente al tratamiento con pemetrexed solo, y en el que dicha segunda formulación que comprende metoxiamina se formula en una cantidad eficaz para potenciar la actividad de pemetrexed y superar dicha resistencia cuando se administra a un paciente.
4. La primera formulación y la segunda formulación de las reivindicaciones 1-3 para uso según la reivindicación 1, en la que dicho pemetrexed se formula para administración intravenosa u oral y dicha metoxiamina se formula para administración oral.
5. La primera formulación y la segunda formulación de las reivindicaciones 1-3 para uso según la reivindicación 1, en la que dicha metoxiamina se formula para administración oral.
6. La primera formulación y la segunda formulación de las reivindicaciones 1-3 para uso según la reivindicación 1, en la que dicha metoxiamina y dicho pemetrexed se administran secuencialmente.
7. La primera formulación y la segunda formulación de las reivindicaciones 1-3 para uso según la reivindicación 1, en la que dicha metoxiamina se administra antes del pemetrexed.
8. La primera formulación y la segunda formulación de las reivindicaciones 1-3 para uso según la reivindicación 1, en la que dicho pemetrexed se administra antes de la metoxiamina.
9. La primera formulación y la segunda formulación de las reivindicaciones 1-3 para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha metoxiamina se formula por vía oral en una cantidad que es suficiente para sensibilizar las células cancerosas sin causar una sensibilización indebida a las células normales.
10. La primera formulación y la segunda formulación de las reivindicaciones 1-3 para uso según la reivindicación 1, en la que dicha metoxiamina y dicho pemetrexed logran un efecto sinérgico cuando se administran a un paciente.
11. La primera formulación y la segunda formulación de las reivindicaciones 1-3 para uso según la reivindicación 1, en la que dicha metoxiamina se administra por vía oral una o dos veces al día.
12. La primera formulación y la segunda formulación de la reivindicación 3 para uso según la reivindicación 1, en la que la proporción de metoxiamina a pemetrexed es una proporción seleccionada entre aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10000; entre aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:100; entre aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:500; entre aproximadamente 1:450 a aproximadamente 1:10000; entre aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:50; entre aproximadamente 1:5 y aproximadamente 1:500; entre aproximadamente 1:15 y aproximadamente 1:40; y entre aproximadamente 1:20 y aproximadamente 1:30.
13. La primera formulación y la segunda formulación de la reivindicación 12 para uso según la reivindicación 1, en donde la proporción de metoxiamina a pemetrexed está entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:100.
14. La primera formulación y la segunda formulación de la reivindicación 3 para uso según la reivindicación 1, en la que dicho pemetrexed se formula en un intervalo de dosificación seleccionado entre: desde aproximadamente 25 mg/m² a aproximadamente 200 mg/m² de superficie corporal; desde aproximadamente 150 mg/m² a aproximadamente 500 mg/m² de superficie corporal; desde aproximadamente 400 mg/m² a aproximadamente 1000 mg/m² de superficie corporal; desde aproximadamente 900 mg/m² a aproximadamente 5000 mg/m² de superficie corporal; desde aproximadamente 200 mg/m² a aproximadamente 1000 mg/m² de superficie corporal; y desde aproximadamente 500 mg/m² a aproximadamente 600 mg/m² de superficie corporal.
15. La primera formulación y la segunda formulación de las reivindicaciones 12-14 para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho pemetrexed en dicha primera formulación es sal heptahidrato de pemetrexed disódico.

FIG. 1A

Ensayo de Comet alcalino

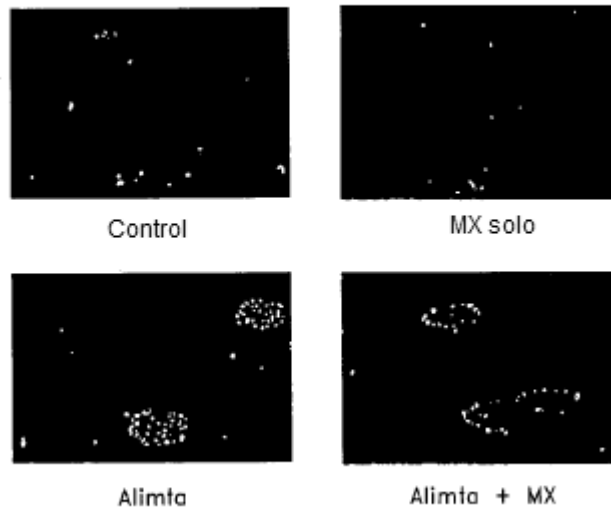
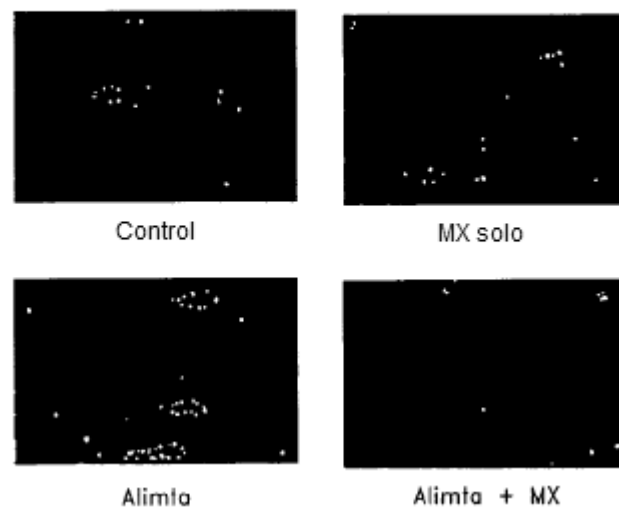


FIG. 1B

Ensayo de Comet neutro:



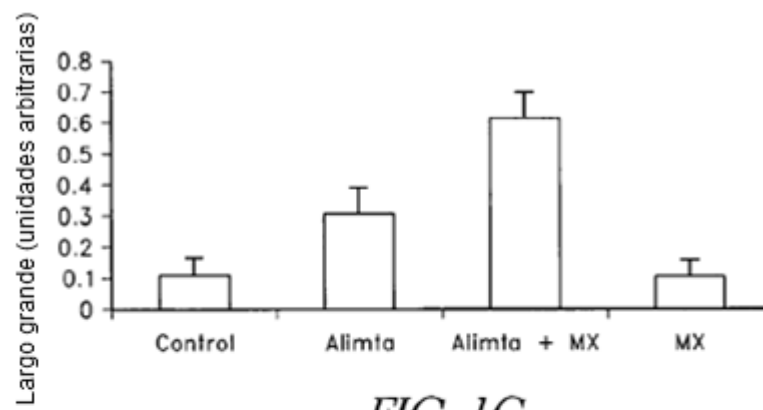


FIG. 1C

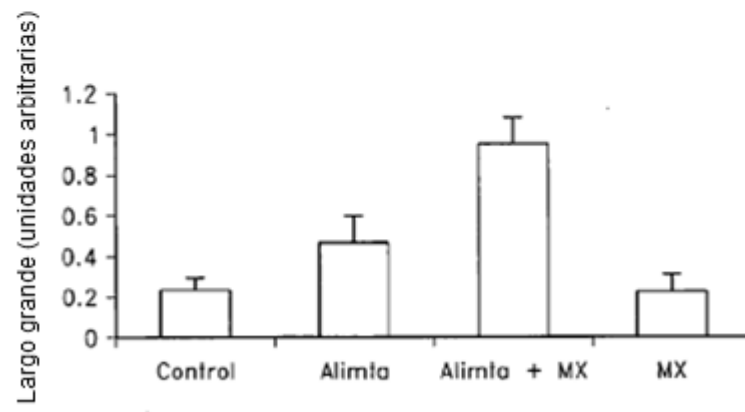


FIG. 1D

FIG. 2 Concentración media de MX en plasma de ratas Sprague-Dawley macho en diferentes puntos de tiempo después de una dosificación en bolo única de MX mediante administración intravenosa y oral a 20 mg/kg de peso corporal.

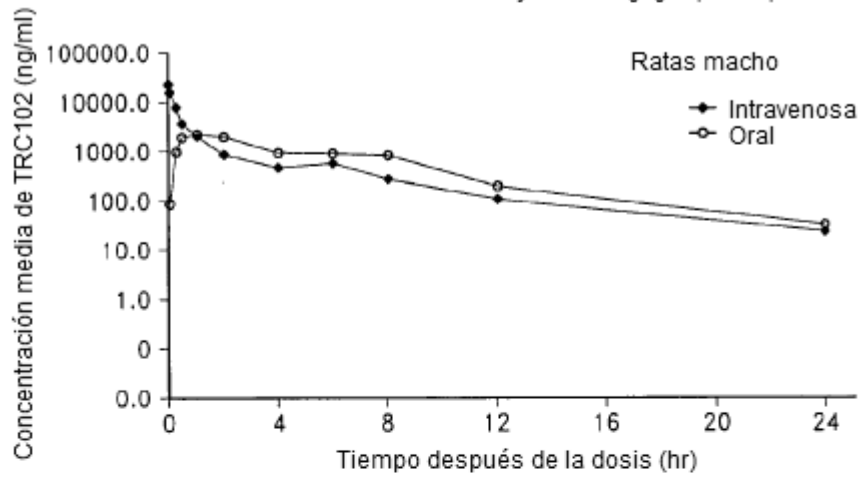


FIG. 3 Concentración media de MX en plasma de ratas Sprague-Dawley hembras en diferentes puntos de tiempo después de una dosificación en bolo única de MX mediante administración intravenosa y oral a 20 mg/kg de peso corporal.

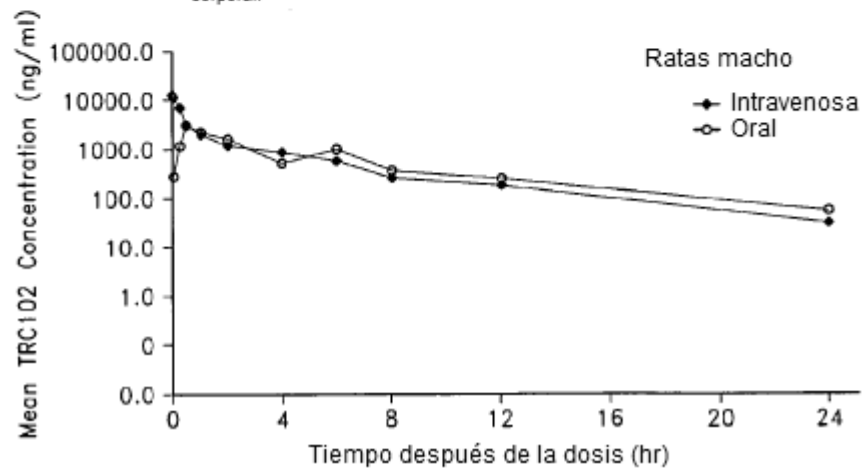
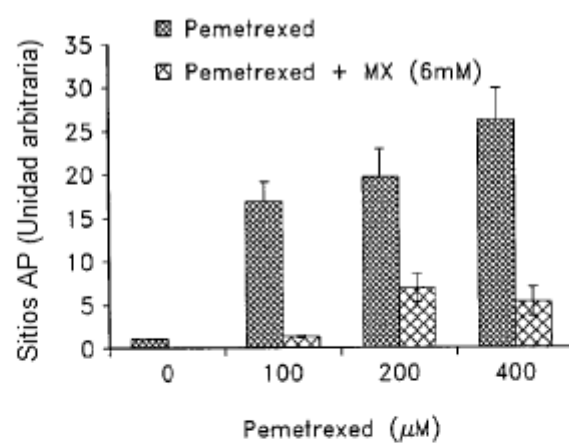
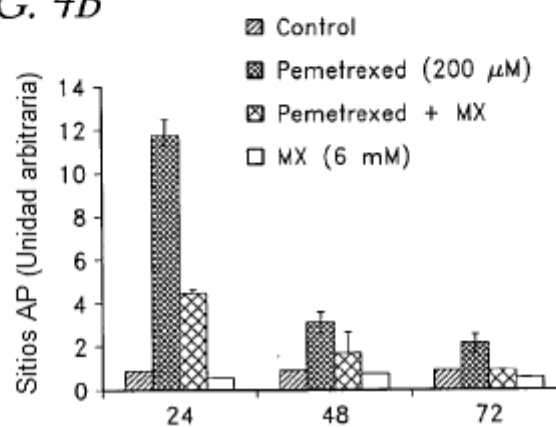


FIG. 4A*FIG. 4B*

Sitios AP unidos a MX son refractarios para la reparación por endonucleasa de AP

FIG. 5A

Diagrama esquemático indica la preparación de sustratos de oligonucleótidos de posición específica que contienen un sitio AP o un sitio AP unido a MX.

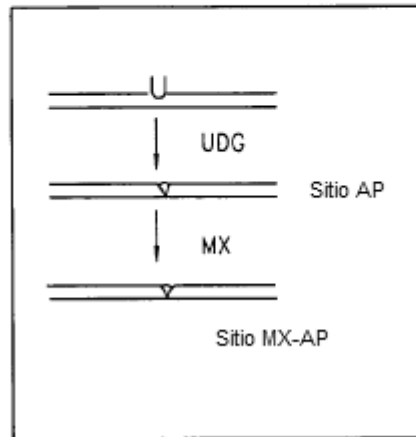


FIG. 5B

APE tiene reactividad a la escisión del sitio AP pero no al sitio MX-AP, indicando que el sitio MX-AP es refractario a la reparación por APE.

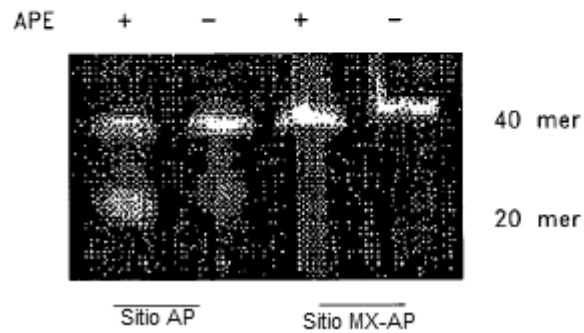
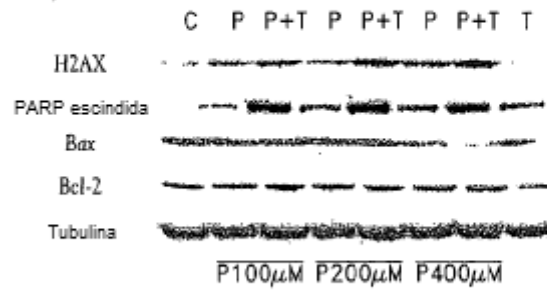


FIG. 6

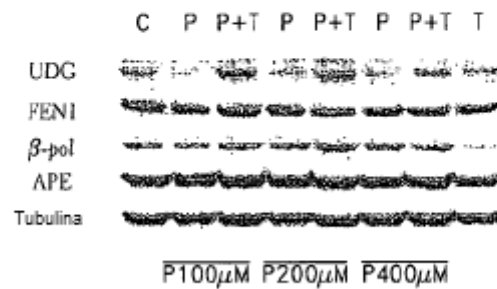
La combinación de Premetrexed y TRC2 mejora las rupturas de cadena doble de ADN y apoptosis que es independiente de la ruta Bel-2



Las células se trataron con MX a 6mM y se recogieron a 24 h.

FIG. 7

Los niveles de proteína BER en células H460 antes y después de tratarse con Premetrexed o la Combinación



Las células se trataron con MX a 6mM y se recogieron a 24 h.

FIG. 8A

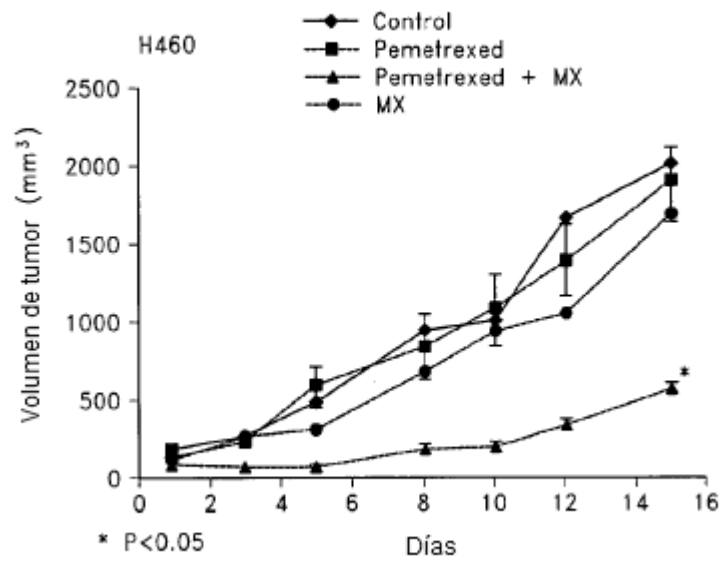


FIG. 8B

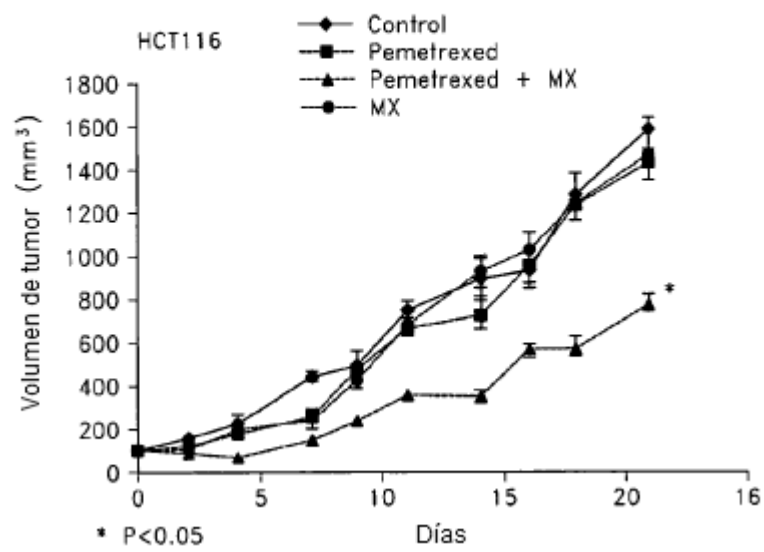


FIG. 8C

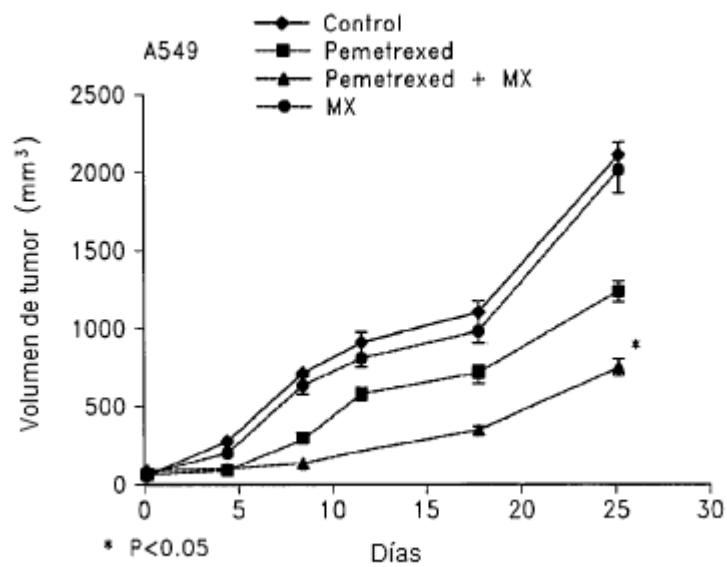


FIG. 8D

