

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 739**

51 Int. Cl.:

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/513 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/282 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2009 PCT/EP2009/058413**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2010 WO10009967**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2009 E 09780134 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2344156**

54 Título: **Combinación terapéutica que comprende un inhibidor aurora cinasa y un agente antineoplásico**

30 Prioridad:
24.07.2008 US 83232 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2019

73 Titular/es:
**NERVIANO MEDICAL SCIENCES S.R.L. (100.0%)
11 Viale Pasteur, 10 P.O. Box 11
20014 Nerviano (MI), IT**

72 Inventor/es:
**PESENTI, ENRICO;
D'INCALCI, MAURIZIO;
BALLINARI, DARIO y
MOLL, JUERGEN**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 703 739 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

Combinación terapéutica que comprende un inhibidor aurora cinasa y un agente antineoplásico

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 La presente invención se refiere en general al campo del tratamiento del cáncer y, más particularmente, proporciona una composición antitumoral que comprende un inhibidor aurora cinasa y un derivado de platino y/o un agente antimetabolito y/o un inhibidor de topoisomerasa I y/o un agente antimicrotúbulo con un efecto antineoplásico sinérgico o aditivo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 La disfunción de las proteína cinasas (PKs, del inglés protein kinases) es el rasgo distintivo de numerosas enfermedades.

- 15 Una gran parte de los oncogenes y protooncogenes implicados en los cánceres humanos codifican para PKs. Las actividades mejoradas de las PKs también están involucradas en muchas enfermedades no malignas, como la hiperplasia benigna de próstata, la adenomatosis familiar, la poliposis, la neurofibromatosis, la psoriasis, la proliferación de células lisas vasculares asociada con aterosclerosis, la fibrosis pulmonar, la artritis, la glomerulonefritis y la estenosis y reestenosis postquirúrgica.

Las PKs también están implicadas en estados inflamatorios y en la multiplicación de virus y parásitos. Las PKs pueden jugar también un papel importante en la patogénesis y el desarrollo de trastornos neurodegenerativos.

Como referencia general sobre la disfunción o desregulación de las PKs, véase por ejemplo, *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999, 3, 459 – 465.

- 20 Entre las diversas proteína cinasas conocidas en la técnica que están implicadas en el crecimiento de las células cancerosas están las Aurora cinasas, en particular Aurora-2.

Se ha encontrado que Aurora-2 está sobreexpresada en una cantidad de diferentes tipos de tumores. Su locus génico mapea en 20q13, una región cromosómica amplificada frecuentemente en muchos cánceres, incluyendo los cánceres de mama [*Cancer Res.* 1999, 59(9), 2041-4] y colon.

- 25 La amplificación de 20q13 se correlaciona con un mal pronóstico en los pacientes con cáncer de mama de ganglios negativos y el aumento de la expresión de Aurora-2 es indicativo de un mal pronóstico y disminución del tiempo de supervivencia en pacientes de cáncer de vejiga [*J. Natl. Cancer Inst.*, 2002, 94(17), 1320-9]. Como referencia general sobre el papel de Aurora-2 en la función centrosoma anormal en el cáncer, véase también *Molecular Cancer Therapeutics*, 2003, 2, 589 - 595.

- 30 Varios compuestos heterocíclicos son conocidos en la técnica como inhibidores de proteína cinasa. Entre ellos, 3-carboxamido-pirazoles y 3-ureido-pirazoles y derivados de los mismos, se han revelado como inhibidores de proteína cinasa en las solicitudes de patente internacional WO01/12189, WO12188, WO02/48114 y WO02/70515.

Los compuestos bicíclicos fundidos que comprenden fracciones pirazol y que poseen actividad inhibidora de cinasa se han dado a conocer también en WO00/69846, WO02/12242, WO03/028720 y WO03/97610.

- 35 Los derivados de tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol específicos se han revelado como potentes inhibidores ATP-competitivos de Aurora cinasas (Fancelli, D., y col.: *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005, vol.48, nº 8, pág. 3080-3084. PCT/WO 2005005427).

- 40 El documento WO2007/129062 revela una combinación que comprende un compuesto pirazol que inhibe o modula la actividad de las cinasas dependientes de ciclina (CDK) y/o glicógeno sintasa cinasa (p. ej. GSK-3) y un agente anticancerígeno (incluyendo un derivado de tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol de la presente invención).

El documento WO2009/026075 describe una combinación de antagonistas de la vía de señalización erizo con un inhibidor de BCR-ABL (incluyendo un derivado de tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol de la presente invención), posiblemente comprendiendo también uno o varios agentes quimioterapéuticos o inmunoterapéuticos.

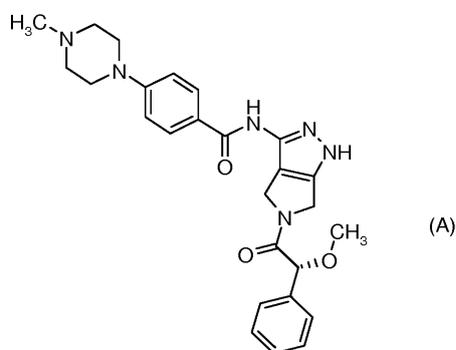
- 45 EL documento WO2009/091476 proporciona una combinación que comprende un inhibidor de BCR-ABL ATP-competitivo (incluyendo un derivado de tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol de la presente invención) y un inhibidor de BCR-ABL no ATP competitivo, posiblemente comprendiendo también uno o varios agentes quimioterapéuticos o inmunoterapéuticos.

5 Sorprendentemente, se ha encontrado que el efecto antineoplásico, es decir, especialmente el retraso de la progresión o el tratamiento de una enfermedad proliferativa, en particular el tratamiento de un tumor que es refractario a otros quimioterapéuticos conocidos como agentes antineoplásicos, de los derivados de tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol de arriba aumenta enormemente cuando se administran en combinación con ciertos agentes antineoplásicos. En particular, el efecto antineoplásico de dicha combinación es mayor que los efectos que se pueden conseguir con cualquier tipo de componente de la combinación solo, es decir, es mayor que los efectos de una monoterapia usando sólo uno de los componentes de la combinación.

10 De este modo, la presente invención proporciona nuevas combinaciones de un derivado de tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol con agentes farmacéuticos conocidos que son particularmente apropiados para el tratamiento de trastornos proliferativos, especialmente cáncer. Más específicamente, las combinaciones de la presente invención son muy útiles en terapia como agentes antitumorales y carecen, en términos tanto de toxicidad como de efectos secundarios, de los inconvenientes asociados a los fármacos antitumorales disponibles actualmente.

RESUMEN DE LA INVENCION

15 La presente invención proporciona, en un primer aspecto, una combinación terapéutica consistente en (a) un Compuesto 1 de fórmula (A):



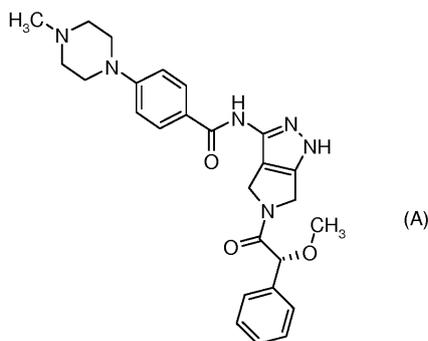
20 y (b) uno o varios agentes antineoplásicos seleccionados del grupo consistente en cisplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, gemcitabina, citosina arabinósido (Ara-C), SN-38, irinotecan y docetaxel, en la que los ingredientes activos de la combinación están presentes en cada caso en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable o cualquier hidrato de las mismas.

La presente invención proporciona también una combinación terapéutica como se describe arriba para el uso en un método de tratamiento o de retraso de la progresión de un trastorno proliferativo, en el que dicho método comprende una administración simultánea, secuencial o separada a un paciente necesitado del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha combinación.

25 La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una combinación como se describe arriba la cual se mezcla adicionalmente con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 La presente invención proporciona, en una primera realización, una combinación terapéutica consistente en (a) un Compuesto 1 de fórmula (A):



y (b) uno o varios agentes antineoplásicos seleccionados del grupo consistente en cisplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, gemcitabina, citosina arabinósido (Ara-C), SN-38, irinotecan y docetaxel, en la que los ingredientes activos de la combinación están presentes en cada caso en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable o cualquier hidrato de las mismas.

5 Otra realización se refiere a la combinación de acuerdo con la invención para el uso en un método de tratamiento o de retraso de la progresión de un trastorno proliferativo, en el que dicho método comprende una administración simultánea, secuencial o separada a un paciente necesitado del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha combinación.

10 En otra realización más, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación terapéutica mezclada con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El compuesto 1 de fórmula(A) tiene el nombre químico N-{5-[(2R)-2-metoxi-2-feniletanoil]-1,4,5,6-tetrahidropirrol[3,4-c]pirazol-3-il}-4-(4-metilpiperazin-1-il)benzamida. Se puede preparar como se describe en el documento WO2005/005427 (incorporado aquí por referencia), está dotado de actividad inhibidora de proteína cinasa y por tanto es útil en la terapia como agente antitumoral.

15 Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto 1 de fórmula (A) incluyen la sales de adición de ácido con ácidos inorgánicos u orgánicos, por ejemplo, ácido nítrico, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, perclórico, fosfórico, acético, trifluoroacético, propiónico, glicólico, láctico, oxálico, malónico, málico, maleico, mesilato, tartárico, cítrico, benzoico, cinámico, mandélico, metanosulfónico, isetiónico y salicílico y similares.

20 El oxaliplatino se puede administrar, p. ej. en la forma en que es comercializado, p. ej. bajo la marca comercial ELOXATIN®.

La gemcitabina se puede administrar, p. ej. en la forma en que es comercializada, p. ej. bajo la marca comercial GEMZAR®.

El irinotecan se puede administrar, p. ej. en la forma en que es comercializado, p. ej. bajo la marca comercial CAMPTOSAR®. SN-38 es el metabolito activo de irinotecan, obtenido por hidrólisis *in vivo* de irinotecan.

25 El docetaxel se puede administrar, p. ej. en la forma en que es comercializado, p. ej. bajo la marca comercial TAXOTERE®.

En la presente invención, cada ingrediente activo de la combinación se proporciona en una cantidad eficaz para producir un efecto antineoplásico sinérgico.

30 Mediante el término “un efecto antineoplásico sinérgico” tal y como se usa aquí se indica la inhibición del crecimiento del tumor, preferentemente la regresión completa del tumor, mediante la administración de una cantidad eficaz de la combinación del compuesto 1 de fórmula (A) como se define arriba y cisplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, gemcitabina, citosina arabinósido (Ara-C), SN-38, irinotecan o docetaxel a mamíferos, incluyendo humanos.

35 La combinación de componentes (a) y (b) como se define arriba se puede dosificar independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de la combinación de componentes (a) y (b), es decir, simultáneamente o en momentos diferentes. Entonces, los componentes pueden, p. ej. administrarse simultáneamente o escalonados cronológicamente, es decir en momentos diferentes y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier componente.

40 Más preferentemente, los intervalos de tiempo se escogen de manera que el efecto sobre la enfermedad tratada en el uso combinado de las partes es mayor que el efecto que se obtendría mediante el uso de solo uno cualquiera de los componentes (a) y (b) de la combinación. La relación de las cantidades totales del componente (a) de la combinación respecto al componente (b) de la combinación que se deben administrar en la preparación combinada pueden variar, p. ej. para poder hacer frente a las necesidades de una subpoblación de pacientes que deben ser tratados o las necesidades de un paciente individual cuyas necesidades diferentes pueden ser debidas a la enfermedad en particular, edad, sexo, peso corporal, etc. de los pacientes. Preferentemente, hay al menos un efecto beneficioso, p. ej. una mejora mutua del efecto de los socios (a) y (b) de la combinación, en particular un sinergismo, p. ej. un efecto más que aditivo, efectos adicionales ventajosos, menos efectos secundarios, menor toxicidad, o un efecto terapéutico combinado en una forma de dosificación no efectiva de uno o ambos componentes (a) y (b) de los componentes (a) y (b) de la combinación, y muy preferentemente un fuerte sinergismo de los componentes (a) y (b) de la combinación.

50 Mediante el término “administrado” o “administrando” como se usa aquí se indica la administración oral y/o parenteral. Mediante “parenteral” se indica la administración intravenosa, subcutánea e intramuscular.

En el método sujeto de la invención, para la administración del compuesto de fórmula (A), el curso de la terapia empleado generalmente está en el intervalo desde 100 mg/m²/día hasta 1500 mg/m²/día de área superficial del cuerpo durante hasta 21 días consecutivos. Más preferentemente, el curso de terapia empleado va desde unos 150 mg/m²/día hasta unos 350 mg/m²/día de área superficial del cuerpo durante hasta 21 días consecutivos.

- 5 En un régimen particularmente preferido, el compuesto de fórmula (A) se administra en una dosis de 190 o 250 mg/m²/día de área superficial del cuerpo durante tres horas de infusión el día 1 y 8 de un ciclo de tres semanas. Otros posibles programas terapéuticos se revelan, por ejemplo, en el documento WO2008/052931 publicado el 8 de mayo de 2008 (incorporado aquí por referencia).

- 10 El compuesto de fórmula (A) se puede administrar en una variedad de formas de dosificación, p. ej. oralmente, en forma de comprimidos, cápsulas, comprimidos recubiertos o grageas, soluciones o suspensiones líquidas; rectalmente en forma de supositorios; parenteralmente, p. ej., intramuscularmente, o mediante inyección o infusión intravenosa y/o intratecal y/o intraespinal.

- 15 En el método sujeto de la invención, para la administración de oxaliplatino, el curso de la terapia empleado generalmente está en el intervalo desde 10 mg/m²/día hasta 100 mg/m²/día cada 2-3 semanas. Más preferentemente, el curso de terapia empleado generalmente va desde unos 30 mg/m²/día hasta 85 mg/m²/día el día 1, una vez cada 2 semanas.

- 20 Para la administración de gemcitabina, el curso de la terapia empleado generalmente está en el intervalo desde 200 mg/m²/día hasta 2000 mg/m²/día como administración semanal. Más preferentemente, el curso de terapia empleado generalmente va desde unos 800 mg/m²/día hasta 1250 mg/m²/día los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días o en los días 1, 8 y 15 de un ciclo de 28 días.

Para la administración de irinotecan, el curso de la terapia empleado generalmente está en el intervalo desde 50 mg/m² hasta 350 mg/m² diariamente los días 1, 8, 15 y 22 de un ciclo de 6 semanas. Más preferentemente, el curso de terapia empleado generalmente va desde unos 125 mg/m² hasta 180 mg/m² diariamente los días 1, 8, 15 y 22 de un ciclo de 6 semanas.

- 25 Para la administración de docetaxel, el curso de la terapia empleado generalmente está en el intervalo desde 50 mg/m²/día hasta 100 mg/m²/día cada tres semanas o desde 20 mg/m²/día hasta 100 mg/m²/día semanalmente. Preferentemente, la administración ocurre a lo largo de 3 horas de infusión los días 1 y 8 de un ciclo de tres semanas.

- 30 La terapia antineoplásica de la presente invención es apropiada en particular para el tratamiento de todas las formas de cáncer incluyendo, pero sin limitarse a: carcinoma tal como vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, esófago, vesícula biliar, ovario, páncreas, estómago, cérvix, tiroides, próstata, y piel, incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfático, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, linfoma de células pilosas y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, incluyendo las leucemias mielogénicas aguda y crónica, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica; mieloma múltiple; tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentoso, queratocantoma, cáncer folicular de tiroides y sarcoma de Kaposi.

- 40 Como se indica arriba, el efecto de la combinación de la invención aumenta significativamente sin un incremento de la toxicidad en paralelo. En otras palabras, la terapia combinada de la presente invención mejora los efectos antitumorales del componente (a) y/o del componente (b) de la combinación de la invención y rinde así el tratamiento para tumores más eficaz y menos tóxico.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son útiles en la terapia contra el cáncer.

- 45 La presente invención revela además un envase comercial que comprende, en un medio contenedor apropiado, (a) un compuesto de fórmula (A) como se define arriba, y (b) uno o varios agentes antineoplásicos seleccionados del grupo consistente en cisplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, gemcitabina, citosina arabinósido (Ara-C), SN-38, irinotecan o docetaxel en el que los ingredientes activos están presentes en cada caso en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable o cualquier hidrato de las mismas, junto con instrucciones para el uso
50 simultáneo, separado o secuencial de las mismas.

En un envase de acuerdo con la invención cada uno de los componentes (a) y (b) están presentes dentro de un medio contenedor individual o dentro de medios contenedores distintos.

Debido al papel principal de las proteínas aurora cinasa en la regulación de la mitosis y la proliferación celular, las combinaciones de la presente invención también son útiles en el tratamiento de una variedad de trastornos proliferativos celulares tales como, por ejemplo, la hiperplasia benigna de próstata, la adenomatosis familiar, la poliposis, la neurofibromatosis, la psoriasis, la proliferación de células lisas vasculares asociada con aterosclerosis, la fibrosis pulmonar, la artritis, la glomerulonefritis y la estenosis y reestenosis post-quirúrgica.

Las combinaciones de esta invención, como moduladores de la apoptosis, también pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer, las infecciones víricas, la prevención del desarrollo del SIDA en individuos infectados con VIH, trastornos autoinmunes y trastornos neurodegenerativos.

Las actividades de la combinación de la presente invención se muestran por ejemplo mediante los ensayos *in vitro* e *in vivo* siguientes, los cuales pretenden ilustrar pero no limitar la presente invención.

Ejemplo 1: Materiales y métodos para el ensayo de actividad citotóxica *in vitro*

Se sembraron líneas celulares de crecimiento exponencial de carcinoma ovárico humano (A2780) y/o carcinoma de colon humano (HCT-116) y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Los fármacos se añadieron al cultivo experimental, y las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C durante 72 horas en la oscuridad. Dosis escalares del Compuesto 1 de fórmula (A) como se define arriba y el agente antineoplásico se añadieron al medio 24 horas después de la siembra. Se ensayaron uno o los dos programas de tratamiento siguiente: administración simultánea (ambos fármacos administrados a las células durante 72 horas) y administración secuencial (Compuesto 1 administrado 24 horas después del otro agente). Las soluciones de fármaco se prepararon inmediatamente antes del uso. Al final del tratamiento, la proliferación celular se determinó mediante un sistema de seguimiento de adenosin trifosfato intracelular (CellTiterGlo-Promega) usando Envision (PerkinElmer) como lector. La actividad inhibidora se evaluó comparando los datos tratados respecto a los datos control usando el programa Assay Explorer (MDL). La dosis que inhibe el 50% del crecimiento celular se calculó usando la curva de interpolación sigmoidea. Los índices de combinación (C.I.) se calcularon usando un programa de ordenador para el análisis del efecto de múltiples fármacos basado en la ecuación de Chou-Talalay (Adv Enzyme Regul 1984;22:27-55) para fármacos no exclusivos mutuamente, donde un C.I. < 1 indica un efecto más que aditivo (C.I. > 3 indica fuerte antagonismo; 1,3<C.I.<3, antagonismo; 0,8<C.I.<1,3, aditividad; 0,3<C.I.<0,8, sinergismo; C.I.<0,3, fuerte sinergismo).

Ejemplo 2: Actividad citotóxica *in vitro* de la combinación con cisplatino

Los resultados mostrados en la Tabla 1 indican que tanto en las líneas celulares de carcinoma ovárico humano A2780 como en el carcinoma de colon humano HCT-116 la administración del Compuesto 1 en combinación con cisplatino tuvo como resultado un efecto antitumoral sinérgico.

Tabla 1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto citotóxico del Compuesto 1 en combinación con cisplatino					
Línea celular	Fármaco		Programa	C.I.	Efecto de combinación
	Compuesto 1 μM	cisplatino μM			
A2780	0,5	10,000	Simultáneo	0,69	Sinergismo
	0,25	10,000		0,73	Sinergismo
	0,5	10,000	Secuencial	0,63	Sinergismo
	0,25	10,000		0,74	Sinergismo
HCT-116	0,5	10,000	Secuencial	0,73	Sinergismo

Ejemplo 3: Actividad citotóxica *in vitro* de la combinación con oxaliplatino

Los resultados mostrados en la Tabla 2 indican que en la línea celular de carcinoma de colon humano HCT-116 la administración del Compuesto 1 en combinación con oxaliplatino tuvo como resultado un efecto antitumoral sinérgico.

Tabla 2. Evaluación *in vitro* del efecto citotóxico del Compuesto 1 en combinación con oxaliplatino

Línea celular	Fármaco		Programa	C.I.	Efecto de combinación		
HCT-116	Compuesto 1 μM	oxaliplatino μM	Secuencial				
	0,5	20,000				0,58	Sinergismo
	0,25	20,000				0,70	Sinergismo
	0,12	20,000				0,79	Sinergismo

Ejemplo 4: Actividad citotóxica *in vitro* de la combinación con 5-FU

Los resultados mostrados en la Tabla 3 indican que en la línea celular de carcinoma de colon humano HCT-116 la administración del Compuesto 1 en combinación con 5-FU tuvo como resultado un efecto antitumoral sinérgico.

Tabla 3. Evaluación *in vitro* del efecto citotóxico del Compuesto 1 en combinación con 5-FU

Línea celular	Fármaco		Programa	C.I.	Efecto de combinación		
HCT-116	Compuesto 1 μM	5-FU nM	Secuencial				
	0,5	12,5				0,77	Sinergismo
	0,25	3,1				0,76	Sinergismo

5

Ejemplo 5: Actividad citotóxica *in vitro* de la combinación con SN38

Los resultados mostrados en la Tabla 4 indican que en la línea celular de carcinoma ovárico humano A2780 la administración del Compuesto 1 en combinación con el inhibidor de topoisomerasa I SN38 tuvo como resultado un efecto antitumoral sinérgico.

10

Tabla 4. Evaluación *in vitro* del efecto citotóxico del Compuesto 1 en combinación con SN-38

Línea celular	Fármaco		Programa	C.I.	Efecto de combinación		
A2780	Compuesto 1 μM	SN38 nM	Simultáneo				
	0,5	0,012				0,78	Sinergismo
	0,25	0,012				0,80	Sinergismo
	0,5	0,012				0,58	Sinergismo
	0,25	0,012				0,56	Sinergismo

Ejemplo 6: Actividad citotóxica *in vitro* de la combinación con AraC

Los resultados mostrados en la Tabla 5 indican que en la línea celular de carcinoma de colon humano HCT-116 la administración del Compuesto 1 en combinación con AraC tuvo como resultado un efecto antitumoral sinérgico.

15

Tabla 5. Evaluación *in vitro* del efecto citotóxico del Compuesto 1 en combinación con AraC

Línea celular	Fármaco		Programa	C.I.	Efecto de combinación
HCT-116	Compuesto 1 μM	AraC nM			
	0,5	0,25	Secuencial	0,46	Sinergismo
	0,25	0,25		0,40	Sinergismo

Ejemplo 7: Eficacia antitumoral *in vivo* en combinación con gemcitabina

5 Ratones macho Balb, Nu/Nu, de Harlan (Italia), se mantuvieron en cajas con cubierta de papel de filtro, comida y lecho esterilizados y agua acidificada. Fragmentos de carcinoma pancreático humano BX-PC3 se implantaron subcutáneamente en ratones atímicos. Este modelo tumoral se seleccionó porque se demostró previamente que es sensible a la gemcitabina y también porque la gemcitabina es el tratamiento estándar para el cáncer pancreático humano. El tratamiento con gemcitabina empezó el día 9 tras la implantación tumoral, cuando los tumores eran palpables. Los compuestos se prepararon inmediatamente antes de los tratamientos.

10 El Compuesto 1 de fórmula(A) se administró por vía intraperitoneal en un volumen de 10 ml/kg a la dosis de 15 mg/kg dos veces al día (BID) durante 9 días consecutivos (días 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17). La gemcitabina se administró intravenosamente en un volumen de 10 ml/kg a la dosis de 80 mg/kg durante 3 veces cada 4 días (los días 9, 13, 17). Combinada, la gemcitabina se administró durante los 3 días siguientes tras la administración de gemcitabina. El crecimiento tumoral y el peso corporal se midieron cada 3 días. El crecimiento tumoral se evaluó mediante calibrador. Se registraron los dos diámetros y el peso del tumor se calculó de acuerdo con la fórmula siguiente: longitud (mm) x ancho²/2. El efecto del tratamiento antitumoral se evaluó como porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI %). La toxicidad se evaluó basándose en la reducción del peso corporal. Los resultados se presentaron en la Tabla 6. El Compuesto 1 combinado con el agente antimetabolito gemcitabina produjo un efecto aditivo/sinérgico.

Tabla 6. Eficacia *in vivo* de la combinación con gemcitabina

Tratamiento	TGI %	Toxicidad
Compuesto 1 15 mg/kg*	53	0/8
Gemtabicina 80 mg/kg**	61	0/8
Gemtabicina 80 mg/kg + compuesto 1 15 mg/kg***	70	0/8

*Tratamientos hechos intraperitonealmente dos veces los días 9-17

20 ** Tratamientos hechos intravenosamente los días 9, 13, 17

***Tratamientos de gemcitabina el día 9, 13, 17; tratamientos del compuesto 1 el día 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20

Ejemplo 8: Eficacia antitumoral *in vivo* en combinación con cisplatino

25 Ratones macho Balb, Nu/Nu, de Harlan (Italia), se mantuvieron en cajas con cubierta de papel de filtro, comida y lecho esterilizados y agua acidificada. Células de carcinoma ovárico humano A2780 se obtuvieron de American Type Culture Collection (Rockville, MD) y se mantuvieron *in vitro* como cultivos continuos en medio RPMI suplementado con FBS 10%, a 37°C, CO₂ 5%. Para los experimentos *in vivo* se implantaron subcutáneamente 8x10⁶ células de A2780 en ratones atímicos. Este modelo tumoral se seleccionó porque era sensible a derivados de platino y también basándose en el uso de estos fármacos en cáncer ovárico.

30 El tratamiento empezó cuando los tumores fueron palpables (día 13). Ambos compuestos se prepararon inmediatamente antes del tratamiento.

El Compuesto 1 de fórmula (A) se administró por vía intraperitoneal en un volumen de 10 ml/kg a la dosis de 15 mg/kg dos veces al día (BID) del día 13 al día 17. El cisplatino se administró por vía intravenosa en un volumen de

10 ml/kg a la dosis de 8 mg/kg el día 5. Combinado, el compuesto 1 se administró del día 1 al día 5, el cisplatino el día 17. El crecimiento tumoral y el peso corporal se midieron cada 3 días. El crecimiento tumoral se evaluó mediante calibrador. Se registraron los dos diámetros y el peso del tumor se calculó de acuerdo con la fórmula siguiente: longitud (mm) x ancho²/2. Los animales se sacrificaron el día 37 tras el implante del tumor, el día 24 desde el inicio de los tratamientos y los tumores se pesaron. El efecto del tratamiento antitumoral se evaluó como porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral del grupo tratado respecto al control. La toxicidad se evaluó basándose en la reducción del peso corporal. Los resultados se presentaron en la Tabla 7.

Tratamiento	TGI %	Toxicidad
Compuesto 1 15 mg/kg*	46	0/7
Cisplatino 8 mg/kg**	21	0/7
Cisplatino 8 mg/kg + compuesto 1 15 mg/kg***	77	0/7

*Tratamientos hechos ip dos veces los días 13, 14, 15, 16, 17.

** Tratamientos hechos por vía intravenosa los días 17

10 ***Días 17: Tratamientos de cisplatino, días 13 –17: tratamientos del compuesto 1

El compuesto 1 de fórmula (A) combinado con el agente alquilante cisplatino produjo un claro efecto sinérgico. No se observó toxicidad en cualquiera de los grupos de tratamiento.

Ejemplo 9: Eficacia antitumoral *in vivo* de la combinación con irinotecan

15 Ratones macho Balb, Nu/Nu, de Harlan (Italia), se mantuvieron en cajas con cubierta de papel de filtro, comida y lecho esterilizados y agua acidificada. Células de carcinoma ovárico humano A2780 se obtuvieron de American Type Culture Collection (Rockville, MD) y se mantuvieron *in vitro* como cultivos continuos en medio RPMI suplementado con FBS 10%, a 37°C, CO₂ 5%. Para los experimentos *in vivo* se implantaron subcutáneamente 8x10⁶ células de A2780 en ratones atímicos. Este modelo tumoral se seleccionó porque era sensible a derivados de platino y también basándose en el uso de estos fármacos en cáncer ovárico.

20 Los tratamientos empezaron cuando los tumores fueron palpables (día 13). Ambos compuestos se prepararon inmediatamente antes del tratamiento.

25 El Compuesto 1 de fórmula (A) se administró por vía intraperitoneal en un volumen de 10 ml/kg a la dosis de 30 mg/kg dos veces al día (BID) del día 13 al día 17. El irinotecan se administró por vía intravenosa en un volumen de 10 ml/kg a la dosis de 60 mg/kg el día 1. Combinado, el compuesto 1 se administró del día 1 al día 5, el irinotecan el día 1. El crecimiento tumoral y el peso corporal se midieron cada 3 días. El crecimiento tumoral se evaluó mediante calibrador. Se registraron los dos diámetros y el peso del tumor se calculó de acuerdo con la fórmula siguiente: longitud (mm) x ancho²/2. Los animales se sacrificaron el día 37 tras el implante del tumor, el día 24 desde el inicio de los tratamientos y los tumores se pesaron. El efecto del tratamiento antitumoral se evaluó como porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral del grupo tratado respecto al control. La toxicidad se evaluó basándose en la reducción del peso corporal. Los resultados se presentaron en la Tabla 8.

Tratamiento	TGI %	Toxicidad
Compuesto 1 30 mg/kg*	72,3	0/7
irinotecan 60 mg/kg**	62	0/7
irinotecan 50 mg/kg + Compuesto 1 30 mg/kg***	89,9	0/7

*Tratamientos hechos ip dos veces los días 13, 14, 15, 16, 17.

** Tratamientos hechos por vía intravenosa los días 13

***Días 13: Tratamientos de irinotecan, días 13 –17: tratamientos del Compuesto 1

El Compuesto 1 de fórmula (A) combinado con el inhibidor de topoisomerasa lirinotecan produjo un claro efecto sinérgico. No se observó toxicidad en cualquiera de los grupos de tratamiento.

Ejemplo 10: Eficacia antitumoral *in vivo* de la combinación con docetaxel

5 Ratones macho Balb, Nu/Nu, de Harlan (Italia), se mantuvieron en cajas con cubierta de papel de filtro, comida y lecho esterilizados y agua acidificada. Se inyectaron $2,5 \times 10^6$ células de carcinoma de próstata humano DU145 (de American Type Culture Collection) en ratones atímicos. Este modelo tumoral se seleccionó porque se demostró previamente que el docetaxel inhibe el crecimiento del modelo *in vivo* (véase para referencia: Cancer Res. 2004 Oct 15, (64):7426-31) y también basándose en el uso de este fármaco en el cáncer de próstata (véase, para referencias, Resumen de aprobación: docetaxel en combinación con prednisona para el tratamiento del cáncer de próstata refractario a hormonas andrógeno-independiente, Clin. Cancer Res. 2004 Dec 15; 10(24): 8147-51).

El tratamiento empezó 10 días después de la última inyección de células tumorales, cuando los tumores fueron palpables. El docetaxel se preparó inmediatamente antes del tratamiento, el compuesto 1 de fórmula (A) se preparó diariamente, basándose en la estabilidad conocida del compuesto.

15 El Compuesto 1 de fórmula (A) se administró por vía intraperitoneal en un volumen de 10 ml/kg a la dosis de 30 mg/kg dos veces al día (BID) durante 9 días (los días 10 a 18). El docetaxel se administró por vía intravenosa en un volumen de 10 ml/kg a la dosis de 7,5 mg/kg los días 10, 14, 18 desde los días de inyección de las células. Combinado, el compuesto 1 se administró en el intervalo entre los tratamientos de docetaxel los días 11, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20 y 21. El crecimiento tumoral y el peso corporal se midieron cada 3 días. El crecimiento tumoral se evaluó mediante calibrador. Se registraron los dos diámetros y el peso del tumor se calculó de acuerdo con la fórmula siguiente:

longitud (mm) x ancho²/2. El efecto del tratamiento antitumoral se evaluó como el retraso en el inicio de un crecimiento exponencial de tumor (véase para referencias, Anticancer drugs 7:437-60, 1996). Este retraso (valor T-C) se definió como la diferencia de tiempo (en días) necesaria para que los tumores del grupo de tratamiento (T) y del grupo control (C) alcancen un tamaño predeterminado (1g). La toxicidad se evaluó basándose en la reducción del peso corporal. Los resultados se presentaron en la tabla inferior. El compuesto de fórmula (A) combinado con docetaxel produjo un efecto claramente sinérgico: El T-C observado cuando el compuesto 1 se combinó con docetaxel fue superior (11,5 días) al esperado por la simple adición de T-C (9) obtenido en los tratamientos individuales. No se observó toxicidad en ninguno de los grupos de tratamiento. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

Tratamiento	T-C (días)	Toxicidad
Compuesto 1 30 mg/kg*	5,3	0/7
docetaxel 7,5 mg/kg**	3,7	0/7
docetaxel 7,5 mg/kg + Compuesto 1 30 mg/kg***	11,5	0/7

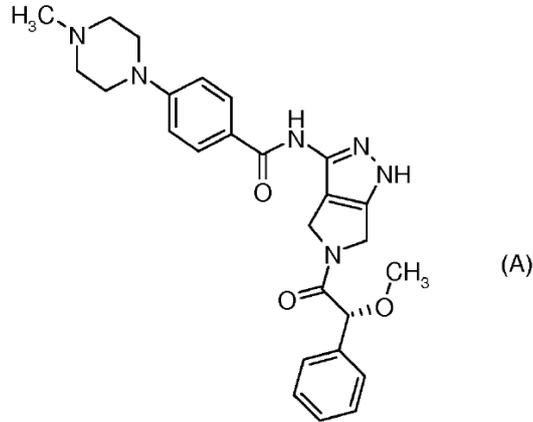
*Tratamientos hechos intraperitonealmente dos veces los días 10-18.

** Tratamientos hechos por vía intravenosa los días 10, 14, 18

***Días 10, 14, 18: Tratamientos de docetaxel, días 11, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20 y 21: tratamientos del Compuesto 1

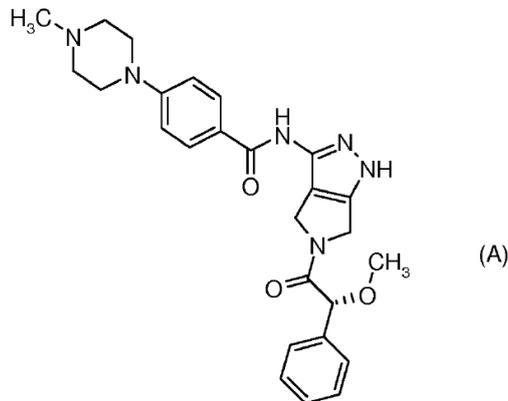
REIVINDICACIONES

1. Una combinación terapéutica que consiste en (a) Compuesto 1 de fórmula (A):



- 5 y (b) uno o varios agentes antineoplásicos seleccionados del grupo consistente en cisplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, gemcitabina, citosina arabinósido (Ara-C), SN-38, irinotecan y docetaxel, donde los ingredientes activos de la combinación están presentes en cada caso en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable o cualquier hidrato de las mismas.

2. Una combinación terapéutica que consiste en (a) un compuesto 1 de fórmula (A):



- 10 y (b) uno o varios agentes antineoplásicos seleccionados del grupo consistente en cisplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, gemcitabina, citosina arabinósido (Ara-C), SN-38, irinotecan y docetaxel para el uso en un método de tratamiento o retraso de la progresión de un trastorno proliferativo, en el que dicho método comprende una administración simultánea, secuencial o separada a un paciente necesitado del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha combinación.

- 15 3. Una composición farmacéutica que comprende una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 mezclada con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.